Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 3

БИОХИМИЯ

Действительный член АМН СССР В. Н. ОРЕХОВИЧ и В. О. ШПИКИТЕР

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ ДЕНАТУРИРОВАННОГО ПРОКОЛЛАГЕНА ПРИ ПОМОЩИ УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИ *

Как уже сообщалось ранее ([1]), вязкость растворов проколлагена в кислом цитратном буфере резко и скачкообразно снижается при нагревании до 35—40°. Температурный порог этих изменений находится в зависимости от pH среды, присутствия мочевины и т. д. В тех случаях, когда pH равнялось 2, резкое падение вязкости наступало при 32°. При pH 3,8 такого же рода изменение наблюдалось при 38°, а при pH 5,0 при 41°. Вязкость раствора проколлагена в 0,1 *M* цитратном буфере pH 4,0 + +3*M* мочевины падала при 30°. В присутствии более высоких концентраций мочевины (например, 6 *M*) эти изменения наступали уже при 23°. Аналогичным образом изменялась и величина вращения плоскости поляризации света. Продолжая изучать это явление, мы исследовали при помощи ультрацентрифуги седиментацию денатурированного проколлагена.

Белок выделялся из кожи крыс по методу, разработанному в нашей лаборатории ([2]). Измельченная кожа экстрагировалась 0,1 *M* цитратным буфером pH 3,8, каждые сутки буфер заменялся свежим, а из цитратной вытяжки выделялся проколлаген диализом против водопроводной воды. Осадок проколлагена промывался 5% раствором NaCl, затем водопроводной водой. Препарат белка сохранялся при 2—3° во влажном состоянии в присутствии тимола.

В опыт брался раствор белка в 0,1 *M* цитратном буфере pH 3,6. После определения концентрации белка по общему азоту добавлялся равный объем водного раствора 6 *M* мочевины. Эта смесь нагревалась при 30° в течение 10 мин. и затем центрифугировалась 10 мин. при ускорении 20 000 *g*.

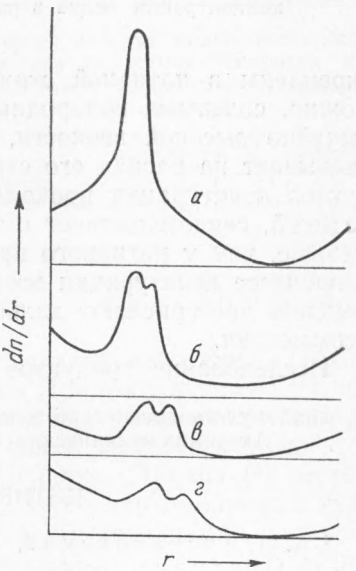


Рис. 1. Седиментационные диаграммы проколлагена после денатурации. *а* — 0,325%, *б* — 0,2%, *в* — 0,1%, *г* — 0,05%

Седиментация изучалась в ультрацентрифуге Сведберга при скорости 62 000 об/мин. и ускорении 250 000 *g*. Температура ротора была около 25°. Построение седиментационных диаграмм проводилось при помощи метода совмещенных шкал ([3]). Константа седиментации рассчитывалась по формуле:

$$S = 2(x_2 - x_1)/(x_2 + x_1)\omega^2(t_2 - t_1),$$

где x_2, x_1 — расстояния границы оседания от центра вращения, соответственно, во время t_2, t_1; ω — угловая скорость.

* В работе принимала участие В. И. Петрова.

Как видно из полученных нами данных (см. рис. 1), проколлаген в описанных выше условиях распадается на два компонента. Подъем левой части кривых на рис. 1 говорит о присутствии в белковом растворе некоторого количества низкомолекулярных продуктов.

Следует отметить, что наличие градиента вязкости в системе раствор — растворитель сильно сказывается на характере седиментационных картин. Так что, если при концентрации 0,2% через 120 мин. наблюдается только начало отделения второго компонента, то при концентрации 0,05% эти два компонента проявляются довольно ясно.

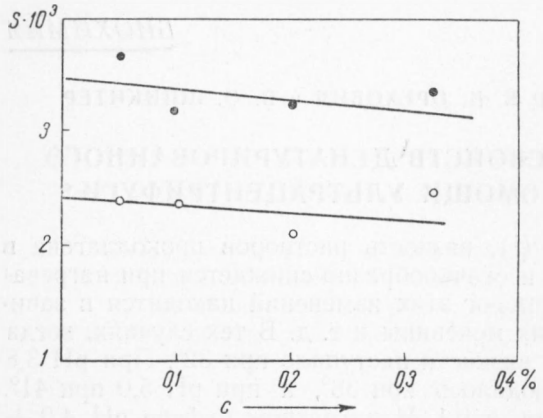


Рис. 2. Зависимость константы седиментации от концентрации белка в растворе

Экстраполяция величин S к нулевой концентрации (см. рис. 2) дает для одного компонента $S = 2{,}4 \cdot 10^{-13}$, для другого $S = 3{,}5 \cdot 10^{-13}$.

Полученные нами результаты позволяют думать, что нативный проколлаген представляет комплекс двух или более белковых компонентов. Повидимому, эти компоненты скреплены в нативной структуре относительно слабыми связями (возможно, солевыми водородными). Резкое и необратимое снижение чрезвычайно высокой вязкости, характерной для нативного проколлагена, указывает на распад его структуры. Сравнительно низкая вязкость продуктов денатурации проколлагена, сходных по своему характеру с желатиной, свидетельствует о том, что степень их асимметрии значительно меньше, чем у нативного проколлагена. Не исключена возможность, что в процессе денатурации этого белка освобождающиеся отдельные компоненты претерпевают дальнейшие изменения, уменьшающие степень их асимметрии.

Исследование продуктов денатурации проколлагена продолжается.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
25 XI 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. А. Тустановский, В. О. Шпикитер, Вопр. мед. химии, 4, 70 (1952). [2] В. Н. Орехович, Проколлагены, их химический состав, свойства и биологическая роль, М., 1952. [3] T. Svedberg, K. Pedersen, The Ultracentrifuge, Oxford, 1940.