

## СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ В ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКАХ

*З. А. Капалова, С. Я. Мирлина, П. В. Козлов,  
В. А. Каргин, В. К. Хохлова*

В предыдущей работе [1] были подробно исследованы процессы разрушения и возникновения структур фибрillярных белков при переносе их через непористые мембранны при высоковольтном электродиализе. Выяснение общих закономерностей процессов возникновения и распада структур белков имеет непосредственное значение для моделирования биологических структур.

В данной работе мы пытались осуществить процесс разрушения структур глобулярных белков при электродиализе, при действии ультразвука и различных химических реагентов и исследовать последующие процессы структурообразования.

## Методика исследования

Объектом исследования являлся глобулярный растительный белок — эдестин с молекулярным весом 300 000.

Эдестин получали по известной методике [2] и тщательно очищали тройной перекристаллизацией с последующим удалением из него низкомолекулярных примесей при помощи электродиализа. Действие химических реагентов исследовали при добавлении их в среднюю камеру к раствору или суспензии белка. Исследовали влияние добавок поверхностноактивных веществ как ионных («Армак») и дигексиловый эфир (Насоли сульфоянтарной кислоты), так и неионных (ОП-10) на перенос белка через непористые мембранны при электродиализе, а также действие органических кислот (уксусная, салициловая), оснований (аммиак) и детергентов (мочевина).

Растворы указанных химических реагентов добавляли по каплям, не более 1 мл в среднюю камеру электродиализатора после почти полного прекращения переноса белка через мембранны.

Исследование разрушенных структур эдестина, а также процессов последующего структурообразования проводили с помощью электронного микроскопа JEM-5Y при прямом электронно-оптическом увеличении 15 000—85 000 $\times$ . В процессе электродиализа через каждые сутки исследовали структуру эдестина, прошедшего через мембранны в анодную и катодную камеры, а после прекращения переноса белка через непористую мембранны исследовали также структуру эдестина из средней камеры в сравнении со структурой исходного продукта. Электронномикроскопическому исследованию подвергали также суспензию эдестина после воздействия ультразвука.

**Разрушение и синтез структур эдестина при переносе его через непористые мембранны.** При электродиализе суспензий эдестина (1 г белка на 60 мл Н<sub>2</sub>O) явление переноса белка через непористые полимерные мембранны было обнаружено в многократных опытах при всех возможных градиентах потенциала. Опыты проводили при температурах 20, 40 и 60° и при напряжениях от 0,05 до 2,5 тысяч вольт.

Было выяснено, что повышение температуры незначительно увеличивает перенос белка. Действие поверхностноактивных веществ оказалось более эффективным, чем тепловое воздействие.

В наибольшей степени имел место перенос эдестина при добавлении уксусной кислоты, причем продукт сильно набухал. Однако еще легче осуществлялся даже при низких температурах ( $25^{\circ}$ ) перенос белка в боковые камеры при проведении электродиализа 1%-ного раствора эдестина, в растворах мочевины 2, 3, 4-х молярной концентрации. Через 20—30 мин. после начала электродиализа раствор в средней камере начинал мутнеть и эдестин выпадал из раствора в виде плотных хлопьев.

Коагуляция эдестина имела место при проведении электродиализа в растворах мочевины против воды, а также против растворов мочевины. Выпавший осадок эдестина, отмытый от мочевины, не растворялся в спирте, уксусной, муравьиной, лимонной и серной кислотах, в аммиаке, а также в растворах мочевины более высоких концентраций, в то время как эдестин, денатурированный при нагревании, хорошо растворялся в растворах мочевины. Однако хлопья эдестина полностью растворялись в растворе едкого калия, из которого эдестин снова мог быть осажден серной кислотой. Этот осадок уже хорошо растворялся в растворах мочевины, но при электродиализе этого раствора белок вновь осаждался в средней камере электродиализатора. Осадок выливали в большой объем воды, тщательно отмывали от мочевины и исследовали с помощью электронного микроскопа.

**Разрушение и синтез структуры эдестина с помощью ультразвука.** Суспензию эдестина (1 г на 180 мл воды) подвергали воздействию ультразвука на ультразвуковой установке лаборатории анизотропных структур АН СССР<sup>1</sup>. Опыты проводили с использованием двух мощностей — 50 и 85 вт/см<sup>2</sup> и продолжительности воздействия 5, 10 и 20 сек.

Температура исследуемой суспензии во время опыта изменялась в пределах от 10 до  $20^{\circ}$ . Суспензии белка до и после воздействия ультразвука исследовали с помощью электронного микроскопа.

### Экспериментальные данные и их обсуждение

При исследовании структуры исходного не подвергнутого электродиализу эдестина электромикроскопическим методом были обнаружены глобулы (рис. 1, а) и более сложные образования из глобул (рис. 1, б, в).

В эдестине, взятом для исследования из средней камеры после и во время электродиализа, были найдены мелкие глобулы (рис. 2, а), образующиеся, очевидно, в результате диспергирования, а также прямолинейные образования, очень асимметричные, возникающие, очевидно, при развертывании свернутых полипептидных цепочек и последующей агрегации их под действием сил межмолекулярного взаимодействия (рис. 2, б). Если разворачивание глобул при переносе белков через мембрну действительно имеет место, то для эдестина, прошедшего мембрну, помимо глобулярных структур, возникающих в результате самопроизвольного процесса сворачивания полипептидных цепей, будет иметь место также и процесс боковой агрегации развернутых цепей в пачки.

Необходимо отметить, что при малом переносе белка, т. е. когда концентрация белка в катодной и анодной камерах мала, преобладают пачечные структуры, построенные из нескольких развернутых цепей, так как в данном случае вероятнее всего будет происходить процесс боковой агрегации цепей в пачки. При большом увеличении переноса белка через мембрны, например, вследствие добавления уксусной кислоты к диализуемому эдестину, преобладающими структурами являются большие глобулы, возникающие в результате быстрой агрегации нескольких полипептидных

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

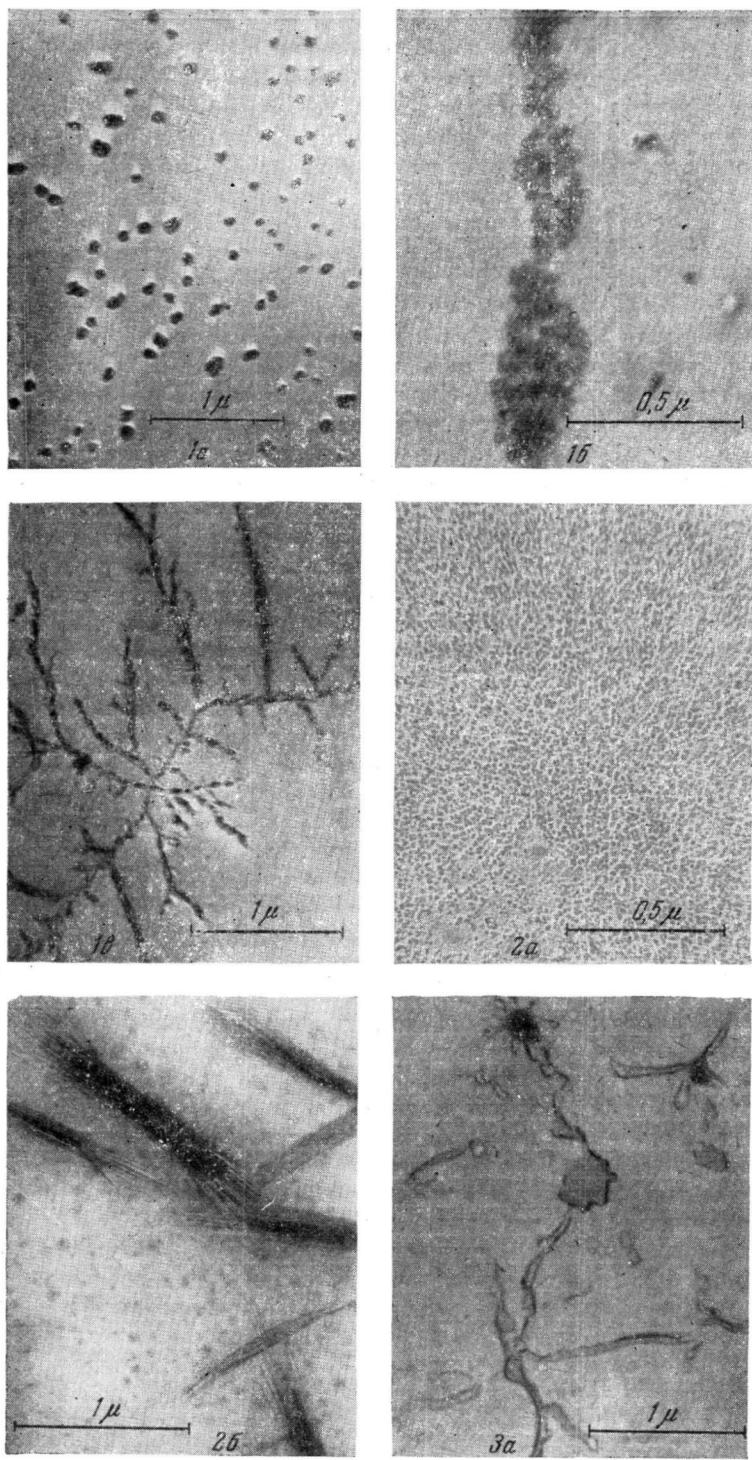


Рис. 1. Структура исходного белка эдестина:  
а — глобулы; б, в — сложные образования из глобул

Рис. 2. Структурные образования в эдестине из средней камеры  
во время и после электродиализа:  
а — глобулярные структуры; б — упорядоченные фибрillярные образования

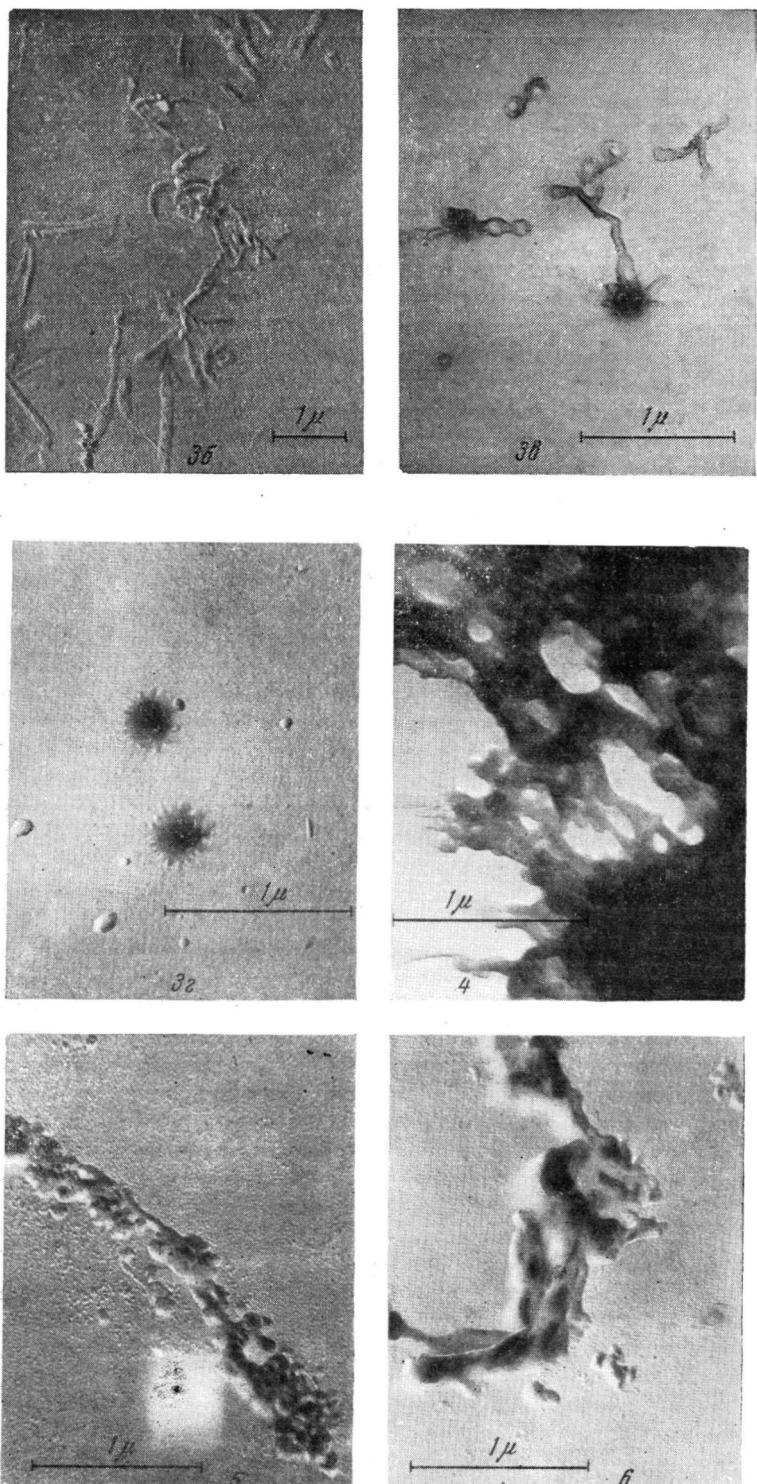


Рис. 3. Структурные образования в эдестине, прошедшем через мембранны в анодную и катодную камеры:  
а — плоскости и ленты (см. стр. 330); б — ленточные структуры; в и г— глобулоподобные образования из лент и плоскостей

Рис. 4. Структурные образования в эдестине после диспергирования его мочевины при электродиализе

Рис. 5, 6. Структурные образования в эдестине, возникающие под действием ультразвука

цепей и самопроизвольного сворачивания. Для эдестина, прошедшего через мембрану как в анодную, так и в катодную камеры, хорошо выраженных фибрillлярных структур обнаружить не удалось. Были замечены фибрillоподобные образования в виде плоскостей и лент (рис. 3, а), иногда очень отчетливых (рис. 3, б). Эти ленты и плоскости агрегируют друг с другом, затем, сворачиваясь, дают образования внешне сходные с глобулярными структурами. На рис. 3, в и 3, г очень хорошо видно, что эти структуры образованы из лент и плоскостей.

Действие исследованных химических добавок сводится главным образом к лучшему диспергированию исходной структуры белка на структурные единицы и ускорению, таким образом, переноса. Действие мочевины при электродиализе, очевидно, также сводится к лучшему диспергированию исходного белка на отдельные очень подвижные частицы и быстрому их разворачиванию, что влечет за собой увеличение переноса белка через мембрану.

Почти полное прекращение переноса белка через 20—30 мин. после начала электродиализа, вероятно, наступает в результате того, что эдестин, как было указано выше, выпадает в осадок. Это интересное явление, по-видимому, связано с изменением конформации цепей и не связано с наличием каких-либо примесей в эдестине, так как наблюдаемая при электродиализе в растворах мочевины коагуляция белка отсутствует в случае проведения электродиализа в водном растворе. Разворачивание цепей при электродиализе под воздействием мочевины происходит очень быстро. Даже частичное разворачивание (при значительной концентрации белка) приводит к освобождению большого количества ранее компенсированных внутримолекулярных связей. В результате сильного теперь уже межмолекулярного взаимодействия происходит агрегация цепей, а затем их сворачивание вместе в большие глобулярные образования, после слияния которых образуются большие агрегаты (рис. 4). Очевидно, процесс сворачивания и слияния частиц идет очень быстро, и поэтому нам не удалось обнаружить разворачивание как промежуточную стадию.

При исследовании процессов структурообразования эдестина после разрушения его структур под действием ультразвука удалось наблюдать на электронномикроскопических снимках подобные же глобулярные образования, состоящие из нескольких свернутых цепей, а также крупные агрегаты, возникающие в результате слияния этих глобулярных образований друг с другом (рис. 5, б). Таким образом, действие ультразвука на белок, т. е. механическое диспергирование также приводит к изменению конформации белковых молекул, как и химическое диспергирование. Последующий процесс структурообразования происходит аналогичным образом.

### Выводы

1. В настоящей работе было исследовано явление переноса глобулярного белка эдестина и изучено действие различных химических добавок (органических кислот, поверхностноактивных веществ, детергентов) на перенос белка. Установлено, что все они заметно увеличивают перенос.

2. Изучен процесс структурообразования, происходящий после разрушения белковой структуры на отдельные структурные единицы при электродиализе.

3. Исследовано явление химического диспергирования исходного эдестина мочевиной при электродиализе. Сделано предположение, что явление коагуляции белка при электродиализе в растворах мочевины связано с конформационными изменениями, и изучен процесс структурообразования после действия мочевины.

4. Изучено действие ультразвука на эдестин. При исследовании механического диспергирования белка было сделано предположение, что в дан-

ном случае также имеет место изменение конформации цепей — разворачивание молекул белка, последующая их агрегация и сворачивание. Исследование процесса разрушения исходной структуры эдестина при электродиализе, ультразвуком и химическими реагентами и последующее изучение процесса структурообразования, протекающего в разрушенном белке, показало, что необходимым условием получения новых упорядоченных структур является хорошее диспергирование исходного белка, т. е. разрушение его структуры на самые мелкие структурные элементы, из которых затем строятся новые упорядоченные структуры. Характер образующихся структур при этом не зависит от метода, которым производилось диспергирование — при помощи электродиализа, ультразвука или химических реагентов.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
28 I 1961

#### ЛИТЕРАТУРА

1. З. А. Капралова, С. Я. Мирлина, П. В. Козлов, В. А. Каргин, Л. А. Попова, Высокомолек. соед., 4, 321, 1962.
2. А. Н. Белозерский, Н. И. Прокуляков, Практическое руководство по биохимии растений, 1951, стр. 147.

#### STRUCTURAL TRANSFORMATIONS IN GLOBULAR PROTEINS

*Z. A. Kapralova, S. Ya. Mirlina, P. V. Kozlov, V. A. Kargin,  
V. K. Khokhlova*

#### S u m m a r y

The transfer of the globular protein edestin and the effect of various chemical additives (organic acids, surface active compounds, detergents) on this phenomenon have been investigated. All the above compounds have been found to augment the transfer. The structuration process taking place after breakdown of the protein structure into the separate elements during electrodialysis was studied. The chemical breakdown of edestin by urea during electrodialysis was also investigated. It was suggested that protein coagulation during electrodialysis in urea solutions is associated with conformational changes. A study was made of the structuration process following the action of urea. Investigation was also made of the effect of ultrasonic waves on edestin. Here also conformational changes were assumed to take place, namely uncoiling of the protein molecules, their subsequent aggregation and then coiling. From the study of the structural breakdown of edestin by electrodialysis, ultrasonic waves and chemical agents and of the subsequent structuration process it was concluded that breakdown of the initial protein to the smallest elements is a necessary condition for the formation of a new, highly ordered structure. The nature of the structure is independent of the mode of breakdown, whether by electrodialysis, ultrasonic waves, or chemical reagents.