



УДК 577.112.088.3

© 1991 г.

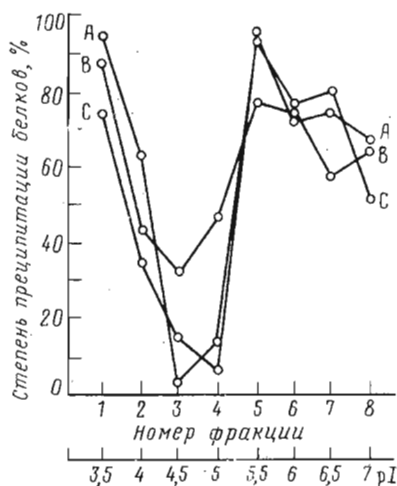
*Т. А. Муранова, И. Г. Швыркова***АНОМАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ, ИМЕЮЩИХ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ТОЧКУ ОКОЛО 4,5, ПРИ ОСАЖДЕНИИ ИХ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ***Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
г. Пушкино Московской обл., 142292*

Проведены сравнительные эксперименты по осаждению белков с различными изоэлектрическими точками ацетоном, метанолом, изопропиловым спиртом. Установлено, что для белков, имеющих изоэлектрическую точку 4, 5 или близкую к этому, степень преципитации при прочих равных условиях значительно ниже, чем для белков, имеющих другие значения pI .

Количественный или качественный анализ разбавленных растворов белков часто бывает затруднителен для экспериментаторов вследствие недостаточной чувствительности методов, используемых для этих целей. Одним из способов решения проблемы является концентрирование имеющихся растворов путем осаждения белков с последующим растворением образца в нужном объеме. Эта процедура бывает полезна также, когда исследуемые растворы содержат большое количество солей, детергентов, липидов и т. д., затрудняющих анализ. Известно несколько способов осаждения белков из водных растворов [1—7]. Один из наиболее распространенных основан на использовании для этих целей трихлоруксусной кислоты [3, 4, 6]. В экспериментальной практике широко применяется также осаждение белков смешивающимися с водой органическими растворителями, такими, например, как метанол, ацетон, изопропанол, *n*-пропанол [2, 5, 7]. Последний прием исключает опасность разрыва лабильных связей в белках, возникающую при использовании трихлоруксусной кислоты. Органические растворители изменяют диэлектрическую проницаемость среды, снижают способность заряженных гидрофильных молекул белка к сольватации. Это приводит к агрегации молекул белка и их осаждению, аналогичному осаждению белков в изоэлектрической точке. Замечено, что вблизи изоэлектрической точки осаждение происходит при более низкой концентрации органического растворителя. Однако использовать эту закономерность не представляется возможным, так как выделение белков обычно проводят в буферных системах, обеспечивающих их хорошую растворимость.

Нами исследована зависимость степени преципитации белков от значения их изоэлектрической точки при осаждении такими органическими растворителями, как ацетон, метанол, изопропанол. Для эксперимента были использованы фракции сыворотки крови собаки, содержащие наборы белков с определенными значениями pI (рисунок). Соответствующие фракции (1—8) сыворотки крови собаки получали путем диализа сыворотки против 0,05 М натрий-ацетатного буфера при восьми различных значениях pH (от 3,5 до 7, с интервалом 0,5 ед. pH). Белки, входящие в состав фракций, не идентифицировали. Полученные осадки растворяли в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (pH 8,5). Все эксперименты проводили в одинаковых условиях (концентрация белка в растворе 0,4 мг/мл, 4° С, постоянное объемное соотношение раствора белка и конкретного растворителя) (см. «Экспериментальную часть»). Для белков, содержащихся во фракциях 3

Зависимость степени преципитации сывороточных белков от их pI при осаждении из 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 8,5) метанолом (А), ацетоном (В), изопропанолом (С). По оси ординат указан процент осаждения белков по отношению к общему количеству белка в исходном растворе. По оси абсцисс указаны номера фракций и значения pI белков, входящих в состав фракций 1—8, полученных при изоэлектрическом осаждении белков из сыворотки крови. Концентрация белков в каждой фракции 0,4 мг/мл. Кривые построены по средним значениям для трех измерений



и 4, имеющих pI в районе 4,5—5,0, наблюдалось резкое уменьшение степени преципитации по сравнению с другими фракциями при использовании всех трех растворителей (рисунок).

Мы провели также эксперименты по осаждению индивидуальных белков, имеющих различные изоэлектрические точки (таблица). Для осаждения использовали растворы белков в 0,01 М натрий-фосфатном буфере (рН 8,5) и 0,05 М натрий-ацетатном буфере (рН 7,0). Для обеих серий экспериментов, как и в случае сывороточных препаратов, аномально низкий уровень преципитации наблюдается для белков, имеющих изоэлектрическую точку около 4,5.

Основываясь на полученных нами результатах, можно сделать предположение об аномальном поведении некоторых белков, имеющих изоэлектрическую точку около 4,5, в смесях органических растворителей (ацетон, метанол, изопропанол) с водой. Повышенная растворимость подобных белков в таких смесях приводит к очень низкому уровню их преципитации в присутствии вышеперечисленных органических растворителей. Это необходимо принимать во внимание при использовании этих растворителей для осаждения белков с целью количественного и качественного анализа белковых растворов.

Экспериментальная часть

В работе использованы белки: ферритин из селезенки лошади (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), pI 4,27 [8], тироглобулин из щитовидной железы быка (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), pI 4,5, рибосомный белок *E. coli* L7/L12, pI 4,6 [9], бычий сывороточный альбумин (Serva,

Данные по осаждению белков из 0,01 М натрий-фосфатного буфера, рН 8,5 (А) и 0,05 М натрий-ацетатного буфера, рН 7,0 (Б) ацетоном, метанолом и изопропанолом (в процентах по отношению к исходному количеству белка. Приведены средние для трех измерений значения)

Белок	pI	Ацетон		Метанол		Изопропанол	
		А	Б	А	Б	А	Б
Ферритин	4,27 [8]	83	87	59	72	69	90
Тироглобулин	4,5	6	24	5	4	12	5
Рибосомный белок <i>E. coli</i> L7/L12	4,6 [9]	34	47	35	27	26	44
Бычий сывороточный альбумин	5,18 [10, 11]	90	79	78	90	84	85
Каталаза	5,2	73	74	55	48	57	75
Альбумин из сыворотки крови человека	5,85 [11]	89	73	83	71	93	84

ФРГ), pI 5,18 [10, 11], альбумин из сыворотки крови человека (Reanal, Венгрия), pI 5,85 [11], каталаза из печени быка (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), pI 5,2. Для осаждения белков применяли метанол (х. ч., Союзреактив) после предварительной очистки перегонкой, изопропиловый спирт (ос. ч., Союзреактив), ацетон (ч., ГДР).

Фракции сывороточных белков получали изоэлектрическим осаждением из сыворотки крови собаки, диализуя 3 мл порции сыворотки против 2 л 0,05 М натрий-ацетатного буфера с соответствующими значениями pH от 3,5 до 7 с интервалами 0,5 ед. pH при 4°C в течение ночи. Осадки отделяли центрифугированием при 18 000g в течение 20 мин и растворяли в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 8,5, при концентрации белка 0,4 мг/мл.

Осаждение белков. После добавления растворителя раствор белка энергично перемешивали и инкубировали 15 мин при 4°C. Использовали следующие объемные соотношения раствор белка — растворитель: для ацетона — 1 : 2, для метанола — 1 : 9, для изопропанола — 1 : 5. Выпавшие осадки отделяли центрифугированием и растворяли в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 8,5. Концентрацию белков определяли методом М. Брэдфорд [12].

Значения pI для тироглобулина из щитовидной железы свиньи и каталазы из печени быка определяли методом изоэлектрофокусирования на приборе Multifor 2117 (ЛКВ, Швеция) с использованием стандартных пластин с градиентом pH 3,5—9,5, согласно рекомендациям фирмы.

Авторы выражают благодарность К. Ю. Резникову (ФИБХ АН СССР) за помощь при определении значений изоэлектрических точек для тироглобулина из щитовидной железы свиньи и каталазы из печени быка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. М.: Мир, 1989. С. 50.
2. Скоунс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. М.: Мир, 1985. С. 72—81.
3. Schaffner W., Weissmann C. // *Anal. Biochem.* 1973. V. 56. № 2. P. 502—514.
4. Bensadoun A., Weinstein D. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 70. № 1. P. 241—250.
5. Hudhin R. L., Pricer W. E., Ashwell G. // *J. Biol. Chem.* 1974, V. 249, № 17. P. 5536—5543.
6. Retz K. C., Steele W. J. // *Anal. Biochem.* 1977. V. 79. № 1. P. 457—461.
7. Wessel D., Flugge U. I. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138, № 1. P. 141—143.
8. Crichton R. R. // *New Engl. J. Med.* 1971. V. 284. № 25. P. 1413.
9. Kaltschmidt E. // *Anal. Biochem.* 1971. V. 43. № 1. P. 25—31.
10. Yang C., Langer R. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 147. № 1. P. 148—155.
11. Edsall J. T. // *The Proteins* / Eds Neurath H., Bailey E. Acad. Press, 1953. P. 549.
12. Bradford M. M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.

Поступила в редакцию
27.III.1990

После доработки
27.II.1991

T. A. MURANOVA, I. G. SHVYRKOVA

THE ANOMALOUS BEHAVIOUR OF SOME PROTEINS WITH ISOELECTRIC POINT ABOUT 4.5 UPON PRECIPITATION WITH ORGANIC SOLVENTS

Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Proteins with pI of about 4.5 are shown to have much lower levels of precipitation from aqueous solutions with acetone, methanol or isopropanol than proteins with other pI values.