

А. И. ШУЛЬМИНА, В. В. МОСОЛОВ

## АГРЕГАЦИЯ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА В КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ РАСТВОРАХ МОЧЕВИНЫ

(Представлено академиком А. С. Спириным 24 III 1971)

Мочевина нашла широкое применение в качестве агента, изменяющего конформацию белковых молекул (<sup>1-3</sup>), в связи с ее способностью разрывать водородные связи и ослаблять гидрофобные взаимодействия между неполярными боковыми цепями аминокислотных остатков. В последние годы мочевины, наряду с некоторыми другими веществами (гуанидин, HCl, додецилсульфат натрия), широко используется как средство, вызывающее диссоциацию сложных белковых молекул на протомеры (<sup>4</sup>).

Было показано (<sup>5, 6</sup>), что некоторые белки (сывороточный и яичный альбумин) способны образовывать гели в концентрированных растворах мочевины. Процесс гелеобразования в сильной степени зависит от pH, а также от концентрации белка и мочевины. По данным Мак Кензи и других (<sup>7, 8</sup>), яичный альбумин ведет себя в ультрацентрифуге как гетерогенное вещество в 7 М мочевины при pH 6,3 и 9,4, что может, по мнению авторов, свидетельствовать об ассоциации его молекул. В то же время Барк и Гринберг (<sup>9</sup>) и Ротен (<sup>10</sup>) не наблюдали изменений молекулярного веса яичного альбумина в 7 М мочевины.

Яичный альбумин, использованный в настоящей работе, — кристаллический препарат, полученный в лаборатории совместно с Ю. Н. Ильиной по методике, описанной Морроу (<sup>11</sup>). Растворы мочевины готовились растворением продажного препарата мочевины (ч. д. а.) в 0,2 М NaCl (pH растворов  $8,3 \pm 0,1$ ).

Фракционирование белка осуществляли с помощью метода гелевой фильтрации на колонках из сефадекса Г-100 размером 56 — 58 × 1,13 см. Скорость элюции составляла 10 — 15 мл/час при комнатной температуре без мочевины и 0,3 — 3,0 мл/час в присутствии 8 М мочевины. Свободный объем колонки, определенный с помощью синего декстрана (Blue Dextran 2000), равнялся 16,3 мл в 8 М мочевины и 18,3 мл в 0,2 М NaCl. На колонку наносили 1 мл белкового раствора, содержание белка в элюате определяли по методу Лоури в модификации Глязера и Клейна (<sup>12</sup>). В опытах по изучению влияния мочевины на белок свежеприготовленный раствор белка в 8 М мочевины немедленно наносили на колонку, уравновешенную раствором мочевины той же концентрации. Время контакта белка с мочевиной исчислялось с момента нанесения образца на колонку до момента элюции с колонки максимальной концентрации первого белкового компонента (фракция II).

В опытах на ультрацентрифуге раствор яичного альбумина в 8 М мочевины (9,1 мг/мл) выдерживали в течение 1 или 2 суток при комнатной температуре. Анализ образца проводили на аналитической ультрацентрифуге Спинко (модель Е) при температуре 20° и скорости вращения 56 100 об/мин. Контролем служил яичный альбумин в той же концентрации, растворенный в 0,2 М NaCl без мочевины.

В ультрацентрифуге проводили также опыты по денатурации яичного альбумина в присутствии  $\alpha$ -иодацетамида. Навеску  $\alpha$ -иодацетамида вносили в раствор мочевины в 0,2 М NaCl и затем смешивали с раствором

альбумина в 0,2 М NaCl с таким расчетом, чтобы конечная концентрация мочевины составляла 8 М и концентрация  $\alpha$ -иодацетамида 0,1 М.

На рис. 1 показаны результаты фракционирования яичного альбумина на колонке с сефадексом Г-100 в 0,2 М NaCl (рис. 1 а), а также при различном времени контакта белка с мочевиной (рис. 1 б, в). Как видно из

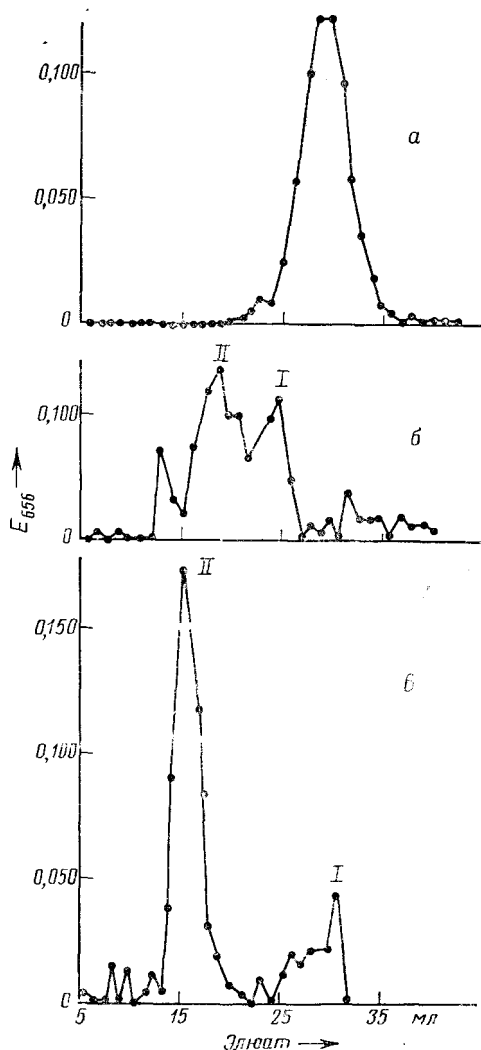


Рис. 1

Рис. 1. Кривые элюции яичного альбумина (0,45 мг) в 8 М мочевины ( $\mu = 0,2$ ). а — без мочевины, б и в — при времени контакта белка с мочевиной соответственно 9 и 21 час; I, II — фракции

Рис. 2. Гель-фильтрация высокомолекулярной фракции яичного альбумина, денатурированного 8 М мочевиной в течение 32 час. на сефадексе Г-200. Колонка: 1,01  $\times$  60,5 см. Элюирующий агент 0,2 М NaCl

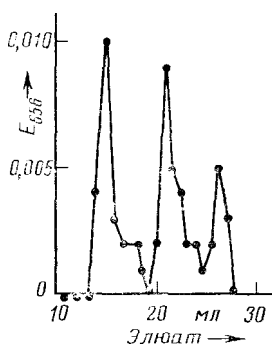


Рис. 2

денатурирующего агента (<sup>15</sup>). Молекулярный вес материала, содержащегося во фракции II, колеблется в пределах от 90 000 до 150 000.

Из рис. 1 б, в видно, что содержание фракции II возрастает с увеличением времени воздействия мочевины на альбумин. При более длительном времени контакта с мочевиной (32 часа) содержание фракции II достигает 87,5% и в дальнейшем остается постоянным. Содержание высокомолекулярной фракции зависит также от исходной концентрации белка. Так, повышение концентрации альбумина от 0,05 до 0,45% приводит

к увеличению содержания фракции II с 68 до 81% (при одинаковом времени инкубации с мочевиной, 14 час.).

Фракционирование высокомолекулярного материала на колонке с сефадексом Г-200 в 0,2 М NaCl (рис. 2) показало наличие в нем, наряду с димером белка, тетрамера и более высоких полимеров.

Результаты, полученные с помощью ультрацентрифуги, находятся в соответствии с данными, полученными методом гелевой фильтрации. Как

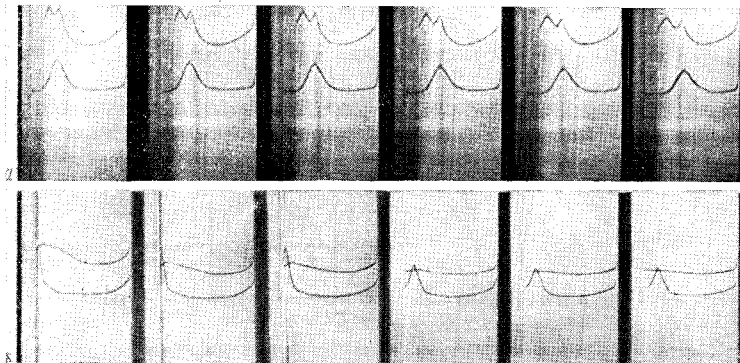


Рис. 3. Седиментограммы яичного альбумина. *a* — яичный альбумин, денатурированный 8 М мочевиной (вверху), и нативный яичный альбумин (внизу); *б* — яичный альбумин, денатурированный 8 М мочевиной без добавки  $\alpha$ -иодацетамида (вверху), и яичный альбумин, денатурированный 8 М мочевиной в присутствии 0,1 М  $\alpha$ -иодацетамида (внизу). Движение пиков слева направо. Съемка с интервалом 8 и 16 мин.

видно из рис. 3а, раствор белка в 8 М мочеvine содержит 2 компонента с константами седиментации 0,9 S и 1,9 S. Нативный яичный альбумин в 0,2 М NaCl имеет константу седиментации 3,5 S, что близко соответствует литературным данным (<sup>14</sup>).

Вышеприведенные результаты позволяют прийти к заключению, что яичный альбумин в щелочной зоне pH в присутствии высоких концентраций мочевины проявляет отчетливо выраженную тенденцию к агрегации.

Халвер (<sup>16</sup>) наблюдал уменьшение светорассеяния яичного альбумина, денатурированного 6 М мочевиной, в присутствии 0,02 М цистеина. Эти данные дают основания для предположения, что в процессе агрегации белка может играть существенную роль тиолдисульфидный обмен между сульфгидрильными и дисульфидными группами, содержащимися в различных молекулах белка\*. Однако Мак Кензи и др. (<sup>7,8</sup>) не обнаружили влияния цистеина и *n*-хлормеркурибензоата на процесс агрегации яичного альбумина в мочеvine.

В наших опытах денатурация яичного альбумина мочевиной проводилась в присутствии 0,1 М  $\alpha$ -иодацетамида с целью блокирования свободных SH-групп, содержащихся в белке. Результаты, приведенные на рис. 3 б, показывают, что белок, денатурированный 8 М мочевиной в присутствии  $\alpha$ -иодацетамида, ведет себя в ультрацентрифуге как монодисперсное вещество с константой седиментации 0,84 S, что близко к коэффициенту седиментации низкомолекулярного компонента в опыте без добавки алкилирующего агента (рис. 3 а).

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, показывают, что денатурация белка, содержащего свободные сульфгидрильные группы, в мочеvine в щелочной области pH может сопровождаться про-

\* В молекуле яичного альбумина содержится четыре-пять свободных SH-групп и одна дисульфидная связь (<sup>17</sup>).

цессом агрегации белковых молекул. Механизм агрегации, вероятно, включает образование дисульфидных мостиков между денатурированными белковыми молекулами в результате тиолдисульфидного обмена.

Как следует из полученных результатов, необходимо соблюдать осторожность при оценке молекулярных весов белковых субъединиц, полученных в результате диссоциации сложных белков или других белковых структур в растворах мочевины (а возможно, и других денатурирующих агентов), особенно, если эти белковые структуры содержат свободные сульфгидрильные группы.

Приносим благодарность Р. С. Шакулову за помощь, оказанную в проведении опытов на ультрацентрифуге.

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

Поступило  
19 III 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> М. Жоли, Физическая химия денатурации белков, М., 1968. <sup>2</sup> W. Bruning, A. Holtzer, J. Am. Chem. Soc., 83, 4865 (1961). <sup>3</sup> P. L. Whitney, C. Tanford, J. Biol. Chem., 237, 1735 (1962). <sup>4</sup> I. M. Klotz, N. R. Langerman, D. W. Darnall, Ann. Rev. Biochem., 39, 25 (1970). <sup>5</sup> F. G. Hopkins, Nature, 126, 328 (1930). <sup>6</sup> C. Huggins, D. F. Tapley, E. V. Jensen, Nature, 167, 592 (1951). <sup>7</sup> H. A. McKenzie, M. B. Smith, R. G. Wake, Nature, 176, 738 (1955). <sup>8</sup> H. A. McKenzie, M. B. Smith, R. G. Wake, Biochim. et biophys. acta, 69, 222 (1963). <sup>9</sup> N. F. Burk, D. M. Greenberg, J. Biol. Chem., 87, 197 (1930). <sup>10</sup> A. Rothen, Ann. N. Y. Acad. Sci., 43, 229 (1942). <sup>11</sup> Biochem. Labor. Methods, C. A. Morrow (Ed.), 1935, p. 90. <sup>12</sup> D. Gläser, K. Kleine, Die Pharmazie, 17, 32 (1962). <sup>13</sup> H. Determan, W. Michel, J. Chromatogr., 25, 303 (1966). <sup>14</sup> Р. Уорнер, В кн. Белки, 3, ИЛ, 1958, ч. 1, стр. 735. <sup>15</sup> Ю. Н. Ильина, А. И. Шульмина и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 608 (1969). <sup>16</sup> M. Halwer, J. Am. Chem. Soc., 76, 183 (1954). <sup>17</sup> R. Cecil, J. R. McPhee, Adv. in Protein Chem., 14, 256 (1959).