

УДК 541.64:532.77:543.422.23

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ЖЕЛАТИНЫ МЕТОДОМ ЯМР
ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ*Нарышкина Е. П., Волков В. Я., Долинный А. И.,
Измайлова В. Н.*

Методом ЯМР высокого разрешения изучена кинетика образования коллагеноподобной спиралы в водных растворах желатины, инициируемая скачкообразным охлаждением образцов от 50 до 4–37°. При этом наблюдали уменьшение интенсивности линий без изменения в их ширине и в химических сдвигах. Характер уменьшения интенсивности во времени подобен для всех линий спектра, что свидетельствует, по-видимому, о равноправном участии всех аминокислотных остатков белковой молекулы в образовании коллагеноподобной спиралы.

Известно, что при охлаждении водных растворов желатины происходят процессы, связанные с восстановлением во времени структуры тройной коллагеноподобной спиралы [1, 2].

Один из методов, обладающий богатыми потенциальными возможностями при изучении таких процессов,— метод ЯМР высокого разрешения. В частности, этот метод позволяет оценить подвижность протонов отдельных функциональных групп. Поэтому интересно проследить за поведением отдельных аминокислотных остатков белковой молекулы в процессе конформационного перехода.

В работе использовали фракцию обессоленной желатины из костей крупного рогатого скота производства Казанского фотожелатинового завода с $M \approx 7 \cdot 10^4$ [3]. Белок фракционировали этиловым спиртом методом дробного осаждения. С помощью ГПХ на Сефадекс G-150 показано, что этот метод фракционирования позволяет в значительной мере избавиться от низкомолекулярных фракций.

Растворы желатины готовили по стандартной методике [4].

Исследовали растворы желатины в D_2O (99,8%). Для уменьшения содержания H_2O в исследуемых образцах белок люффильно высушивали из D_2O после выдерживания растворов в течение 1 сут при температуре 25°.

Протонные спектры ЯМР высокого разрешения снимали на спектрометре, работающем на частоте 270 МГц. Спектр получали накоплением 100 спадов индуцированных сигналов с последующим применением фурье-преобразования.

Исследовали изменение во времени спектров ЯМР высокого разрешения при охлаждении растворов желатины в D_2O концентрации 2, 5 и 10 кг/м³. Растворы предварительно нагревали в течение 5 мин при температуре 50°, затем охлаждали в течение 30–40 с и помещали в датчик ЯМР-спектрометра, где определенную температуру поддерживали с отклонениями до ±1°. Измерения проводили при температурах 4, 7, 10, 15, 20, 25 и 37°. Первый спектр снимали через 2–2,5 мин после начала охлаждения. Кинетику процесса образования коллагеноподобной спиралы при охлаждении растворов желатины исследовали с использованием автоматической программы для измерения времен спин-решеточной релаксации T_1 отдельных линий спектра, модифицированной для быстрого получения и запоминания спектров.

В качестве примера на рис. 1 приведен ЯМР-спектр высокого разрешения раствора желатины в D_2O концентрации 5 кг/м³ при 50°. При температурах выше 35° желатина находится в состоянии клубка [1]; это и отражает ее спектр, который характеризуется достаточно хорошим разрешением и узкой шириной линий ЯМР. Из известных величин химических сдвигов различных типов протонов аминокислот [5] отдельные линии спектра отнесены к определенным аминокислотным остаткам белковой молекулы. Идентификация линий спектра дается в таблице. Наблюдаемое соотношение их хорошо согласуется с аминокислотным составом желатины [3]. Наша идентификация линий в основном соответствует идентификации, приведенной в работах [6, 7].

На рис. 2 представлена кинетика изменения интенсивности I_i отдельных линий спектра для раствора желатины в D_2O . При температуре 37° (рис. 2, a) никаких изменений в спектрах белка во времени не наблюда-

ли. Изменения, наблюдаемые во времени в спектрах белка при понижении температуры до более низких значений (рис. 2, б), сводятся главным образом к уменьшению интенсивности линий. Причем при переходе к более низким температурам скорость уменьшения интенсивности линий возрастает. Изменений в ширине линий и в химических сдвигах не наблюдали. Интересно отметить, что характер уменьшения интенсивности во времени одинаков для всех линий спектра. Это позволяет высказать предположение, что все аминокислотные остатки принимают равноправное участие в образовании коллагеноподобной спирали. Подобный характер изменений

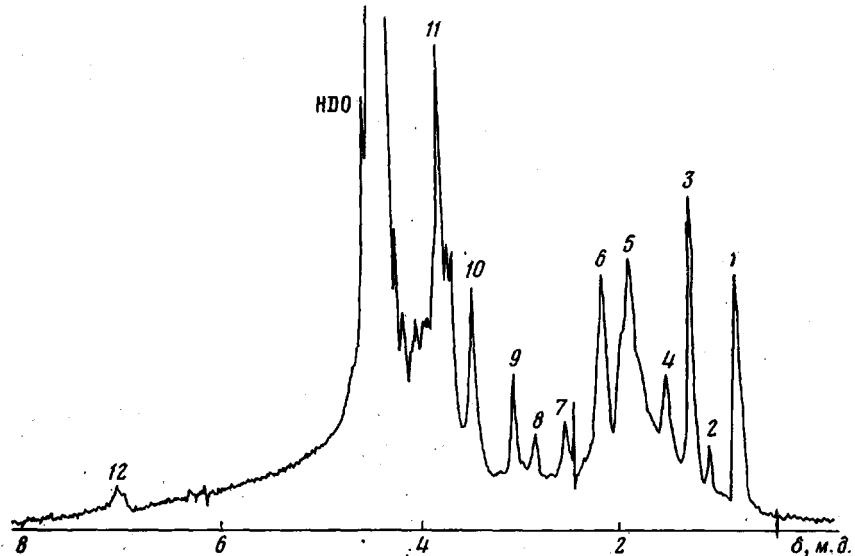


Рис. 1. Спектр ЯМР высокого разрешения раствора обессоленной желатины в D_2O ($pD = 5, 0, 500$ сканов, время одного прохождения $0,851$ с.). Здесь и на рис. 2, 3 цифры у кривых соответствуют номерам линий в таблице

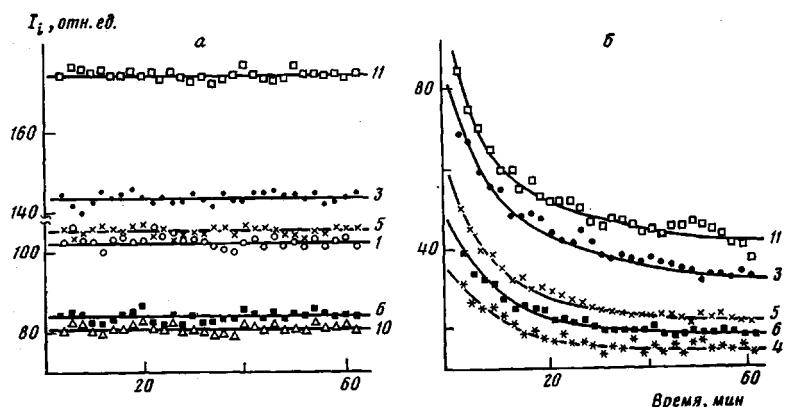


Рис. 2. Изменение интенсивности линий во времени в спектрах ЯМР высокого разрешения раствора желатины в D_2O концентрации $5 \text{ кг}/\text{м}^3$ при 37 (а) и 4° (б)

спектров белков во времени наблюдали Финер с сотр. [7], исследуя растворы α -желатины с $M = (1,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$ в D_2O (99,8%) концентрации 2 и $5 \text{ кг}/\text{м}^3$.

Начальную кинетику образования коллагеноподобной спирали исследовали в течение первого часа протекания процесса. Кинетические параметры рассчитывали с помощью ЭВМ, при этом зависимость интенсивности отдельных линий во времени интерполировали функцией

$$f(\tau) = \ln I_i = C_{1i} + C_{2i}\tau + C_{3i}\tau^2,$$

где C_{1i} , C_{2i} , C_{3i} — некоторые постоянные. Для расчета кинетических па-

**Идентификация линий в спектре ЯМР и кинетические параметры перехода
клубок – коллагеноподобная спираль в растворах желатины**

Линия, №	δ м. д.*	Аминокислота	Тип протонов	$-E_a$, кДж/моль	n
1	0,93	Валин, лейцин, изолей- дин	γ -, δ -CH ₃	76,6	0,96
2	1,22	Треонин	γ -CH ₃	79,6	1,07
3	1,41	Аланин	CH ₃	77,5	1,15
4	1,65	Аргинин	β -, γ -CH ₂		
5	2,01	Пролин	β -, γ -CH ₂	67,0	1,06
6	2,30	Глутаминовая	β -, γ -CH ₂	52,8	1,22
7	2,70	Аспарагиновая	β -CH ₂	59,5	0,94
8	2,99	Лизин	ϵ -CH ₂	84,2	–
9	3,20	Аргинин	δ -CH ₂	75,8	–
10	3,62	Пролин	δ -CH ₂	69,1	–
11	3,94	Глицин	α -CH	55,7	1,07
12	7,20	Фенилаланин	Ароматические C-2, C-6	69,1	1,14

* Химические сдвиги при 50° приведены относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силикаптан-5-сульфонат натрия.

метров использовали начальные скорости уменьшения интенсивности линий V_0 , соответствующие величине производной от функции I_t в момент времени $t \rightarrow 0$.

Порядок реакции образования коллагеноподобной спирали определяли по углу наклона прямой в координатах $\lg V_0 - \lg c$. При этом использовали

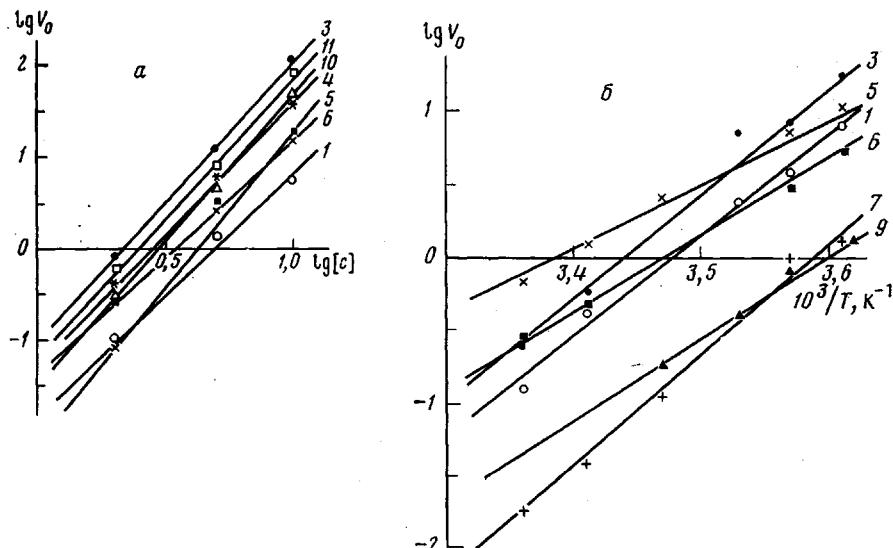


Рис. 3. Концентрационная (при 10°) (а) и температурная (при концентрации 5 кг/м³) (б) зависимости начальной скорости образования коллагеноподобной спирали в растворах желатины в D₂O

данные измерений для растворов желатины в D₂O концентраций 2, 5 и 10 кг/м³ при температуре 10°. На рис. 3 представлена зависимость от концентрации начальной скорости уменьшения интенсивности для ряда линий спектра. Порядок реакции рассчитывали как $n = \Delta(\lg V_0)/(\Delta \lg c)$. Результаты исследований, представленные в таблице, показывают, что усредненная по всем линиям величина порядка реакции равна $n = 1,09 \pm 0,14$ при 10°. Этот результат согласуется с величиной, определенной Финером с сотр. [7]: $n = 0,80 \pm 0,14$.

Харрингтон и Рао [8] изучали кинетику изменений, происходящих в одноцепных коллагеноподобных полипептидах, с помощью оптического вращения и измерений ММ. Они считают, что процесс денатурации является кинетическим процессом первого порядка, т. е. происходит внутри-

молекулярно, но накладывают ограничение на величину концентрации белка в системе, ниже которой $n=1$. Эта лимитирующая концентрация определяется температурой и концентрацией белка. Как правило, процесс образования коллагеноподобной спирали протекает на уровне одной полипептидной цепи, если концентрация достаточно низка ($c \leq 0,1 \text{ кг}/\text{м}^3$) и температура достаточно высока. Во всех остальных случаях величина порядка реакции составляла $n=2,0 \pm 0,15$. Близкую величину ($n \approx 2,3$) для водного раствора желатины концентрации $2,5 \text{ кг}/\text{м}^3$ при температуре 6° и в изоэлектрическом состоянии ($4,9-5,0$) приводит автор работы [9]. Порядок реакции в водном растворе желатины, определенный в работе [10] при изучении зависимости начальной скорости нарастания оптического вращения от концентрации по методике, описанной в работе [11], составляет величину $1,2-1,4$. Несколько заниженная по сравнению с большинством данных литературы величина порядка реакции, определенная в работе [7], объясняется, по-видимому, тем, что промежуток времени между охлаждением образцов и началом накопления первого спектра довольно велик (20 мин и более).

На рис. 3, б представлена температурная зависимость начальной скорости образования коллагеноподобной спирали в растворе желатины в D_2O концентрации $5 \text{ кг}/\text{м}^3$. Характерной особенностью перехода клубок — спираль в изученной системе является отрицательная температурная зависимость скорости данного перехода. Значение энергии активации E_a , вычисленное по наклону прямой в координатах $\lg V_0 - 1/T$, равно $-69,7 \pm 10,5 \text{ кДж}/\text{моль}$. Величина E_a образования коллагеноподобной спирали, определенная в работе [10] из измерений удельного оптического вращения, составляет $69,1 \text{ кДж}/\text{моль}$. Значения E_a отдельных линий спектра для раствора с концентрацией $5 \text{ кг}/\text{м}^3$ приведены в таблице. Интересно, что несколько меньшие, чем остальные, величины энергии активации имеют линии 5 и 10, относящиеся к пролиновому остатку. Это согласуется с существующим мнением, что активный комплекс (зародыш спирали) образуется в результате сближения областей макромолекулы, богатых гидрофобными аминокислотными остатками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейс А. Макромолекулярная химия желатина. М.: Пищевая пром-сть, 1971, с. 66.
2. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. М.: Наука, 1974, с. 66.
3. Долинный А. И. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1978, с. 51.
4. Леб Ж. Белки и теория коллоидных явлений. М.: Гизлэгпром, 1933, с. 52.
5. McDonald C. C., Phillips W. D. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 6, p. 1513.
6. Rose P., Gross S. J. Photogr. Sci., 1975, v. 23, № 2, p. 59.
7. Finer E. G., Franks F., Phillips M. C., Suggett A. Biopolymers, 1975, v. 14, p. 1995.
8. Harrington W. F., Rao N. V. Biochemistry, 1970, v. 9, № 19, p. 3714.
9. Мералов В. П. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1965, с. 72.
10. Долинный А. И., Измайлова В. Н. Высокомолек. соед. Б., 1978, т. 20, № 1, с. 39.
11. Piez K. A., Sherman M. R. Biochemistry, 1970, v. 9, № 21, p. 4134.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Всесоюзный научно-исследовательский
институт прикладной микробиологии

Поступила в редакцию
26.V.1981

STUDY OF CONFORMATIONAL TRANSFORMATIONS IN AQUEOUS SOLUTIONS OF GELATIN BY HIGH-RESOLUTION NMR METHOD

*Naryshkina Ye. P., Volkov V. Ya., Dolinnyi A. I.,
Izmailova V. N.*

Summary

The kinetics of the formation of collagen-like helix in aqueous solutions of gelatin initiated by sharp cooling of samples from 50° to $4-37^\circ$ has been studied by high-resolution NMR method. The decrease of intensity of lines without the change of their width and chemical shifts was observed. The character of the decrease of intensity with time is the same for all lines of the spectrum, this fact proves apparently the equal participation of all aminoacidic residues of the protein molecule in the formation of the collagen-like helix.