

## СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ В ФИБРИЛЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

*З. А. Капралова, С. Я. Мирлина, П. В. Козлов,  
В. А. Каргин, Л. А. Попова*

При исследовании явлений переноса через полимерные непористые мембранны при высоковольтном электродиализе ряда белков (желатины, миозина, яичного альбумина, эдестина) было показано [1], что в определенных условиях можно разделить частицу белка на простейшие блоки. Эти блоки, обладая большой подвижностью, при взаимодействии друг с другом способны создавать высокоупорядоченные структуры, характерные для структуры нативного белка.

В данной работе была поставлена задача исследования структурных превращений в фибриллярных белках в зависимости от условий их разрушения и последующих процессов структурообразования.

## Методика исследования

Объектами исследования являлись: фибриллярный белок — проколлаген с молекулярным весом  $M = 300\ 000$  и желатина с  $M = 45\ 000$ , предварительно очищенные электролизом от низкомолекулярных примесей. Разрушение протеинов на отдельные структурные единицы, т. е. тонкое их диспергирование, осуществлялось различными методами: высоковольтным электродиализом в пятикамерном электродиализаторе, воздействием температуры, ультразвука и различных добавок химических реагентов. В качестве добавок низкомолекулярных веществ исследовали поверхностноактивные электролиты (катионные — «Армак» и анионные — дигексиловый эфир Na-соли сульфоянтарной кислоты), неионные поверхностноактивные вещества (ОП-10); неорганические кислоты (уксусная, салициловая); основания (аммиак, диметиламин) и детергенты (мочевина).

Действие различных химических реагентов изучали при добавлении их к желатине. В опытах с электродиализом в среднюю камеру диализатора после почти полного прекращения переноса белка прибавляли по каплям (до 1,5—2 мл) раствор одного из указанных реагентов. Все исследования структурных белков, прошедших через мембрану в анодную и катодную камеры, проводили параллельно с исследованиями их в средней камере электродиализатора и с исходным белком.

Для исследования действия мочевины на перенос белка электродиализ желатины и проколлагена проводили в растворах мочевины 3-х молярной концентрации. Для электронномикроскопического исследования растворы этих белков подвергали обычному многодневному диализу до полного удаления мочевины.

Для исследования влияния температуры растворы желатины 0,001% концентрации, к которым было добавлено несколько капель салициловой кислоты, выдерживали при 50° в течение 2 час. (без электродиализа). Через 2 часа эти растворы подвергались электронномикроскопическому исследованию.

Исследование процессов структурообразования протеинов проводили с помощью электронного микроскопа типа JEM-5Y, при прямом электронно-

оптическом увеличении от 10 000 до 80 000  $\times$ . Для повышения контрастности изображения образцы, нанесенные на коллоксилиновую подложку, оттеняли хромом на вакуумной установке ВУП-2.

Исследование действия ультразвука на 0,1%-ные растворы желатины проводили на ультразвуковой установке лаборатории анизотропных структур АН СССР<sup>1</sup>. Используемые в этих опытах мощности составляли 50 и 85  $vt/cm^2$  при времени воздействия от 5 до 20 сек. и кратности воздействия от 1 до 10 раз. Температура исследуемых растворов не превышала 25°. После действия ультразвука растворы протеина разбавляли до 0,001%-ной концентрации и подвергали электронномикроскопическому исследованию. Кроме того, измеряли вязкость этих растворов до и после облучения.

### Экспериментальные данные

**1. Разрушение исходной структуры желатины и проколлагена при электродиализе.** Процессы переноса желатины через непористые полимерные мембранны при электродиализе ее растворов, замеченные еще ранее [2], были подробно изучены в работе [1]. Для нахождения оптимальных условий переноса в этой работе было проведено сравнительное изучение влияний температуры и добавок химических реагентов. Проведение электродиализа при 35, 40 и 50° дало возможность установить, что перенос протеина сильно увеличивается с повышением температуры. При этом контрольные опыты по определению вязкости растворов желатины показали, что молекулярный вес желатины изменяется незначительно. Это указывает на отсутствие заметной деструкции даже при проведении электродиализа при 50°.

Из всех исследованных добавок наибольший эффект на скорость переноса белка оказывает мочевина. При проведении электродиализа 7%-ных растворов желатины в растворах мочевины двухмолярной концентрации наблюдали самый значительный перенос белка. Кроме катионного поверхностноактивного вещества «Армак» и амиака, все остальные изученные химические реагенты также заметно увеличивают перенос. Так, например, количество протеина, прошедшего через мембрану при 50° при электродиализе в присутствии диметиламина, составляет 36,5% (1,5 г) от исходного количества диализуемой желатины (4 г).

Наконец, представляло большой интерес изучить перенос белка — проколлагена через непористую полимерную мембрану при электродиализе. Электродиализ растворов проколлагена проводили в различных средах: в насыщенных растворах салициловой кислоты, в растворах мочевины 4-х молярной концентрации и в растворах уксусной кислоты. Наибольший перенос белка наблюдали в растворах мочевины.

**2. Процессы структурообразования, происходящие в протеинах после разрушения исходных структур.** а) При электродиализе. Электронномикроскопические исследования протеинов из средней камеры в процессе диализа и прошедших через непористую полимерную мембрану проводили в сравнении с исходными протеинами.

Для исходной желатины на электронномикроскопических снимках были получены образования, имеющие глобулярный характер (рис. 1), что подтверждает результаты ранее проведенных исследований.

Для желатины, прошедшей через мембрану в катодную и анодную камеры, удалось обнаружить наряду с глобулами (рис. 2, а) совершенно новые структуры, резко отличающиеся от структур исходной желатины (рис. 2, б). На электронномикроскопических снимках видны правильные фибриллярные образования длиною от 1000 Å до 20 000 Å и шириной от 100 Å до 1000 Å. При увеличении не удается обнаружить более тонкую структуру этих фибрилл.

<sup>1</sup> Пользуясь случаем, выражаем искреннюю признательность сотрудникам Института анизотропных структур Г. Д. Андреевской, Э. С. Зеленскому и А. С. Кузнецовой за содействие и помощь при проведении работы на ультразвуковой установке.

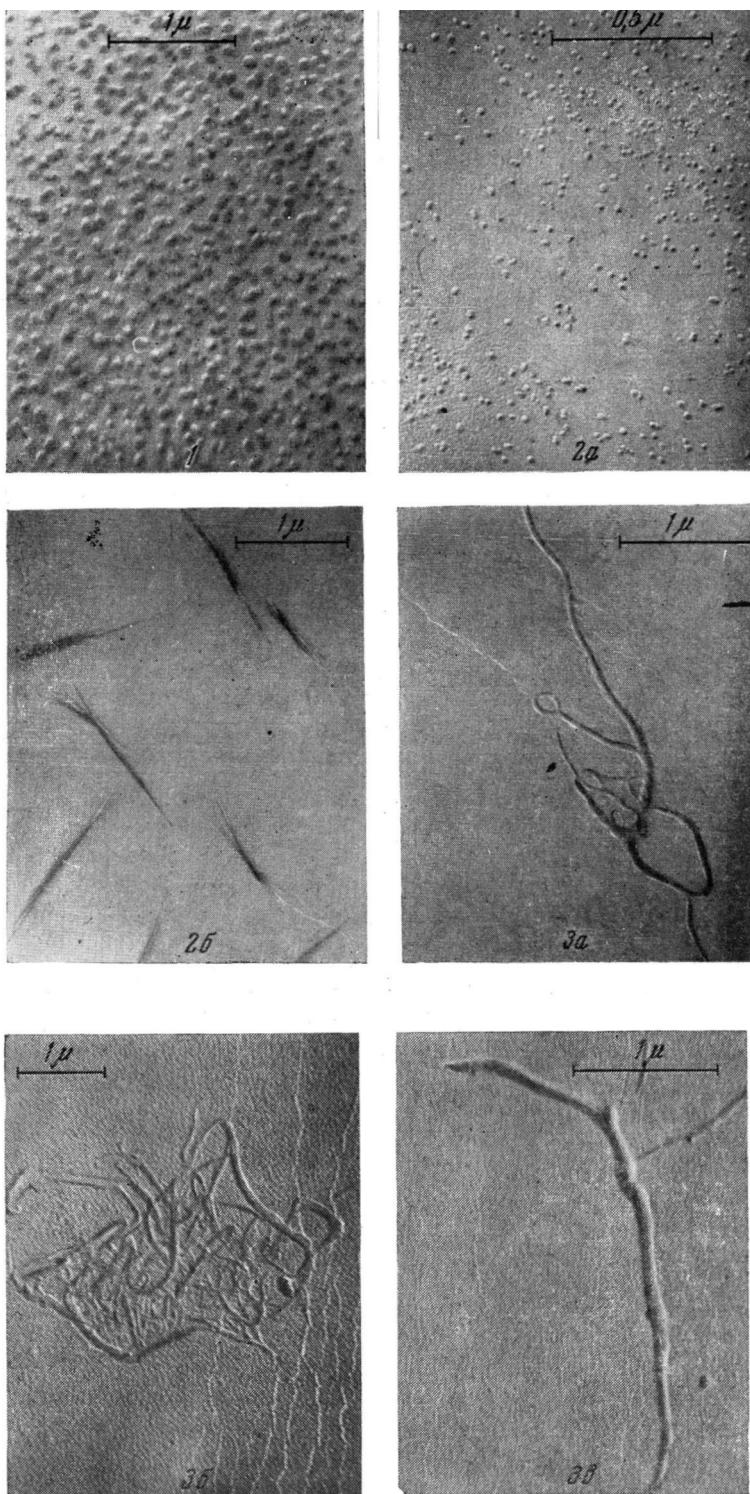


Рис. 1. Структурные образования в исходной желатине  
 Рис. 2. Структурные образования в желатине, прошедшей через мембрану в анодную и катодную камеры: *a* — глобулярные; *б* — фибриллярные  
 Рис. 3. Структурные образования в проколлагене, прошедшем через мембрану:  
*a*, *б* — при добавлении уксусной кислоты; *в* — при добавлении салициловой кислоты; *г* — при электродиализе в растворах мочевины (см. на обороте)

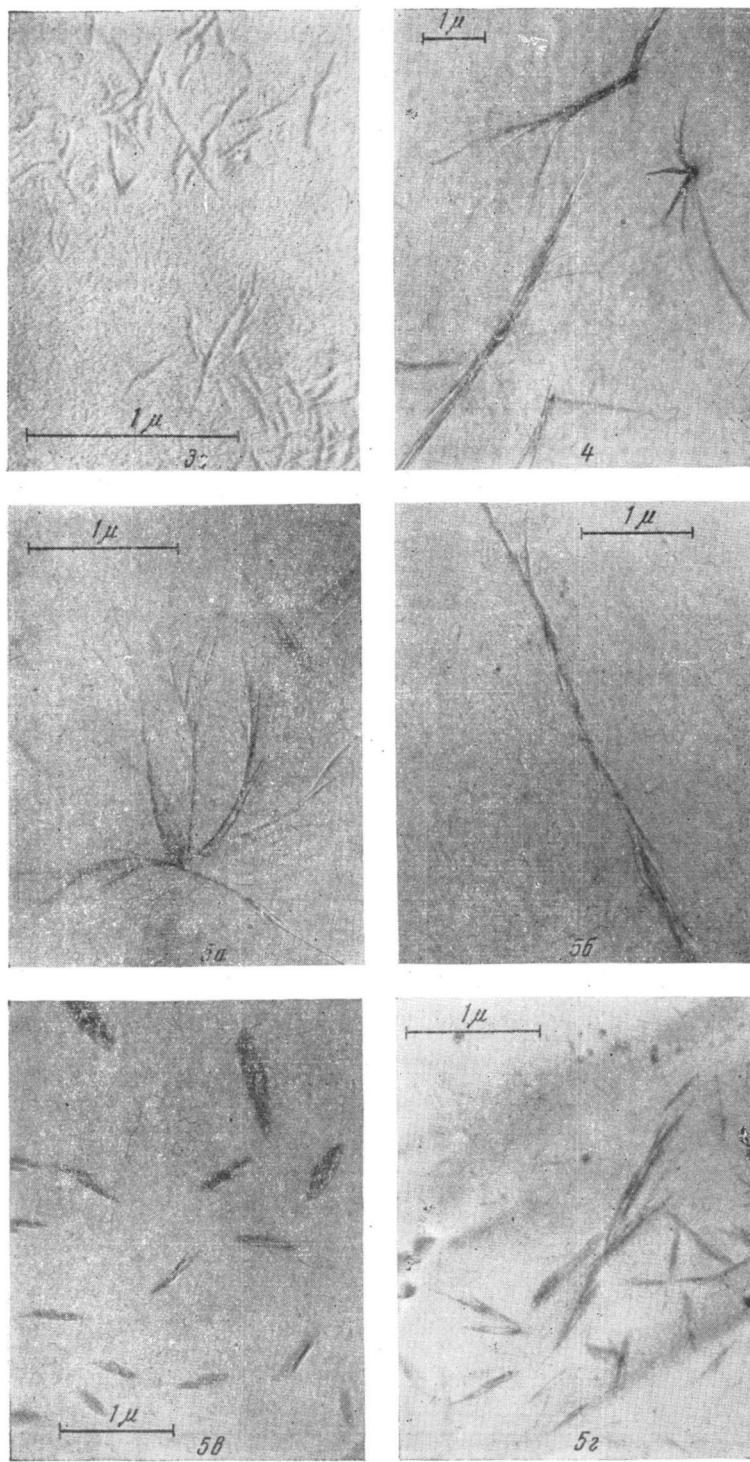


Рис. 4. Структурные образования в растворах желатины при  $50^\circ$  в присутствии салициловой кислоты

Рис. 5. Структурные образования в растворах желатины после действия ультразвука:

*a, б* — при мощности облучения  $50 \text{ } \text{ж} \cdot \text{см}^{-2}$ ; *в, г* —  $85 \text{ } \text{ж} \cdot \text{см}^{-2}$

При исследовании процессов структурообразования, проходящих в растворах белков после их электродиализа в присутствии химических реагентов, было обнаружено, что последние не оказывают специфического действия на характер вторичных упорядоченных структур протеинов, переносимых через непористые мембранны. Большинство химических добавок оказывает влияние только на скорость переноса белков через непористую мембрану, ускоряя процессы тонкого их диспергирования.

Это предположение было проверено в опытах по электродиализу монодисперсного фибриллярного белка — проколлагена.

Перенос проколлагена через мембрану наблюдался при электродиализе из растворов в мочевине, салициловой и уксусной кислотах. Для проколлагена, прошедшего через мембрану, были обнаружены либо длинные, тонкие фибриллы в случае добавок уксусной (рис. 3, а, б) и салициловой кислот (рис. 3, в), либо короткие нитеобразующие структуры в случае добавок мочевины. Последние возникают вследствие сильного диспергирующего действия мочевины (рис. 3, г).

б) При тепловом воздействии. Электронномикроскопическое исследование растворов желатины с добавкой салициловой кислоты, которые были выдержаны при 50° в течение двух часов, показало, что скорость диспергирования в этих условиях достаточна для образования вторичных упорядоченных структур. На рис. 4 видны хорошо образованные фибриллярные структуры. Очевидно, и в случае температурного воздействия в присутствии салициловой кислоты происходит ослабление межмолекулярных связей, приводящее к тонкому диспергированию и последующему образованию упорядоченных структур.

в) При действии ультразвука. Исследование действия механического диспергирования проводили на ультразвуковой установке с растворами желатины 0,1%-ной концентрации. Падение вязкости растворов желатины после ее облучения ультразвуком составило 3,7%, что указывает на отсутствие в этих опытах деструкций.

При исследовании процессов структурообразования, происходящих в желатине после разрушения ее исходной структуры действием ультразвука, удалось наблюдать на электронномикроскопических снимках высокоупорядоченные линейные образования. На рис. 5 а и б видны длинные фибриллы. Эти структуры образуются после действия ультразвука на протеин в течение 15 сек. при мощности облучения 50 вт/см<sup>2</sup>.

На многих снимках видно, что эти длинные фибриллы шириной до 1000 Å, в свою очередь, состоят из более коротких и более тонких ниточек (рис. 5, б). При повышенной мощности облучения до 85 вт/см<sup>2</sup> были обнаружены структуры, похожие на кристаллические (рис. 5, в и 5, г).

### Обсуждение результатов

При проведении электродиализа растворов желатины было установлено, что разрушение структур протеина и перенос элементов этих структур через непористую мембрану усиливается при повышении температуры и добавлении в среднюю камеру различных химических реагентов (поверхностноактивных веществ, органических кислот, оснований, дегтергентов). Очевидно, перенос белка ускоряется при повышении температуры в результате ослабления сил межмолекулярного взаимодействия, связывающих отдельные структурные элементы, и увеличения их подвижности. Действие химических реагентов также сводится к наилучшему диспергированию исходной структуры.

На характер образующихся вторичных упорядоченных структур протеинов, т. е. на последующий процесс структурообразования ни температура, ни химические реагенты, как показали опыты, влияния не оказывают.

Наблюдаемое явление переноса протеинов через непористые мембранны связано с особенностями их сложного строения и способностью в определен-

ных условиях к непрерывному распаду исходных структур на отдельные структурные единицы, т. е. к тонкому диспергированию исходных структур на очень подвижные структурные единицы, с большой скоростью проходящие через мембранны и легко взаимодействующие друг с другом с образованием упорядоченных структур.

При сравнении структур, образующихся в протеине при действии ультразвука и температуры, а также в протеине, прошедшем через мембрану, можно отметить их сходство. Следовательно, процесс структурообразования, проходящий в протеинах, после диспергирования не зависит от метода, которым последнее производилось: диффузией протеинов через непористую мембрану, воздействием ультразвука или нагреванием в присутствии химических реагентов. Образующиеся при этом конечные структуры во всех случаях одинаковы (рис. 2, б — 5, г). По-видимому, метод, которым производится диспергирование, не оказывает существенного влияния на последующий процесс структурообразования. Однако тонкое диспергирование исходной структуры белков на мелкие структурные элементы — блоки является необходимым условием образования правильных высокоупорядоченных надмолекулярных структур. Это связано, по-видимому, с уменьшением вязкости системы и увеличением подвижности в результате диспергирования больших белковых частиц на маленькие блоки.

### Выводы

1. В работе удалось осуществить разрушение структур протеинов на отдельные структурные элементы, т. е. тонкое диспергирование вещества различными методами: при переносе белков через полимерные непористые мембранны в процессе электродиализа, при воздействии ультразвука, температуры и добавок химических реагентов.

2. Изучено влияние различных химических реагентов на перенос протеинов. Установлено, что большинство их увеличивает перенос белков. Очевидно, изученные химические реагенты облегчают процесс диспергирования исходных протеинов и тем самым увеличивают их подвижность.

3. При исследовании процесса структурообразования в диспергированных протеинах были обнаружены новые высокоупорядоченные структурные образования, совершенно отличные от структур исходных протеинов. Следует отметить сходство структур, образующихся в протеинах после их диспергирования различными методами.

4. Настоящее исследование позволяет заключить, что необходимым условием для образования новых высокоупорядоченных структур является предварительное тонкое диспергирование исходных протеинов на структурные элементы. Характер получающихся при этом структур не зависит от метода, которым производилось диспергирование.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
28 I 1961

### ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Каргин, П. В. Козлов, С. Я. Мирлина, З. А. Капралова, Высокомолек. соед., 4, 167, 1962.
2. П. И. Зубов, З. Н. Журкина, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, 67, 659, 1949; А. А. Тагер, В. А. Каргин, Ж. физ. химии, 15, 1029, 1941; И. И. Жуков, Электрокинетические свойства капиллярных систем, Изд. АН СССР, 1956, стр. 296.

## STRUCTURAL TRANSFORMATIONS IN FIBRILLAR PROTEINS

**Z. A. Kapralova, S. Ya. Mirlina, P. V. Kozlov, V. A. Kargin,  
L. A. Popova**

## S u m m a r y

Protein Structures have been degraded into separate elements, i. e. various methods have been employed to accomplish the fine breakdown of the substance. The methods comprised: transfer of protein through non-porous polymer membranes during electrolysis, application of ultrasonics and of chemical agents. The effect of the chemical agents on protein transfer has been investigated. Most of them have been found to augment the latter. Evidently the agents facilitate breakdown of the initial proteins and thus increase its mobility. Investigation of the structuration process of the broken down proteins revealed the formation of new, highly ordered structures, quite different from those of the original proteins. A striking similarity has been noted of the structures formed by proteins broken down by different methods. It has been concluded that a necessary condition for the formation of new, highly ordered structures is the preliminary breakdown of the original proteins into their structural elements. The nature of the structures formed in this way does not depend upon the breakdown method.