

**О МЕХАНИЗМЕ ОБРАТИМОЙ АССОЦИАЦИИ ГЛИЦИНИНА
В РАСТВОРАХ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ рН**

В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, А. В. Каракин,

Опытами на ультрацентрифуге в широких пределах рН (2,2—9,0) и ионных силах было показано, что глицинин из семядолей сои является однородным белком, обладающим способностью к обратимой ассоциации — диссоциации [1—5]. Глицинин в зависимости от условий среды может менять свой молекулярный вес от 360 000 при рН = 9,0 до 20 000 при рН = 2,2, что может иметь большое физиологическое значение при различных состояниях организма. Легкость, с которой происходит переход одной модификации глицинина в другую, говорит о том, что ассоциация не идет с образованием ковалентных и дисульфидных связей [6], т. е. мы имеем случай составной глобулы, между субмолекулами которой действуют менее прочные силы.

В нашей предыдущей работе [7] на основании спектральных данных, полученных в ультрафиолетовой и близкой инфракрасной областях спектра, было высказано предположение, что обратимая ассоциация глицинина в слабощелочных средах происходит за счет образования внутриионизированной водородной связи между аминными и карбоксильными

O
группами — $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \dots \overline{\text{O}} - \text{C} \equiv \text{O}$ — с переносом протона от карбоксильной к аминной группе.

Связь между различными частями нативной белковой молекулы, осуществляющую взаимодействием карбоксильных и аминных групп, Паулинг и Мирский [8] также называют водородной, хотя имеется и другое мнение, что эта связь является ионной. Так как водородная связь по своей природе является электростатической, то нет принципиальной разницы между водородной и солеобразной связями [8]. Следовательно, водородная связь является разновидностью солеобразной связи и в случае ассоциации глицинина в слабощелочных растворах образованную связь между аминными и карбоксильными группами с переходом протона мы называем ионизированной водородной связью.

Данное предположение хорошо объясняет сужение коротковолновой полосы поглощения в ультрафиолетовой области спектра при ассоциации белка в результате нарушения сопряжения в пептидной группе $\text{CO} - \text{NH}$ из-за наличия положительного заряда у азота, а также уменьшение интенсивности первого обертона валентного колебания невозмущенных групп NH в результате образования четырехвалентного положительно заряженного азота.

Диссоциация белка в кислых средах происходит из-за разрыва внутри-

O
ионизированной водородной связи по реакции — $\text{C} - \text{O}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{C} - \text{OH}$,
которая смещается вправо.

В щелочных средах эта связь также нарушается из-за смещения равно-

весия — $\text{NH}_3^+ + \text{OH} \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$ вправо. Действительно, при высоких значениях рН имеет место диссоциация молекул арахина [9].

Однако все указанные выше спектральные данные являются до некоторой степени косвенными.

В настоящей работе нами было проведено спектральное исследование в инфракрасной области спектра для подтверждения вышеуказанных представлений, а также изучение люминесценции глицинина.

Инфракрасные спектры. Изучение водных растворов (в H_2O и D_2O) глицинина при различных рН проводилось в инфракрасной области спектра от 4000 до 1000 cm^{-1} на регистрирующем спектрометре UR-10 при концентрации белка 1% и слое толщиной 0,02 мм.

Работа проводилась с белками, полученными из семядолей сои на разных фазах прорастания семени. Препараты белков названы следующим образом: а) «исходный» глицинин — семена замачивали два часа, б) «8-суточный» глицинин — семена проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой в течение 8 суток. Для выделения белка семядоли отделяли от оболочек и зародышей, быстро замораживали в фарфоровой ступке смесью спирта с твердой углекислотой, растирали в муку и лиофильно высушивали. Полученную муку обезжиривали в аппаратах Сокслета. Белки получали по методике, описанной ранее [10]. Полученные препараты характеризовались следующими показателями:

	Зола	Общий азот, % на сухой вес
«Исходный» глицинин . . .	0	16,6
«8-суточный» глицинин . . .	0	16,0

Водные растворы (в H_2O и D_2O) глицинина как из исходных непроросших семян, так и из семян, прораставших в течение 8 суток [7], дают почти одинаковые инфракрасные спектры поглощения. При сравнении спектров поглощения растворов белка при разных рН обнаруживаются существенные различия: при рассмотрении спектров поглощения водных растворов (в H_2O) видно, что по мере увеличения рН исчезает слабая полоса с частотой 1240 cm^{-1} и появляется новая слабая полоса с частотой 1090 cm^{-1} и, кроме того, намечается довольно сильное поглощение в области частот от 1400 до 1600 cm^{-1} (рис. 1, а).

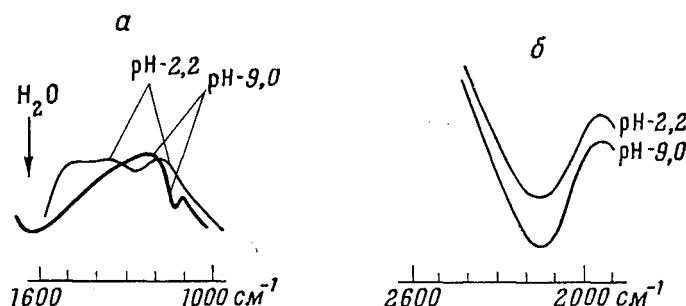


Рис. 1. Инфракрасные спектры «исходного» глицинина в буферных растворах в H_2O (а) и в D_2O (б)

Растворы глицинина в D_2O дают инфракрасные спектры с более четкими полосами поглощения, так как не происходит наложения полос поглощения самого растворителя в интересующих нас областях спектра, за исключением области спектра с частотой у 1200 cm^{-1} (δOD). В области частот 4000—2000 cm^{-1} растворы глицинина дают широкую и довольно интенсивную полосу поглощения с максимумом у 3420 cm^{-1} , которая при увеличении рН несколько уменьшает свою интенсивность, а полоса поглощения с частотой 2120 cm^{-1} увеличивает свою интенсивность (рис. 1, б),

в то время как полоса поглощения с частотой 2940 см^{-1} не изменяет свою интенсивность. На рис. 2 приведены спектры поглощения растворов глицинина в D_2O в области от 1300 до 1800 см^{-1} , которые показывают, что при увеличении рН раствора отмечаются следующие изменения:

- исчезают полосы поглощения с частотой 1380 и 1710 см^{-1} ,
- полосы поглощения с частотой 1470 и 1640 см^{-1} увеличивают свою интенсивность,
- появляются полосы поглощения с частотой 1560 и 1090 см^{-1} .

Все указанные выше изменения инфракрасного спектра поглощения глицинина в зависимости от рН раствора сведены в таблицу, в которой частоты полос отнесены к соответствующим колебаниям групп атомов.

Данные таблицы полностью подтверждают высказанное ранее предположение о механизме обратимой ассоциации, идущей с образованием

O

внутриионизированной водородной связи $-\overset{+}{\text{NH}_3} \dots \overset{-}{\text{O}}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-$ при ассоциации глицинина в слабощелочных средах. Доказательством данной схемы является появление полос поглощения колебания групп $\overset{+}{\text{NH}_3}$ и COO^- и уменьшение или исчезновение полос поглощения, относящихся к колебаниям невозмущенных NH_2 -групп и неионизированных групп COOH при $\text{pH} 9,0$. Образование внутриионизированной водородной связи между идентичными субмолекулами и отдельными мономерами глицинина хорошо объясняет лабильную обратимую ассоциацию глицинина в зависимости от рН среды. Эта связь более прочная, чем простая водородная связь, из-за наличия разноименных зарядов и обеспечивает прочность связи между отдельными субмолекулами в макромолекуле глицинина.

Люминесценция белков при возбуждении ультрафиолетовой областью спектра $240-280 \text{ мкм}$ определяется флуоресценцией аминокислотных остатков. Более того, флуоресценция белка в первую очередь зависит от присутствия в белке триптофана, дающего полосу испускания с максимумом в области $325-345 \text{ мкм}$ [15]. При этом не обнаруживается люминесценция, характерная для тирозина и фенилаланина, несмотря на то, что их количество в белке во много раз больше, чем триптофана. Отсутствие компонент флуоресценции тирозина и фенилаланина в полосе флуоресценции белков связывают с меньшим квантовым выходом свечения (для фенилаланина), меньшим коэффициентом экстинкции, миграцией энергии с тирозина на триптофан и тушением возбужденного состояния тирозина в результате частичной ионизации фенильной группы, из-за образования водородной связи с пептидной группой [16].

Максимум полосы испускания триптофана в белке лежит в более коротковолновой области спектра, чем в растворах аминокислоты ($360-365 \text{ мкм}$) [15].

Сдвиг максимума испускания триптофана связывают с повышением жесткости структуры аминокислоты в белке [16] и влиянием электростатического поля, создаваемого полярными группами белка [17]. Изменение рН среды приводит к смещению максимума полосы испускания [16].

Однако работ по исследованию флуоресценции белков при ассоциации последних не проводилось.

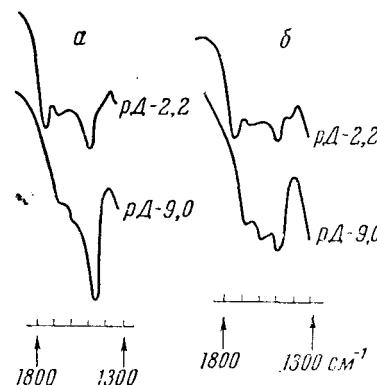


Рис. 2. Инфракрасные спектры «последнего» (a) и «8-суточного» (b) глицинина в буферных растворах в D_2O

Изменения инфракрасного спектра поглощения глицинина в зависимости от pH раствора

Частоты полос, см^{-1}	Колебание групп атомов	Изменения полос поглощения при увеличении pH
3420	Валентное колебание NH-группы, в том числе невозмущенных NH_2 -групп [8, 9]	Уменьшается интенсивность
2940	Валентное колебание C—H-групп [8, 9]	Не изменяется
2120	Валентное [9] или деформационное [10] колебания NH_3^+ -групп	Увеличивается интенсивность
1710	Валентное колебание C=O-групп в неионизированных COOH [11]	Исчезает
1640	Амидные полосы I и II аминокислот, связанные с группировкой NH_3^+ [11]. Кроме того, частоты 1640 см^{-1} относят к асимметричным колебаниям COO^- [13, 14]	Увеличивается интенсивность
1560	То же	Появляется
1470	Аминокислотная полоса II — симметричное деформационное колебание NH_3^+ -группы [11, 14] или симметричное колебание COO^- -групп [12]	Увеличивается интенсивность
1380	Возможно деформационное колебание невозмущенных ND-групп [?]	Исчезает
1240	Валентное колебание C—O или деформационное колебание COOH, когда группа COOH не ионизирована [11]	То же
1090	Маятниковое колебание NH_3^+ -групп [14]	Появляется

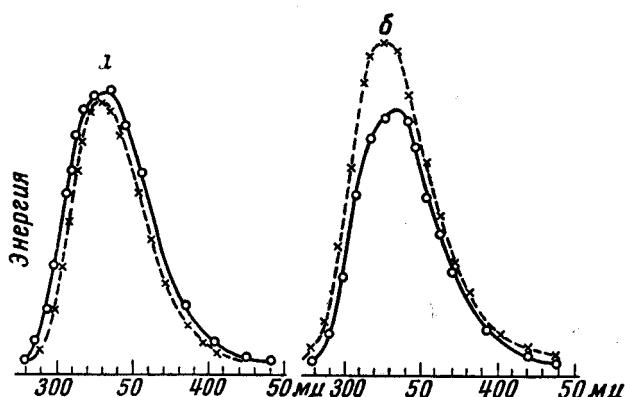


Рис. 3. Спектры люминесценции «исходного» (а) и «8-суточного» (б) глицинина при изменении pH от 2,2 до 9,0.

Сплошная кривая — pH 2,2; пунктир — pH 9,0

В данной работе спектры люминесценции измерялись на регистрирующей спектрофотометрической установке, построенной на базе кварцевого спектрофотометра СФ-4, в которой в качестве источника ультрафиолетового света применяется ртутно-кварцевая лампа СВД-120А в комбинации с газовым хлорным фильтром; регистрация люминесценции производится фотоумножителем ФЭУ-18 с последующей подачей сигнала на электронный потенциометр [18]. На рис. 3 приведены спектры люминесценции растворов глицинина «исходного» и «8-суточного» при pH 2,2 и 9,1 и концентрации белка 1 мг/мл раствора¹.

¹ Выражаем благодарность Ю. А. Владимирову за проведение измерения.

Флуоресценция растворов глицинина определяется свечением триптофана и не отмечается свечения, которое можно было бы отнести к тирозину и фенилаланину. При изменении рН раствора глицинина от 2,2 до 9,0 отмечается сдвиг максимума полосы флуоресценции в более коротковолновую область спектра. Однако самым существенным следует считать уменьшение интенсивности флуоресценции при увеличении рН, т. е. по мере ассоциации «исходного» белка. В случае «8-суточного» глицинина отмечается обратная зависимость, что связано с изменением белка при прорастании. При рассмотрении данного явления необходимо учитывать изменение квантового выхода триптофана в зависимости от рН среды. Так, при рН 2,2 квантовый выход свечения равен 0,07, в то время как при рН 9,0—0,2 [12]. Правда, в белке эта зависимость несколько искажена, но все же остается. Если учитывать этот факт, то уменьшение интенсивности флуоресценции «исходного» глицинина при увеличении рН среды должно быть значительно большим, чем это наблюдается в опыте. Также должна уменьшаться флуоресценция «8-сутечного» глицинина при увеличении рН среды.

Следовательно, по мере ассоциации глицинина интенсивность флуоресценции уменьшается в результате образования внутриионизированной водородной связи, которая приводит к тушению возбужденного состояния белка, т. е. аминокислотного (триптофанового) остатка.

Выводы

1. Появление полос поглощения колебания групп $\overset{+}{\text{NH}_3}$ и COO^- и уменьшение или исчезновение полос поглощения, относящихся к колебаниям невозмущенных NH_2 -групп и неионизированных групп COOH в растворе глицинина при рН 9,0, подтверждают предположение о том, что ассоциация глицинина в слабощелочных растворах идет с образованием внутриионизированной водородной связи — $\overset{+}{\text{NH}_3} \dots \overset{\ominus}{\text{O}} \text{C} \text{—}$.

2. Образование внутриионизированной водородной связи между идентичными субмолекулами и отдельными мономерами глицинина хорошо объясняет лабильную обратимую ассоциацию в зависимости от рН среды. Эта связь более прочная, чем простая водородная связь, и обеспечивает прочность макромолекулы глицинина.

3. По мере ассоциации глицинина интенсивность флуоресценции уменьшается в результате образования внутриионизированной водородной связи, которая приводит к тушению возбужденного триптофанового остатка.

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР
Институт геохимии и аналитической химии
АН СССР

Поступила в редакцию
9 XII 1960

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, С. Я. Френкель, Биохимия, 21, 842, 1956.
2. В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, С. Я. Френкель, Биохимия, 23, 135, 1958.
3. В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, С. Я. Френкель, Биохимия, 23, 547, 1958.
4. Г. А. Деборин, Г. Ф. Иващенко, Т. И. Смирнова, Докл. АН СССР, 114, 602, 1957.
5. В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, Сб. Биохимия зерна и хлебопечения, 1960, № 6, 66.
6. Т. И. Смирнова, Б. Ф. Поглазов, В. Л. Кретович, Биохимия, 24, 758, 1959.
7. В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, А. В. Калякин, Биохимия, 26, № 5, 1961.

8. A. E. Mirsky, L. Pauling, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., **22**, 439, 1936; Ф. Путнам, Белки (под ред. Нейрата и Бэйли). Изд. ин. лит., М., 1956.
9. W. E. F. Naismith, R. K. Williams, J. Polymer Sci., **26**, 199, 1957.
10. В. Л. Кретович, Т. И. Смирнова, М. К. Вейнова, Сб. Биохимия зерна, 1958, № 4, 5.
11. Л. Беллами, Инфракрасные спектры молекул, Изд. ин. лит., М., 1957.
12. E. Ellengen, J. Amer Chem. Soc., **78**, 363, 1956.
13. A. Leifer, E. R. Lippincott, J. Amer. Chem. Soc., **79**, 5098, 1957.
14. S. Suzuki, T. Ohshima, N. Tamaya, K. Fukushima, T. Shimanoouchi, S. Mizushima, Spectrochim. acta, 1959, № 11, 969.
15. С. В. Конев, Докл. АН СССР, **116**, 594, 1957; Ю. А. Владимиров, Докл. АН СССР, **116**, 780, 1957; Ю. А. Владимиров, Изв. АН СССР, сер. физ., **23**, 86, 1959; R. H. Steele, A. C. Szent-Györgyi, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **44**, 540, 1958.
16. Ю. А. Владимиров, Э. А. Бурштейн, Биофизика, **5**, 385, 1960; F. W. Y. Teale, Biochem. J., **76**, 381, 1960.
17. F. W. Y. Teale, G. Weber, Biochem. J., **72**, 15, 1959.
18. Ю. А. Владимиров, Ф. Ф. Литвин, Биофизика, **4**, 601, 1959.
19. A. White, Biochem. J., **71**, 217, 1959.

**MECHANISM OF THE REVERSIBLE ASSOCIATION OF GLYCININ IN SOLUTION
ON VARIATION OF pH**

V. L. Kretovich, T. I. Smirnova, A. V. Karyakin

Summary

Experiments in the infrared region have shown that association of glycinin in weakly alkaline solutions takes place with the formation of a salt-like intra-ionized hydrogen

