Доклады Академии наук СССР
1955. Том 101, № 4

БИОХИМИЯ

Т. Е. ПАВЛОВСКАЯ, М. С. ВОЛКОВА и А. Г. ПАСЫНСКИЙ

ИЗМЕНЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТИОНИНА S^{35} СЫВОРОТКОЙ КРОВИ ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ ОБЛУЧЕНИЕМ И НАГРЕВАНИЕМ*

(Представлено академиком А. И. Опариным 14. I. 1955)

При денатурации сывороточного альбумина, как было нами показано (1), происходит значительное повышение связывания метионина S^{35}. Это повышение связывания наблюдается при различных способах денатурации — нагреванием, облучением, встряхиванием, действием спирта и др. и по существу, вероятно, аналогично известному эффекту повышения связывания красителей денатурированными белками (2). Вследствие высокой чувствительности изотопной методики измерение поглощения метионина S^{35} может быть использовано для установления наличия слабых денатурационных изменений, которые иногда не могут быть определены (1) другими методами. В настоящей работе эта методика применена нами для изучения денатурационных изменений в более сложной системе — в сыворотке крови при ее облучении и нагревании.

Методика измерений. Для исследования были взяты 2 образца лошадиной сыворотки; А) с консервантом и Б) без консерванта. В большинстве опытов 3 мл сыворотки смешивались с 3 мл фосфатного буфера (*M*/15, pH 7,5) и к раствору добавлялось 1—3 мл водного раствора меченого метионина, содержание которого рассчитывалось таким образом, чтобы в 1 мл смеси было от 50 000 до 100 000 имп/мин. Затем смесь подвергалась облучению ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами или нагреванию. После денатурирующего воздействия к смеси добавлялся равный объем 10% трихлоруксусной кислоты, осадок отфильтровывался и промывался 10 раз на фильтре 5% водным раствором трихлоруксусной кислоты. Затем осадок переносился в 15—20 мл 5% трихлоруксусной кислоты и оставлялся на ночь. После этого осадок вновь отфильтровывался и промывался на фильтре 10 раз 5% раствором трихлоруксусной кислоты и 1 раз этиловым спиртом, переносился в 15—20 мл спирта и оставлялся на ночь. Затем осадок отфильтровывался, промывался 1 раз спиртом, 3 раза смесью спирта и эфира (1 : 1) и 1 раз эфиром, высушивался на воздухе и тонко растирался в фарфоровой ступке. Активность навески осадка (в 9—11 мг) определялась измерением на торцовом счетчике. Полученные значения активности (за вычетом фона, составлявшего обычно 10—12 имп/мин) везде пересчитывались на 10 мг сухого осадка белка. Все опыты велись с двухкратным повторением.

Аналогичная обработка одновременно всегда проводилась с образцами исходной (необлученной) сыворотки, служившей в качестве контроля. Для свежей сыворотки активность осадков, полученных осаждением 10% трихлоруксусной кислотой смеси сыворотки и ме-

* Основные результаты работы доложены на совещании при Отделении биологических наук АН СССР 21 апреля 1953 г.

тионина немедленно после приготовления смеси, составляла всего 3—5 имп/мин. Однако, хотя сыворотки хранились в рефрижераторе, по мере их стояния активность осадков, полученных немедленно после приготовления смеси, возрастала; если же смеси сыворотки и метионина осаждались после 30—90-минутного стояния (иногда при комнатной температуре, что вызывалось необходимостью соблюдения в контроле условий, аналогичных основному опыту), то активность сухого осадка могла достигать 50—200 имп/мин, в зависимости от условий опыта, срока хранения сыворотки и др. Эти изменения активности контрольных осадков отражают самопроизвольно идущие денатурационные изменения в сыворотке, но возрастание активности осадков в основных опытах по денатурации, как будет показано ниже, везде значительно превосходило изменение в контроле.

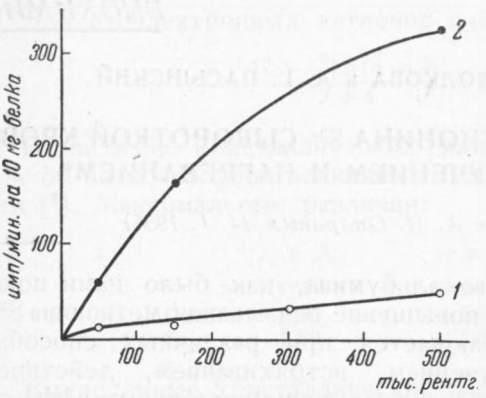


Рис. 1

Облучение ультрафиолетовыми лучами. Смесь сыворотки и метионина (50 тыс. имп/мин в 1 мл смеси) наливалась в чашку Петри, прикрытую сверху целлофаном, и облучалась при помощи кварцевой лампы ПРК-2, на расстоянии 35 см, при охлаждении облучаемого раствора льдом. Интенсивность облучения составляла около 1 млн. эрг/см^2/мин при продолжительности облучения 90 мин. Активность необлученной сыворотки в контроле после 90-минутного стояния смеси в аналогичных условиях составляла 13 имп/мин, активность осадка из облученной смеси 86 имп/мин. Интересно отметить, что если сыворотка облучалась отдельно в течение 90 мин. и необходимое количество метионина добавлялось к белку после облучения (в этом случае смесь перед осаждением трихлоруксусной кислотой выдерживалась еще 30 мин.), то активность осадка получалась значительно ниже и составляла лишь 28 имп/мин.

Активность осадка из облученной смеси зависит от дозы ультрафиолетового облучения раствора. В опытах с сывороткой А (при активности осадка в контроле 28—30 имп/мин) активность осадка после облучения сыворотки с метионином (100 тыс. имп/мин в 1 мл смеси) в течение 5, 10 и 20 мин. составляла, соответственно, 58, 70 и 108 имп/мин.

Облучение рентгеновскими лучами. Смесь сыворотки и метионина (50 000 имп/мин в 1 мл смеси) облучалась при помощи короткофокусной рентгеновской трубки БФ при интенсивности облучения около 20 000 r/мин. Раствор помещался в закрытой чашечке из плексигласа и во время облучения охлаждался водой. Дальнейшая обработка раствора производилась обычным образом. Продолжительность облучения изменялась от 2,5 до 25 мин., вследствие чего активность контроля, стоявшего без облучения в течение того же времени, возрастала от 16 до 55 имп/мин (см. рис. 1, *1*). Активность осадков из облученных растворов сыворотки А и метионина возрастала, однако, гораздо более значительно, превышая контроль при дозе в 50, 150, 300 и 500 тыс. r, соответственно, на 44, 150, 164 и 273 имп/мин (рис. 1, *2*). В аналогичном опыте с сывороткой Б продолжительность облучения изменялась от 1 до 40 мин. (доза — от 20 000 до 800 000 r), активность осадка в контроле от 80 до 180 имп/мин, а активность

осадков из облученных растворов возрастала, соответственно, от 134 имп/мин (при дозе 20 000 r) до 942 имп/мин (при дозе 800 000 r). Эти данные показывают, что заметное увеличение активности осадка наблюдается уже при облучении сыворотки дозой в 20 000 r, действие которой едва обнаруживается другими методами.

Нагревание сыворотки. Раствор сыворотки А с метионином (50 000 имп/мин в 1 мл смеси) нагревался 30 мин. на кипящей бане, после чего осаждался обычным образом. Активность осадка в контроле составляла 17 имп/мин, а в опыте 63 имп/мин. Позднее для той же сыворотки была получена активность осадка в контроле 106 имп/мин, а в опыте после нагревания 360 имп/мин.

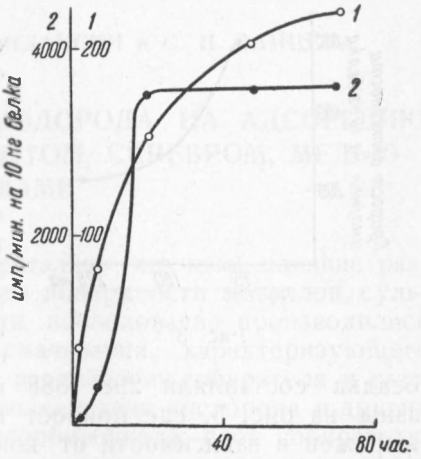


Рис. 2

Кинетика поглощения метионина. Выше уже указывалось, что при стоянии смеси сыворотки и метионина связывание метионина увеличивается. Для ускорения этого процесса раствор сыворотки А с метионином (100 000 имп/мин в 1 мл) выдерживался при 37° в течение 72 час., причем через раствор предварительно в течение 20 мин. пропускался кислород (из газометра). Пробы отбирались через 2, 7,21, 48 и 72 часа. Результаты показаны на рис. 2 (*1*), из которого виден основной вывод — что связывание метионина постепенно приближается к состоянию насыщения. Аналогичный результат был получен в другом опыте, в котором в течение первых 20 час. (из общей продолжительности опыта 72 часа) раствор дополнительно взбалтывался на качалке при 28°. Результаты опыта приведены на том же рис. 2 (*2*), из которого также видно достижение состояния насыщения.

Обсуждение результатов. Приведенные выше данные показывают, что денатурация белков сыворотки ультрафиолетовыми лучами, рентгеновскими лучами и нагреванием, как и в случае чистого серумальбумина, даже в условиях, при которых фактор действия микробных загрязнений был полностью исключен, сопровождается значительным возрастанием поглощения меченого метионина, что проявляется в росте удельной активности сухого осадка белков сыворотки. В свою очередь, эти измерения активности могут служить для обнаружения таких сравнительно слабых степеней денатурации, которые обычно ускользают от наблюдения другими физико-химическими методами (например, при 5-минутном облучении сыворотки ультрафиолетовыми лучами или при дозе рентгеновских лучей в 20 000 r), что имеет значение и для теории действия облучения.

Тот факт, что при различных способах денатурации (в том числе, при облучении и кипячении) поглощение метионина S^{35} белками сыворотки увеличивается, по нашему мнению, не согласуется с точкой зрения, по которой это поглощение является проявлением ферментативного включения аминокислот в белки внеклеточных систем [3, 4], так как с этой точки зрения следовало скорее ожидать снижения активности осадков при денатурации белков и ферментов сыворотки такими сильно действующими агентами, как облучение рентгеновскими и ультрафиолетовыми лучами и нагревание до 100°.

Мы полагаем поэтому, что наблюдаемые в наших опытах эффекты являются просто выражением характерного для белков повышения их адсорбционной способности при денатурации [1,2] связанного, повы-

димому, с высвобождением новых активных группировок. Следует полагать, что, как и в случае серумальбумина (1), активные группировки белков сыворотки при денатурации частично насыщают друг друга, так как иначе активности осадка должны были иметь более высокие значения.

Это предположение было нами, как и в предыдущей работе, проверено в серии опытов, в которых концентрация белков сыворотки постепенно уменьшалась, составляя 220, 150 и 75 мг в опыте, тогда как концентрация метионина и остальные условия опыта оставались одинаковыми.

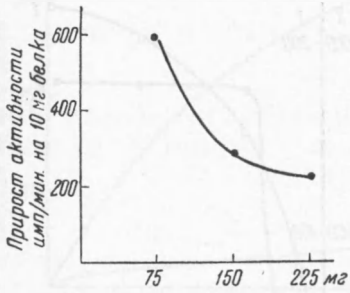


Рис. 3

В этом случае взаимное насыщение группировок различных белковых молекул благодаря разбавлению было затруднено. Действительно, активность осадка, полученного из более разбавленных растворов, была более высокой и после 30-минутного стояния указанных выше смесей составляла, соответственно, 81, 99 и 139 имп/мин. После 30-минутного облучения тех же растворов активности осадка составляли 298, 388 и 736 имп/мин. Эти результаты показаны на рис. 3, где прирост активности растворов после облучения выражен в зависимости от концентрации раствора.

Таким образом, при денатурации белков сыворотки, как и в случае серумальбумина, повидимому, часть активных группировок соединяется между собою и лишь часть их участвует в поглощении метионина. Вероятно, то же самое имеет место и при повышении связывания красителей денатурированными белками (2). Характерно также, что прибавление метионина после происшедшей денатурации сыворотки значительно снижало активность осадка (см. выше опыты с ультрафиолетовым облучением).

Относительно природы активных группировок, как и в случае серумальбумина, можно предположить возможное участие в этом процессе сульфгидрильных групп. Нами было измерено влияние цистеина на поглощение метионина, поскольку избыток SH-групп цистеина должен был препятствовать предполагаемой реакции. Действительно, добавление цистеина в количестве 8 мг/мл смеси сыворотки и метионина (с осаждением смеси после 30-минутного стояния) снижало активность осадка с 203 до 16 имп/мин, а в аналогичном опыте с облучением смеси в течение 30 мин. ультрафиолетовыми лучами активность осадка снижалась с 618 до 56 имп/мин. Таким образом, возможно, что повышение поглощения метионина белками сыворотки после денатурации также происходит с участием сульфгидрильных групп белков.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
20 XII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] А. Г. Пасынский, М. С. Волкова, В. П. Блохина, ДАН, **101**, № 2 (1955). [2] А. Д. Браун, Биохимия, **13**, 309 (1948). [3] М. Г. Крицман, А. С. Коникова, Ц. Осипенко, Биохимия, **17**, 488 (1952). [4] А. С. Коникова, М. Г. Крицман, О. П. Самарина, Биохимия, **19**, 440 (1954).