

УДК 577.15.037;541.138.3;541.183.3

БИОХИМИЯ

Б. А. КУЗНЕЦОВ, Г. П. ШУМАКОВИЧ

**О МЕХАНИЗМЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДВУХ СТУПЕНЕЙ
ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИХ ВОЛН БЕЛКОВ***(Представлено академиком А. С. Спириным 20 XII 1972)*

Полярографические каталитические волны белков, возникающие в присутствии солей кобальта (¹), как показано в работах (²⁻⁴), имеют сложный характер зависимости от природы белка, поскольку в значительной мере определяются предшествующими процессами поверхностной денатурации их на границе фаз электрод — вода. Методом осциллографической полярографии и по емкости двойного слоя показано, что на поверхности ртутного электрода происходит быстрое разворачивание или расплющивание глобул белка до толщины одной полипептидной цепи. Получающиеся пленки адсорбированного белка приблизительно одной толщины ($\sim 7 \text{ \AA}$) независимо от молекулярного веса и прочно адсорбированы. Большая скорость расплющивания глобулярных белков на ртутной поверхности объясняется не только большим поверхностным натяжением, но и участием ртути в химическом или электрохимическом в зависимости от потенциала электрода разрыве дисульфидных связей белка.

Важным и наиболее сложным вопросом в полярографии белков является выяснение природы двух ступеней каталитической волны, а также количественное описание разнообразных сложных зависимостей каталитических волн от температуры pH и т. д. Известно, что каждый белок имеет характерное соотношение двух ступеней и специфическое изменение их в зависимости от условий. В настоящей работе мы попытались найти, пока что качественно, те явления, которые могут быть в действительности ответственны за указанные свойства полярографических волн белка.

Были испробованы различные экспериментальные пути для выявления особенностей I и II каталитических волн. Наиболее подходящим оказался следующий. Известно, что белки содержат гидрофобные и гидрофильные аминокислотные остатки, группирующиеся таким образом, что в ядре глобулы сосредоточены главным образом гидрофобные остатки, а на поверхности преобладают гидрофильные. При образовании пленки на поверхности ртутного электрода после разворачивания и расплющивания глобул следует также ожидать образования неоднородных областей с различными свойствами. Под действием достаточно большого потенциала ($-1,7 \text{ в}$) гидрофобные и заряженные гидрофильные области будут десорбироваться и перестраиваться с различными скоростями. Так что если все различие каталитических волн I и II заключается в том, что цистеиновые остатки, ответственные за образование волн, располагаются в этих двух областях (^{2, 4}), то под действием потенциала должно происходить изменение соотношения I и II волны. Таким образом, в нашу задачу входило изучить действие на величину I и II каталитической волны предварительной выдержки электрода с адсорбированным на нем белком при достаточно высоких потенциалах. Действительно оказалось, что при наложении потенциала в начальные моменты происходят необратимые изменения в пленке адсорбированного белка, что подтвердилось в опытах с несколькими белками: бычьим

сывороточным альбумином (БСА), лизоцимом, рибонуклеазой, алкоголь-дегидрогеназой (АДГ).

Опыты проводились на стационарном ртутном электроде с поверхностью $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2$. Электрод помещался на 2 мин. в раствор белка

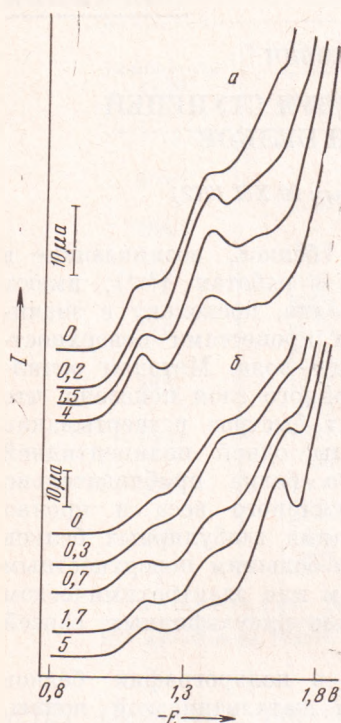


Рис. 1. Изменение полярограммы БСА (а) и лизоцима (б), предварительно адсорбированных на стационарном ртутном электроде, в зависимости от времени его выдержки, указанной при каждой полярограмме (в мин.), при потенциале $-1,7$ в. Максимум I каталитической волны расположен при $-1,4$ в, а II волны при $-1,6$ в

каталитических волн, однако при каждом данном потенциале ход со временем I и II волны не происходит симбатно. I волна сначала увеличивается, достигает максимума и уменьшается далее в результате, очевидно, десорбции. За тот же период, пока идет нарастание I волны, II волна резко падает до весьма низкого уровня. Это явление мы интерпретировали как результат перестройки определенных сегментов адсорбированного белка. Очевидно, процесс перестройки при потенциалах $-1,6 \div -1,7$ в происходит несколько быстрее, чем собственно десорбция. При увеличении потенциала скорость десорбции растет быстрее, чем скорость перестройки, что приводит к уменьшению и исчезновению максимума на I волне при $-1,8$ в и выше. Можно предположить, что резкое уменьшение II каталитической волны вызвано десорбцией отрицательно заряженных сегментов из гидрофильных зон пленки (изоэлектрическая точка БСА при pH 4,6), тогда небольшое распространение гидрофобных областей за счет дополнительного расплющивания и включения в двойной слой может объяснить подрастание I каталитической волны.

Характер изменения II каталитической волны лизоцима (см. рис. 2Б) резко отличается, а именно: при наложении потенциала $-1,6 \div -1,75$ в

(20 $\mu\text{г/мл}$) в 0,1 N аммиачном буфере pH 9,3 при потенциале $-0,8$ в. За это время практически образуется монослой адсорбированного белка (², ³). Далее электрод с адсорбированным на нем белком промывался в течение 10 сек. (в некоторых опытах 1,5 мин.) в 0,1 N аммиачном буфере pH 9,3 и затем переносился в ячейку, содержащую тот же буфер, где накладывался на фиксируемое время потенциал, контролируемый с помощью каломельного электрода сравнения и потенциометра ЛПУ-01. После переключения потенциала на $-0,8$ в электрод переносился в ячейку, содержащую $4 \cdot 10^{-4}$ М $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ в 0,1 N аммиачном буфере pH 9,3, и через 1 мин. выдержки в нем производилось снятие полярограммы на осциллографическом полярографе ЦЛА-02 ($V_0 = -0,8$ в, $V' = 1$ в/сек). Все растворы, в том числе промывной, деаэрировались азотом и находились при одной постоянной температуре 18° . После выполнения всех операций оставшийся на электроде и претерпевший изменения белок в присутствии соли кобальта генерирует каталитические волны восстановления водорода, которые мы наблюдаем. На рис. 1 представлены характерные полярограммы, получающиеся после выдержки электрода с адсорбированным белком при потенциале $-1,7$ в от 0 до 5 мин. На рис. 2 А можно проследить за изменением высоты I и II каталитической волны БСА в зависимости от времени при нескольких потенциалах. Увеличение потенциала ускоряет спад

она быстро вырастает до предела или проходит через максимум. Лизоцим в отличие от БСА при pH 9,3 имеет значительный положительный заряд (изоэлектрическая точка при pH 10,5—11). Возможно, поэтому в момент десорбции гидрофобных областей белковой пленки электростатическое поле задерживает вблизи электрода и дополнительно втягивает в двойной

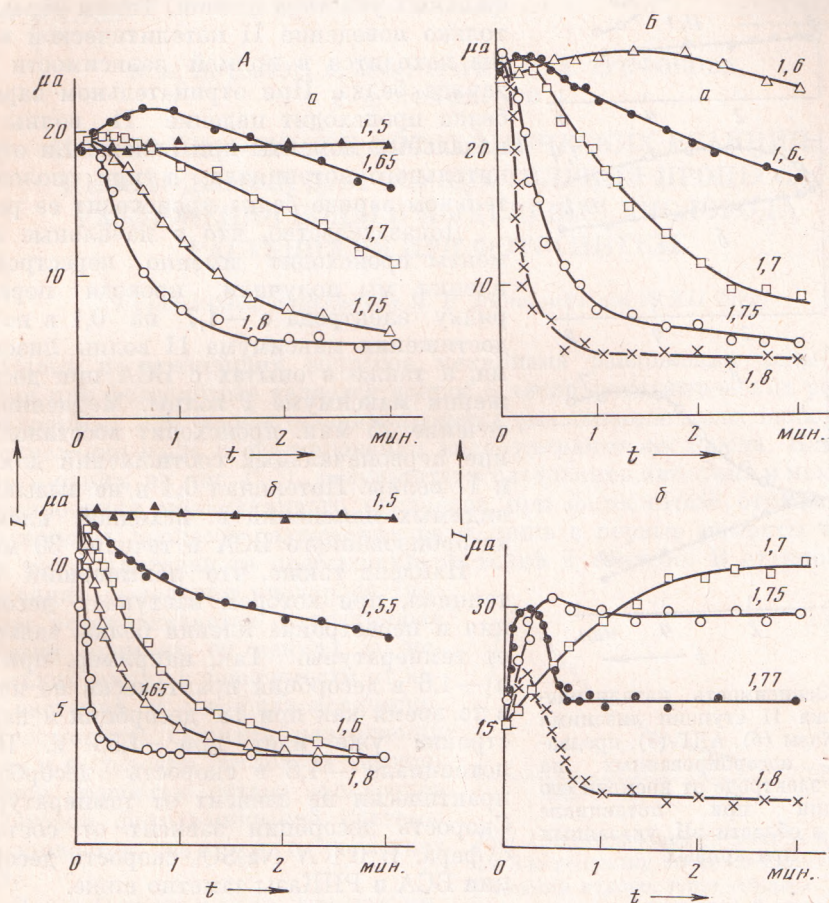


Рис. 2. Зависимость тока I ступени (а) и II ступени (б) каталитической волны БСА (А) и лизоцима (Б), адсорбированного на ртутном электроде, от времени его экспозиции при потенциалах, указанных при каждой кривой (в вольтах)

слой сегменты белка, имеющие положительный заряд. Это предположение легко было проверить, проводя десорбцию при pH с двух сторон относительно изоэлектрической точки, когда происходит перезарядка молекул белка, а также наложением положительного потенциала на электрод. Такие опыты были проведены с лизоцимом, РНКазой и АДГ. Чистота ферментов определялась с помощью гельфильтрации на сефадексах и по их ферментативной активности. Последняя была во всех случаях более 90% от максимальной, известной в литературе. БСА не использовался в этих опытах, поскольку при $\text{pH} < 4$ эксперименту мешает восстанавливающийся водород. На рис. 3 представлен ход II каталитической волны для трех названных ферментов при pH с двух сторон относительно изоэлектрической точки (РНКазы при pH 9,45; АДГ при pH 8,7—9,3 (⁵)). При положительном заряде белка наблюдается рост II каталитической волны, а при отрицательном всегда наблюдается ее спад. I волна независимо от заряда белка и pH уменьшается сразу или после небольшого и непродолжительного подъема. Падение I каталитической

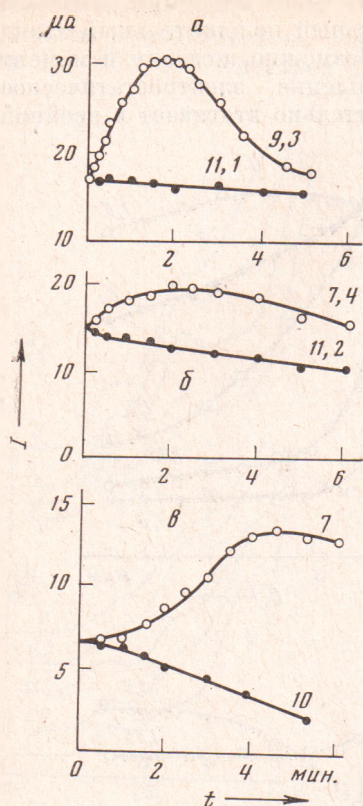


Рис. 3. Зависимость каталитического тока II ступени лизоцима (а), РНКазы (б), АДГ (в), предварительно адсорбированных на ртутном электроде от времени его экспозиции при потенциале $-1,65$ в в области pH, указанных при кривых

Итак, изложенные явления подтверждают наше предположение, что II волна вызывается SH-группами, расположенными в заряженных, и следовательно, гидрофильных областях пленки, а I волна вызывается SH-группами, расположенными в незаряженных, очевидно, гидрофобных областях.

Полученные нами данные позволяют по-новому рассмотреть многочисленные явления в полярографии белков и, прежде всего, объяснить многообразие видов полярограмм в зависимости от природы белка и соотношений I и II волн, наличие максимумов и спадов, температурную зависимость и т. д. Очевидно, наиболее реалистично искать объяснения указанных закономерностей в свойствах пленок адсорбированного белка десорбироваться и претерпевать различные перестройки в зависимости от заряда белка, его аминокислотного состава и последовательности, потенциала электрода и строения двойного слоя.

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

Поступило
11 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Brdička, Research, 1, 25 (1947).
- ² Б. А. Кузнецов, ДАН, 195, № 4, 986 (1970).
- ³ Б. А. Кузнецов, Г. П. Шумакович, В сборн. Адсорбция и двойной электрической слой в электрохимии, «Наука», 1972.
- ⁴ Б. А. Кузнецов, In: Biological Aspects of Electrochemistry. Proc. of the 1 Intern. Symp., Rome, 1971, p. 381.
- ⁵ U. M. Lutstorff, P. M. Schürch, Europ. J. Biochem., 17, № 3, 497 (1970).