

В. А. КУЗНЕЦОВ

**О ПРИРОДЕ ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИХ ВОЛН БЕЛКОВ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 IV 1970)

Известно, что при полярографировании белков в присутствии солей кобальта возникают каталитические волны восстановления водорода (1). Предполагается, что за их появление ответственны образующиеся комплексы кобальта с сульфгидрильными группами белков (1-3). Характерной особенностью полярографических волн белка является их двуступенчатость.

Таблица 1

$I/I_{\infty}$	Значения $C$ , $\mu\text{г/мл}$					
	1	2	5	10	20	40
0,25	22,0	26,9	29,2	30,9	31,1	—
0,31	—	32,3	36,4	38,0	34,4	—
0,44	—	47,2	59,3	61,2	58,3	56,6
0,50	—	—	68,0	79,4	72,3	61,0

Целым рядом экспериментов было показано, что высоты и соотношения ступеней зависят как от природы белка, так и от конформационного состояния (4). В настоящей работе проведена оценка основных факторов, которые определяют высоту каталитических волн в зависимости от природы белка и вскрыты некоторые детали механизма адсорбции белка на ртутном электроде.

Исследование проводилось на постоянной ртутной капле (электрод Кеммела), использовался осциллографический полярограф ЦЛА-02. Скорость развертки, в опытах 1 в/сек, поверхность ртутных капель  $1,62 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2$ . Выдавливание каждой новой капли производилось за время порядка 1 сек., так что накопление белка, длившееся десятки и сотни секунд, определялось в основном стационарным режимом адсорбции, устанавливающимся у электрода. В состав раствора, кроме белка, входили следующие ингредиенты:  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2 \cdot 4 \cdot 10^{-4}$  мол/л;  $0,1 \text{ N NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Опыт проводился в термостатированной ячейке ( $8^\circ$ ). После кратковременного продувания азотом выдавливалась очередная ртутная капля и через фиксируемое время (от 2 сек. до 15 мин.) производилось снятие полярограммы в диапазоне от  $-0,8$  до  $-1,9$  в. Полярограммы, получающиеся при увеличении времени накопления, представлены на рис. 1. Обе ступени каталитических волн растут до определенного предела. В координатах  $I - t^{1/2}$  в начале накопления получают прямые до величины  $I \approx 0,5 I_{\infty}$  (рис. 2). При увеличении концентрации белка время достижения того же уровня тока увеличивается, так что произведение  $Ct^{1/2}$  остается постоянным. В

1

Таблица 2

Белок	Мол. вес	$D \cdot 10^6$ , $\text{см}^2/\text{сек}$	$S$	$dI/dt^{1/2}$ , $\mu\text{A}/\text{сек}^{1/2}$	$i_M \cdot 10^6$ , $\mu\text{A}$	$i_S \cdot 10^6$ , $\mu\text{A}$	$I_{\infty}$ , $\mu\text{A}$	$\frac{I_{\infty} M}{S} \cdot 10^{-4}$ , $\mu\text{A} \cdot \text{г/моль}$	$\delta$ , А	$\tau^{1/2}$ , $\text{сек}^{1/2}$	$\frac{\tau^{1/2}}{M^{1/2}}$
Рибонуклеаза	13 700	1,02	8	3,13	3,9	0,49	18	3,10	4,7	—	—
Лизоцим	15 000	1,12	8	2,76	3,6	0,45	18,5	3,47	5,7	6,4	1,25
Химотрипсин	25 000	1,02	10	1,46	3,7	0,37	11	2,55	5,8	7,5	1,35
Сывороточный альбумин	69 000	0,60	35	2,43	20	0,57	17,5	3,56	4,1	7,9	1,24
Альдолаза	150 000	0,43	27	0,72	15	0,54	5,0	2,8	3,8	9,3	1,27
Каталаза	225 000	0,41	20	0,30	9,7	0,48	2,4	2,7	3,6	10,8	1,40
Цитохром С	12 400	1,30	2	0,12	0,12	0,06	0,6	0,37	—	—	—



табл. 1 представлены рассчитанные величины произведения  $Gt^{1/2}$  ( $\mu\text{г}/\text{мл}\cdot\text{сек}^{1/2}$ ) для нескольких концентраций белка (сывороточного альбумина) от 1 до 40  $\mu\text{г}/\text{мл}$  и на разных уровнях заполнения поверхности электрода белком. Сохранение постоянным этого произведения для каждого уровня заполнения свидетельствует о том, что лимитирующей стадией адсорбции белка на ртутном электроде является диффузия. Накопление белка на постоянной капле, когда адсорбция необратима, происходит по закону:

$$\Gamma = 1,13 CD^{1/2} t^{1/2}, \quad (1)$$

что соответствует интегралу потока белковых частиц к электроду за время  $t$  (°). Считая, что каталитический ток пропорционален количеству адсорбированного белка, получим характерную линейную зависимость каталитического тока от  $t^{1/2}$ .

Необратимость адсорбции белка на ртутном электроде следует, прежде всего, из того, что предельное значение каталитического тока для всех изученных концентраций белка при достаточно длительном накоплении было одинаковым. Кроме того, необратимость адсорбции белка была доказана дополнительно специальными опытами. После накопления белка на электроде последний вынимался из раствора, содержащего белок, и помещался в буферный раствор (0,1N  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), не содержащий ни белка, ни кобальта. Потенциал электрода при накоплении  $-0,8$  в, при выдержке же в буфере он варьировал от  $-0,8$  до  $-1,9$  в. Время выдержки в буфере от 2 сек. до 10 мин. После этого электрод помещался в третий раствор, содержащий соль кобальта в том же аммиачном буфере. Были зафиксированы полярографические волны, в точности соответствующие времени накопления, как в обычном опыте, без последующей обработки электрода после накопления. Заметное уменьшение каталитического тока в результате десорбции происходит только при потенциале  $-1,7$  в и выше (рис. 3).

Итак, адсорбция белков на ртутном электроде происходит весьма быстро и необратимо, так что лимитирующей стадией является диффузионный процесс. При больших степенях заполнения, когда наблюдаются отклонения от линейности в координатах  $I-t^{1/2}$ , начинают, вероятно, лимитировать собственно адсорбционные процессы.

Установление того факта, что лимитирующим процессом является диффузия, позволило нам рассчитать количество адсорбированного белка к каждому моменту времени в начальной области накопления по формуле (1). Коэффициенты диффузии изучаемых нами белков известны, так что, зная

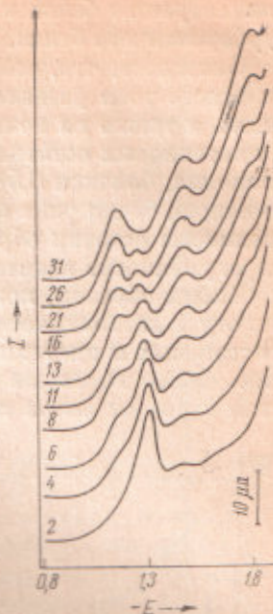


Рис. 1. Изменение полярограммы сывороточного альбумина во времени. Концентрация белка в растворе 10  $\mu\text{г}/\text{мл}$ , соли кобальта  $4 \cdot 10^{-4}$  моль/л, pH 9,3; 0,1 N аммиачный буфер; 8°. При кривых — время накопления белка (сек.). Максимум  $I$  каталитической волны расположен при  $-1,4$  в

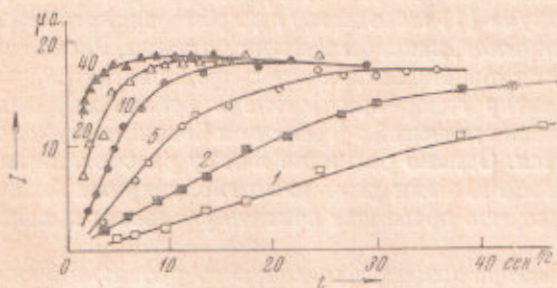


Рис. 2. Зависимость тока  $I$  ступени каталитической волны от  $t^{1/2}$  ( $t$  — время накопления) при концентрации сывороточного альбумина в растворе, указанной при каждой кривой ( $\mu\text{г}/\text{мл}$ )

Установление того факта, что лимитирующим процессом является диффузия, позволило нам рассчитать количество адсорбированного белка к каждому моменту времени в начальной области накопления по формуле (1). Коэффициенты диффузии изучаемых нами белков известны, так что, зная



концентрацию белка и время выдержки, можно рассчитать количество адсорбированного белка.

Оказалось, что, если пайденную из опыта величину  $I$  степени каталитического тока разделить на рассчитанное количество адсорбированного белка, а также на количество атомов серы, содержащихся в цистиновых и цистеиновых остатках этого белка, то для целого ряда белков получится величина, близкая  $0,5 \cdot 10^{-10}$  на атом S (табл. 2). Исключение составят, очевидно, белки типа цитохрома С, для которых заведомо известно, что цистеиновые остатки образуют эфирную связь с гем-группой и поэтому полярнографически неактивны.

Таким образом, можно считать, что главным фактором, определяющим высоту  $I$  каталитической волны, является абсолютное количество серы из цистиновых и цистеиновых остатков белка, адсорбированного на электроде. Небольшие вариации величины каталитического тока, приходящегося на атом серы, от белка к белку, возможно, связаны с некоторыми особенностями этих белков, имеющими второстепенное значение.

Предельная величина  $I$  степени каталитического тока определяется относительным содержанием серы в белке,  $S/M$ , где  $S$  — количество атомов серы цистиновых и цистеиновых остатков в молекуле, а  $M$  — молекулярный вес. Величина  $I_{\infty}M/S$ , представленная в табл. 2, для ряда белков достаточно хорошо сохраняется постоянной. Очевидно, что это может случиться только при условии участия всей серы белка в каталитическом процессе. Поскольку все изучаемые в настоящей работе белки имеют глобулярное строение, то для участия всех атомов серы в процессе необходимо расплющивание белка на поверхности электрода. В самом деле, из наших данных по накоплению можно произвести оценку толщины адсорбированной пленки белка. Расчет ее производился следующим образом. Экстраполяцией начального участка прямой в координатах  $I - t^{1/2}$  до  $I_{\infty}$  находилось время заполнения монослоя, которое было бы при условии диффузионного ограничения адсорбции вплоть до полного заполнения поверхности. Далее, рассчитывая по формуле (1) количество адсорбированного белка в монослое, находим толщину пленки. Расчет является оценочным, так как предполагается, что характер адсорбции (степень расплющивания) и каталитический эффект при больших степенях

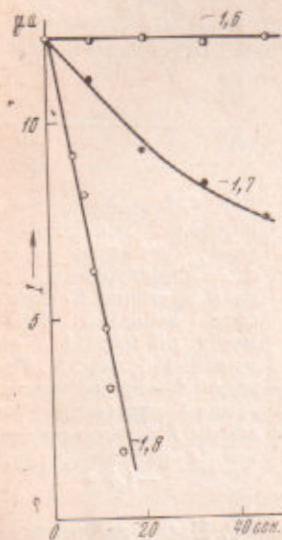


Рис. 3. Зависимость тока II степени каталитической волны сывороточного альбумина, предварительно адсорбированного на ртутной стационарной капле, от времени десорбции при потенциалах, указанных при кривых (в)

заполнения белка не изменяются. Однако различие между рассчитанными толщинами пленок (4—6 Å) и линейными размерами глобулярных белков (30—100 Å) достаточно большое, что позволяет считать реальным явление расплющивания.

Специальными опытами было показано, что скорость расплющивания достаточно велика и весь процесс заканчивается менее чем за 5 сек. В табл. 2 приведены известные из литературы молекулярные веса белков, их коэффициенты диффузии, число атомов серы цистиновых и цистеиновых остатков и полученные из опыта и рассчитанные величины:  $i_m$ ,  $i_s$  — каталитический ток, приходящийся на молекулу белка и на атом серы соответственно,  $\delta$  — толщина пленки адсорбированного белка,  $\tau$  — время заполнения монослоя, полученного экстраполяцией начального участка  $I(t^{1/2})$ -кривой.

Итак, появлению каталитических процессов предшествует необратимая



и быстрая адсорбция, сопровождающаяся поверхностной денатурацией его (такая адсорбция характерна, очевидно, лишь для монослой). В результате этого явления внутриглобулярные атомы серы приходят в контакт с электродом, где они способны образовать комплексы с восстанавливающимся кобальтом и дать каталитический эффект. В нашей работе (6) было показано, что другие функциональные группы, например, ε-аминогруппа лизина, не играют решающей роли в формировании каталитического центра восстановления водорода. Поэтому, возможно, получены такие простые соотношения для сильно отличающихся белков.

Для II каталитической волны получены аналогичные зависимости, свидетельствующие о расплющивании белков на ртутном электроде. Толщина пленки адсорбированного белка, рассчитанная по II волне, равна 6—8 Å. Двуступенчатость каталитической волны обусловлена, по-видимому, различным положением SH-групп в пленке расплющенного белка, например в гидрофильных и гидрофобных ее областях.

Итак, при одинаковых условиях полярографирования каталитические волны разных белков различаются главным образом за счет различного содержания серы, различной величины коэффициента диффузии и молекулярного веса. Полученные данные могут быть положены в основу методов определения этих величин, а также концентрации белка. В последнем столбце табл. 2 продемонстрирована, например, возможность определения молекулярного веса белков.

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

Поступило  
26 III 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> R. Vrđička, *Research*, **1**, 25 (1947). <sup>2</sup> M. Vřezina, *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, **24**, 4031 (1959). <sup>3</sup> M. Shinagawa, H. Nezu et al., *Adv. in Polarograph.*, **3**, 1142 (1960). <sup>4</sup> И. Д. Иванов, Е. Е. Рахлеева, *Полярография структуры и функции биополимеров*, «Наука», 1968, стр. 143, табл. 15. <sup>5</sup> И. М. Кольцов, Дж. Дж. Лингейн, *Полярография*, 1948, стр. 38. <sup>6</sup> Б. А. Кузнецов, М. И. Якушева, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1969, 2156.