БЕЛКИ

Под редакцией
Г. Нейрата и К. Бэйли

III

ЧАСТЬ I

БИОХИМИЯ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

И * Л

Издательство
иностранной
литературы

*

THE PROTEINS

CHEMISTRY, BIOLOGICAL ACTIVITY AND METHODS

Edited by

HANS NEURATH
Department of Biochemistry
University of Washington
Seattle, Washington

KENNETH BAILEY
Department of Biochemistry
University of Cambridge
Cambridge, England

VOLUME I, PART B
VOLUME II, PARTS A, B

ACADEMIC PRESS INC., PUBLISHERS
NEW YORK, 1953, 1954

БЕЛКИ

Под редакцией
Г. НЕЙРАТА и К. БЭЙЛИ

ТОМ
III

ЧАСТЬ I

БИОХИМИЯ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

Перевод с английского
Д. А. ГИНЗБУРГ, Р. А. ДУЛИЦКОЙ, Л. Г. ОХНЯНСКОЙ,
Ц. Д. ОСИПЕНКО, К. И. РЯБОВА

Под редакцией
канд. хим. наук В. П. МИШИНА

ИЗДАТЕЛЬСТВО
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
Москва—1958

АННОТАЦИЯ

Книга представляет собой фундаментальный труд, написанный виднейшими учеными—специалистами в области биохимии различных белковых веществ. Она содержит обстоятельный обзор современных данных по биохимии нуклеопротеидов и вирусов, белков растений и семян, белков молока и яиц, белков плазмы крови и лимфы, а также данных по биохимии белков, обладающих иммунологическими, токсическими и гормональными свойствами.

Предназначена для широкого круга научных работников и преподавателей высшей школы, работающих в области физико-химии, биохимии и технологии белковых веществ.

Редакция литературы по химии
Заведующий редакцией профессор О. А. РЕУТОВ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предлагаемый вниманию читателей III том монографии «Белки» представляет собой перевод двух частей—А и В—тома II и главы 11 части В тома I американского издания «The Proteins. Chemistry, biological activity, and methods», написанных известными специалистами в области физико-химии и биохимии белковых веществ, под общей редакцией Г. Нейрата и К. Бэйли. Общая характеристика этого капитального труда дана в предисловиях к I и II томам советского издания, вышедших из печати в 1956 г. В III том, состоящий из двух частей, вошли обстоятельные и систематические обзоры важнейших классов белковых веществ. Наряду с методами получения и физико-химическими свойствами белков рассмотрены их биологические функции и обмен в растительных и животных организмах. В соответствии с содержанием этого тома обе части его выходят в советском издании под общим заглавием—«Биохимия белковых веществ». Для большей логической и тематической последовательности излагаемого материала порядок глав по сравнению с оригиналом несколько изменен.

В конце книги приводится список дополнительной литературы, включающий наиболее важные обзорные статьи и монографии советских авторов за последние 8 лет, а также некоторые работы зарубежных исследователей, опубликованные после выхода из печати оригинала этой книги (1954 г.). В американском издании не нашли отражения многочисленные работы советских исследователей, однако после выхода в свет советских реферативных журналов «Химия» и «Биологическая химия» мы считали нецелесообразным помещать в список оригинальные работы, тем более что многие из них освещены в обзорных статьях.

По новизне и богатству собранного материала эта книга, несомненно, будет весьма полезной для широкого круга исследова-

телей и практиков, работающих в области физико-химии, биохимии и технологии белков.

Перевод отдельных глав 1-й части III тома выполнен: I—Ц. Д. Осипенко, II, III, IV—К. И. Рябовым, V, VII, X—канд. мед. наук Л. Г. Охнянской, VI, XI—канд. хим. наук Р. А. Дулицкой, VIII, IX—Д. А. Гинзбург.

В. П. Мишин.

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ

Р. Портер

R. R. Porter, «The Relation of Chemical Structure to the Biological Activity of the Proteins» (vol. I, part B, pp. 973—1015)

1. ВВЕДЕНИЕ

Связь между биологической активностью и структурой белков является проблемой, важность которой для понимания биохимических процессов достаточно очевидна. Вероятно также и то, что наши современные знания о деталях механизма биологической активности и наши представления о строении белка весьма ограниченны, и удовлетворительно объяснить биологическую активность особенностями химического строения пока не удается. Однако в этом направлении проведено много исследований с целью разрешить эту проблему с различных точек зрения. В данной главе сделана попытка суммировать результаты этих работ, расположив их в соответствии с применяемыми методами, и изложить только те обобщения, которые основываются на хорошо проверенных данных.

Антитела, антигены, ферменты, некоторые гормоны, токсины, вирусы и гены являются простыми или сложными белками. Кроме всех этих веществ, биологическая роль которых давно установлена, в последнее время были открыты белки, обладающие в биологических системах высокой специфической активностью, биологическое значение которых еще не выяснено. Примерами таких белков могут служить ингибиторы трипсина, найденные в таких различных объектах, как бобы сои и лимская фасоль, яичный белок и поджелудочная железа. Способность авидина связывать биотин, а кональбумина—железо также может служить примером специфической активности белков, биологическое значение которой до сих пор не выяснено. Общей характерной чертой всех этих активных белков является высокая степень их специфичности.

Двадцать лет назад еще велись споры о том, какую роль играют белки в биологических системах. Многие крупнейшие биохимики, особенно в Германии, полагали, что белки—это инертные коллоидные носители низкомолекулярных активных соединений, которые не являются ни белками, ни углеводами. В 1926 г. была получена в кристаллическом виде уреаза [1], в 1927 г. —инсулин [2], в 1930 г.—пепсин [3], в 1931 г.—трипсин [4] и в 1933 г.—химотрипсин [5]. Все эти вещества оказались простыми белками,

которые теряли биологическую активность при гидролизе, денатурации или химических превращениях. Это было весьма существенным подтверждением той точки зрения, что сами белки обладают биологической активностью. Однако в то время не было уверенности в достаточной чистоте исследуемого белка. С уточнением методов аминокислотного анализа оказалось возможным определить аминокислотный состав некоторых активных белков с точностью до 1—2%, и предположение о том, что биологическая активность может быть свойством самой белковой молекулы, стало наиболее вероятным. Многие активные белки связаны с нуклеиновой кислотой, гемом, флавином и другими соединениями, причем проявляемая ими активность обусловлена всем комплексом, и при распаде последнего ни одна из его составных частей не обладает сколько-нибудь значительной активностью. Большие успехи достигнуты в изучении той роли, которую играют небелковые компоненты, особенно в гемопротеинах. Однако о роли белковой части гемопротеинов известно не больше, а может быть и меньше, чем о роли простых белков, например некоторых ферментов и антител, в проявляемой ими биологической активности. В этой главе изложен материал, главным образом освещающий функции белковой части молекулы.

Большинство белков обладает четко выраженной антигенной активностью, и в то же время они могут выполнять и другие биологические функции. Каждое из этих свойств обусловлено различными структурными частями молекулы белка. Так, антитела против полисахарида пневмококков, введенные в организмы других видов, вызывают образование анти-антител. При этом несущественно, применялась ли для инъекции или для испытания иммунная сыворотка, собственно антитело или специфический преципитат. Отсюда следует, что часть поверхности молекул, определяющая их свойства как антител, должна отличаться от части, обусловливающей антигенную специфичность. При соединении фермента с гомологичным антиферментом действие первого может тормозиться или оставаться неизменным, откуда следует, что в некоторых случаях ферментативная и антигенная активности зависят от различных частей белковой молекулы. На основании изложенных фактов, а также многих других, которые будут рассмотрены далее, установлено, что в проявлении специфической биологической активности участвует только часть белковой молекулы, называемая активным центром. В некоторых случаях, например в случае уреазы, молекулярный вес которой приблизительно в 10 000 раз больше молекулярного веса субстрата, активный центр или центры должны быть относительно небольшими. Из данных, полученных при изучении ингибиторного действия ионов серебра на уреазу [6], следует, что на молекулу фермента приходится не более 3—4 активных центров, причем весьма значительная часть белка непосредственно не участвует в реакции между субстратом и ферментом. Из этого не сле-

дует, однако, что активные части сохранят свою активность, если их отделить от всей остальной части молекулы, так как особенность структуры активного центра может зависеть от первичных или вторичных валентностей, которыми они связаны со всей молекулой.

Современные представления о механизме действия активных белков основываются на том предположении, что белок и другой взаимодействующий компонент образуют соединение, однако доказательством, подтверждающим эту точку зрения, являются результаты изучения *in vitro* только двух типов биологической активности—ферментативной и иммунологической. Существенная особенность такого взаимодействия—его обратимость и зависимость от относительных концентраций реагирующих веществ. Это было экспериментально показано на примере ферментов и антител. Механизм действия токсинов и гормонов не установлен, так как неизвестен второй компонент реакции.

Попытки установить связь между каким-либо видом биологической активности и общими химическими или физическими свойствами белка оказались безуспешными. Так, молекулы фермента могут быть любой величины, начиная от рибонуклеазы с молекулярным весом 15 000 и кончая уреазой с молекулярным весом около 600 000. Гормоны и токсины также характеризуются большим диапазоном размеров частиц, и даже антитела, в отношении которых можно было бы ожидать большой однородности молекул, поскольку все они являются сывороточными глобулинами, имеют молекулярные веса от 150 000 до 900 000. Только по отношению к антигенам предполагалось, что их биологическая активность находится в зависимости от величины молекул, но и это предположение не подтвердилось. Теперь, когда доказана способность белковых молекул к диссоциации и ассоциации [7], данным о величине молекулярных весов придают меньшее значение.

Форма молекулы белка также не является критерием биологической активности. Большинство активных белков относится к глобулярным белкам, однако миозин—типичный фибриллярный белок—обладает ферментативным действием и может специфически соединяться с актином; обе эти реакции связаны с мышечным сокращением.

По электрофоретической подвижности при различных условиях можно обнаружить видовые различия в таких идентичных во всех других отношениях белках, как гемоглобины [8] или цитохромы [9]. Однако эти свойства, зависящие главным образом от величины общего поверхностного заряда частицы белка при данных условиях, никогда не связывали ни с антигенной специфичностью одной и той же группы белков, полученных из различных видов животных, ни с активностью какого-либо другого типа. Велик [10] использовал электрофоретическую подвижность для определения специфического связывания фосфатных ионов дегидразой триозофосфата. Он

нашел, что константа диссоциации слишком мала, чтобы ее можно было объяснить на основе простого электростатического притяжения, подразумевая, что при этом происходит связывание с ферментом субстрата, являющегося фосфорным эфиром.

Оказалось, что даже растворимость не является свойством, необходимым для проявления биологической активности белков. Некоторые ферментные системы, например цитохромоксидаза, которую можно обнаружить в суспензиях клеточных остатков, редко получают в виде истинных растворов [11]. При осторожной денатурации спиртом уреаза может переходить в нерастворимое состояние, но у нее сохраняется ферментативная активность [12]. Нерастворимые специфические антигены могут также хорошо соединяться с соответствующими им антителами. Поскольку все эти явления относятся, по-видимому, к поверхностным реакциям, то в вышеописанных наблюдениях нет ничего неожиданного. Таким образом, ни общие химические свойства белков, ни их элементарный и аминокислотный состав не могут объяснить наличие или отсутствие биологической активности.

Из вышеизложенного следует, что для решения вопроса о структурах, обусловливающих активность, нужны данные иного характера. Очевидно, что должен быть детально известен ряд факторов: какова природа изучаемой активности, проявляется ли она в одной или в нескольких стадиях и каковы промежуточные соединения, если они существуют. Для получения данных о функции активных центров необходимо найти точную оценку специфичности. Наконец, могут оказаться необходимыми исчерпывающие сведения о пространственной структуре белка, хотя в некоторых случаях вполне достаточно иметь более ограниченные данные, относящиеся к составу и структуре активных центров и к их взаимному влиянию. Значительное количество таких данных уже имеется, хотя ни в одном случае не использовались все возможные средства исследования для одного и того же белка. Исследования в этой области позволяют сделать лишь весьма общие заключения, поэтому целесообразнее, по-видимому, обсуждать эту неразрешенную еще проблему в соответствии с применяемыми методами исследования, а не по результатам и выводам, полученным для белков, обладающих специфическими типами биологической активности.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

А. Активность и общие структурные особенности

При изучении белковых структур и многих свойств белков постоянно возникают трудности, обусловленные отсутствием точного критерия их чистоты. В настоящее время существует четыре общепризнанных метода определения чистоты белка: по растворимости,

скорости седиментации в ультрацентрифуге, электрофоретической подвижности и по антигенным свойствам. Основой для более точного определения чистоты белка послужат методы хроматографии и противоточного распределения, которые, по-видимому, разовьются в надлежащем направлении в ближайшем будущем. Однако при любой работе с белками нельзя быть уверенным в том, что с улучшением техники эксперимента и с развитием новых методов не может неожиданно обнаружиться, что какой-либо белок, ранее считавшийся однородным, окажется неоднородным. Это заставит пересмотреть интерпретацию результатов, полученных в предыдущих работах.

1) АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ

Только в последние годы благодаря быстрому развитию микроаналитических методов появилась возможность получить полное представление об аминокислотном составе белков. Однако истекший отрезок времени еще недостаточен для накопления необходимого количества данных для установления связи с биологической активностью белков. Особенно много полезных сведений можно получить из сравнительных исследований, в частности из определения аминокислотного состава фермента, выделенного из самых различных источников, или из аналитического сравнения родственных ферментов, полученных от одинаковых видов животных.

В настоящее время проведен полный анализ некоторых ферментов, гормонов, токсинов и вирусов. Аналитические данные, относящиеся к этим биологически активным белкам, а также ко многим другим, приведены в т. I, гл. III. Из сказанного выше следует, что нет каких-либо специфических особенностей в аминокислотном составе, которые можно было бы связать с определенным видом биологической активности. Определение аминокислотного состава антител показало, что их специфичность также непосредственно не связана с аналитическими данными. Бейли [13] выразил аминокислотный состав 20 белков в форме гистограмм, которые выявляют как общие черты, свойственные разным белкам, так и особенности каждого из них (см. также т. I, гл. III). Это дало возможность сделать предварительный вывод, что в случае сложных растворимых белков имеются высший и низший пределы как для общего заряда, так и для числа полярных групп в их частицах. Верхний предел указывает, что в отношении специфического взаимодействия липофильные боковые цепи могут иметь не менее определяющее значение, чем гидрофильные боковые цепи. Существует также довольно очевидная зависимость между высоким содержанием цистина и устойчивостью белка ко всем видам денатурации, за исключением щелочной. Инсулин, рибонуклеаза и лизоцим, содержащие 12% [14], 7% [15] и 8% [16] цистина соответственно, являются относительно устойчи-

выми белками. Это не кажется неожиданным, если учесть, что дисульфидная связь представляет собой единственную известную ковалентную связь, соединяющую пептидные цепи, и что она устойчива по отношению к большинству реагентов, под действием которых происходит денатурация, за исключением щелочи. Инсулин, рибонуклеаза и лизоцим теряют биологическую активность при восстановлении дисульфидных связей.

Предполагалось, что для проявления антигенных свойств белка необходимо наличие в его составе ароматических аминокислот. Так, желатина, которая не обладает антигенными свойствами, приобретает их при соединении с *о*-β-глюкозидотирозином [17]. Однако инсулин, который, несмотря на высокое содержание тирозина, обладает очень слабыми антигенными свойствами, тоже становится более активным при аналогичной обработке [17]; при взаимодействии же желатины с фенилизотиоцианатом антигенная активность ее не возрастает [18]. Полисахариды, не содержащие аминокислотных остатков, могут быть сильными антигенами для некоторых видов животных; с другой стороны, белковая фракция вируса мозаики желтой репы, аминокислотный состав которой неизвестен, не обладает антигенными свойствами и только после сочетания с нуклеиновой кислотой становится чрезвычайно сильным антигеном [19]. Все вышеприведенные примеры показывают, что антигенные свойства не имеют прямого отношения к аминокислотному составу.

Таблица 1

СОСТАВ (в %) ГЛОБУЛИНОВ СЕМЯН [20]

Аминокислота	Эдестин	Тыква	Кабачок	Арбуз	Огурец	Табак
Аргинин	16,7	16,2	16,2	17,9	15,8	16,1
Гистидин	2,52	2,22	2,18	2,20	2,28	2,22
Лизин	2,35	2,76	3,01	2,93	2,94	1,58
Треонин	3,14	2,58	2,77	2,95	3,59	4,17
Лейцин	7,4	8,0	8,0	7,5	9,1	10,5
Изолейцин	6,2	5,1	5,5	5,7	5,5	6,3
Валин	6,6	6,5	6,5	6,4	7,0	6,7
Тирозин	4,34	4,36	4,36	4,57	4,60	4,07
Триптофан	1,23	1,74	1,74	1,86	1,93	1,47
Фенилаланин	5,45	7,2	6,8	7,7	6,5	5,7
Метионин	2,22	2,31	2,31	2,77	2,51	2,18
Цистин/2	1,32	1,12	1,11	1,10	1,06	1,11
Общая сера	0,88	0,99	0,95	1,06	1,04	1,03
Недостающая сера	0,05	0,19	0,15	0,17	0,22	0,26

Из определений аминокислотного состава выяснилось, что данные белки, выделенные из различных источников, обладают постоянным составом. Вследствие недостатка сведений, относящихся к другим белкам, в табл. 1 в качестве примера приведены данные для белков, не обладающих какой-либо определенной биологической активностью, а именно для глобулинов семян как близких, так и отдаленных видов растений (см. также т. I, гл. III). Постоянство состава обнаружено также при анализе фиброинов шелка [21, 22] и коллагенов [23] (см. табл. 1 [20]).

На основании более ранних анализов гемоглобина, выделенного из ряда объектов, был сделан вывод, что содержание основных аминокислот в гемоглобине исключительно постоянно, а содержание цистина значительно колеблется [24, 25]. Однако приводимые там же данные для гемоглобина лошади вдвое меньше более достоверных значений, полученных позднее [26], поэтому указанные колебания в содержании цистина вызывают сомнения.

Нет уверенности и в том, что очищенные препараты одного белка, выделенные из одних и тех же объектов, всегда обладают постоянным составом. Так, аминокислотный состав яичного белка может зависеть от диеты кур [27], хотя не было доказано, что состав очищенного белка при этом меняется. Небольшие, но существенные различия были обнаружены в составе кристаллического β-лактоглобулина, полученного в одной лаборатории одними и теми же методами, но с интервалом в несколько лет [28].

Найт [29] провел интересное исследование аминокислотного состава ряда растительных вирусов, родственных вирусу мозаики табака. Полученные результаты приведены в табл. 2. На основании этих данных автор сделал вывод о существовании зависимости между биологическим родством и содержанием аминокислот. Так, наиболее близкие пары штаммов TMV и M, GA и YA (см. табл. 2) химически идентичны (в пределах ошибок определений применяемыми методами). Вирус ребристости травы—штамм, биологически наиболее далекий от вируса мозаики табака, значительно отличается по аминокислотному составу. Это наводит на мысль о том, что аминокислотный состав белка может быть связан с его биологической специфичностью, но более определенная интерпретация этого факта затруднительна, так как эти вирусы являются нуклеопротеидами и штаммы могут отличаться структурой нуклеиновых кислот. Известно, что другие растительные вирусы [30] характеризуются именно различием в нуклеиновых кислотах и что это различие может играть более важную роль, чем аминокислотный состав.

С рассмотренными результатами не согласуются, однако, аналитические данные, полученные для антител. К сожалению, мы не располагаем достаточно полными данными об аминокислотном составе антител, полученными при помощи наиболее современных методов, но на основании имеющегося материала можно предполо-

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА [29] (в %)

Аминокислота	Штаммы							
	TMV	M	J14D1	GA	YA	HR	CV3	CV4
Аланин	5,1	5,2	4,8	5,1	5,1	**6,4**		**6,1**
Аргинин	9,8	9,9	10,0	**11,1**	**11,2**	**9,**	**,**	**9,3**
Аспарагиновая кислота	13,5	13,5	13,4	13,7	13,8	**12,6**		13,1
Цистеин	0,69	0,67	0,64	0,60	0,60	0,70	0	0
Цистин	**0**		**0**		**0**	**0**		**0**
Глутаминовая кислота	11,3	11,5	**,4**	11,5	11,3	**15,5**	**6,4**	**6,5**
Глицин	1,9	1,7	1,9	1,9	1,8	**1,3**	**1,2**	**1,5**
Гистидин	0	0	0	0	0	**0,72**	0	0
Изолейцин	6,6	6,7	6,6	**5,7**	**5,7**	**5,9**	**5,4**	**4,6**
Лейцин	9,3	9,3	**9,4**	9,2	9,4	9,0	9,3	9,4
Лизин	**1,47**	1,49	**1,95**	1,45	**1,47**	1,51	**2,55**	**2,43**
Метионин	0	0	0	0	0	**2,2**	0	0
Фенилаланин	8,4	8,4	8,4	8,3	8,4	**5,4**	**9,9**	**9,8**
Пролин	5,8	5,9	5,5	5,8	5,7	5,5		5,7
Серин	7,2	7,0	6,8	7,0	7,1	**5,7**	**9,3**	**9,4**
Треонин	9,9	10,1	10,0	10,4	10,1	**8,2**	**6,9**	**7,0**
Триптофан	2,1	2,2	2,2	2,1	2,1	**1,4**	**0,5**	**0,5**
Тирозин	3,8	3,8	3,9	3,7	3,7	**6,8**	3,8	3,7
Валин	9,2	9,0	8,9	8,8	9,1	**6,2**	8,8	8,9

Примечание. Чтобы облегчить сравнение, величины, значительно отличающиеся от данных для TMV, выделены жирным шрифтом.

жить, что очищенные антитела, вероятно, аналитически нельзя отличить от инертных глобулинов, с которыми они связаны [31—34]. Было бы крайне интересно провести полный анализ тщательно очищенных антител, выделенных из одного и того же объекта. Однако в настоящее время предполагают, что глобулины могут обладать специфичностью различного рода при почти постоянном аминокислотном составе. Довольно близкие результаты получены при исследовании лихениформинов [35], которые являются антибиотиками-полипептидами, вырабатываемыми в определенных условиях *Bacillus licheniformins*. Так, лихениформины *a* и *b* имеют одинаковые молекулярные веса (около 4000) и одинаковый (в пре-

делах ошибок опыта) аминокислотный состав, но они значительно отличаются по антибиотической активности и по токсичности, как это установлено в опытах с мышами. Было высказано предположение, что различие в активности может зависеть от характера чередования аминокислотных остатков, однако данные, подтверждающие это предположение, пока не получены.

Из результатов всех этих аналитических исследований можно сделать вывод, что в настоящее время еще нет достаточных доказательств прямой связи специфичности или механизма активности белков с их общим аминокислотным составом. Данные, противоречащие этому положению, носят случайный характер.

2) ДЕНАТУРАЦИЯ И ЗНАЧЕНИЕ КОНФИГУРАЦИИ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Известно, что сравнительно мягкая обработка белков в растворах вызывает значительное изменение их растворимости и других физических свойств. Эти изменения обычно необратимы и связаны с потерей специфической биологической активности, которой могли обладать эти белки до обработки. Это явление, названное денатурацией, ограничивается только такими изменениями белка, при которых не происходит заметного разрыва или образования ковалентных связей (см. т. II, гл. VI). Отсюда следует, что потеря биологической активности и изменение физических свойств белков обусловлены изменениями вторичных валентных сил, таких, как водородные и солевые связи. Предполагается, что эти связи в значительной степени определяют нативную конфигурацию белка [36, 36а]. На этом основании было сделано заключение, что активность белка должна зависеть от особой конфигурации части или всех полипептидных цепей, из которых построена его молекула, и от распределения в них электрических зарядов. Остается неясным, одна или несколько из многих возможных конфигураций белка определяют его биологическую активность. Поскольку денатурация — общее явление, то, очевидно, в большинстве случаев активные формы белка относительно неустойчивы. Степень неустойчивости белков, или способность их денатурироваться, варьирует в широких пределах. Устойчивые белки, например инсулин и рибонуклеаза, не изменяются в растворах сильных кислот, а также в концентрированных растворах детергентов; их можно кипятить в течение нескольких минут при pH 3 без потери активности. Напротив, дифтерийный токсин в растворе теряет свойственную ему токсичность при стоянии в течение короткого времени при pH 5 и комнатной температуре. Пепсин также неустойчив при pH, больших 5. Многие белки теряют биологическую активность при хранении их в очень разбавленных растворах при комнатной температуре.

Потеря активности при денатурации может происходить тремя путями.

1. Разрыв нескольких основных связей разрушает общую структуру молекулы, включая и часть, необходимую для проявления активности. Это предположение было бы более вероятным, если бы не существовали многочисленные перекрестные связи, устойчивые в условиях денатурации. Следует ожидать, что такой процесс должен быть необратимым и сопровождаться значительными изменениями физических свойств.

2. Местная дезориентация, происходящая в ограниченных частях молекулы. В результате этого может иметь место потеря биологической активности без заметного изменения физических свойств или, наоборот, уменьшение растворимости без потери активности. Это может быть в тех случаях, когда сохранение основной структуры белка идет за счет ковалентных связей или если различие в прочности лабильных связей таково, что одни из них разрушаются, в то время как другие остаются без изменения. Возможно также, что изменение условий, например pH раствора, отражается только на некоторой части поверхности молекул и вызывает изменение определенных участков поверхности молекул. В этом случае потеря биологической активности может сопровождаться только едва заметными изменениями физических свойств, и при соответствующих условиях эти изменения, вероятно, обратимы.

3. Ассоциация молекул белка посредством лабильных связей может приводить к изменению физических свойств и вызывать потерю активности вследствие блокирования активных центров в ассоциатах при сохранении внутримолекулярной структуры. Примером этого типа процесса может служить тепловое осаждение кислого инсулина (см., однако, т. II, гл. VI). Во [37] показал, что в этом случае образуются полимеры с длинной цепью, а Портер [38] установил, что денатурация вызывает блокирование двух из четырех имидазольных колец в субмолекуле. Этот тип денатурации отличается от всех других видов, всегда связанных с повышением реакционной способности химических групп, которые в нативном белке [39] могли находиться в совершенно неактивном состоянии. Тепловое осаждение инсулина, до сих пор единственное в своем роде, является обратимым; физические свойства и биологическая активность инсулина могут быть полностью восстановлены.

У трипсина [40], химотрипсина [41] и ряда других ферментов биологическая активность при нагревании исчезает, а при охлаждении частично восстанавливается. Таким образом, обратимость денатурации в некоторых случаях можно считать установленной, однако остается спорным вопрос о том, является ли эта обратимость полной и все ли свойства при этом восстанавливаются. Несколько сходное явление обратимой инактивации обнаружено при стоянии раствора оксидазы *l*-аминокислот из змеиного яда [41a].

Этот вопрос подробно изложен в т. II, гл. VI, здесь же важно только отметить, что активные центры фермента при некоторых условиях могут изменяться обратимо. По-видимому, эти случаи обратимой инактивации могут служить примерами местной дезориентации, т. е. денатурации типа 2, в то время как наиболее обычные, полностью необратимые изменения являются примерами денатурации типа 1.

О сложности явления можно судить по недавно опубликованным данным о том, что слабым нагреванием, при котором денатурируются многие белки, можно реактивировать ферменты, активность которых была утрачена при выдерживании их растворов при низких температурах. Хофсти [42] наблюдал реактивацию уреазы при нагревании в течение 5 мин. при 60°, а Ралкин, Шугар и Симинович [43] обнаружили реактивацию дегидразы триозофосфата при нагревании в аналогичных условиях. Предполагается, что инактивация уреазы происходит путем блокирования активных центров вследствие ассоциации ее молекул, т. е. имеет место денатурация типа 3; последующее нагревание вызывает диссоциацию. Французские же исследователи предполагают, что потеря активности и реактивация находятся в зависимости от действия температуры на равновесие между сульфгидрильными и дисульфидными связями. Если это предположение справедливо, то описанные явления нельзя рассматривать как денатурацию в соответствии с данным выше определением, поскольку при этом происходят разрыв и образование ковалентных связей.

Эриксон и Нейрат [44] наблюдали другое необычное и весьма интересное явление, заключающееся в том, что антитела пневмококковой антисыворотки лошади могут быть полностью денатурированы, поскольку об этом можно судить по их растворимости и другим физическим характеристикам; если же затем внести эти антитела в раствор тиоцианата натрия, то они почти полностью сохраняют свою способность специфически соединяться с антигенами, хотя и в иных соотношениях. Это наводит на мысль, что небольшие, но существенные части молекулы глобулина могут сохранять свою специфическую конфигурацию, в то время как остальная ее часть претерпевает значительные изменения. Аналогичное явление наблюдалось и в случае уреазы. Самнер [12] показал, что в определенных условиях этот фермент может денатурироваться этанолом так, что его растворимость необратимо понижается (практически до нуля), а ферментативная активность сохраняется в значительной степени. Оба эти случая могут служить примерами денатурации типа 2.

При исследовании поверхностных пленок было обнаружено, что некоторые глобулярные биологически активные белки могут растекаться в мономолекулярные слои без потери активности. К таким белкам относятся протеолитические ферменты [45]; уреаза [46]

и некоторые антигены, например овальбумин и сывороточный альбумин [47]. Однако в случае овальбумина наблюдалось некоторое снижение способности связываться с антисывороткой. При таком растекании трехмерная конфигурация должна разрушаться, но плоскостная структура может оставаться неизменной. Эти наблюдения трудно понять в свете доминирующего значения, приписываемого (в общем с полным основанием) нативной трехмерной конфигурации молекулы.

В заключение можно сказать, что изучение денатурации приводит к выводу, что биологическая активность белков зависит от конфигурации всей молекулы или части ее. Устойчивость белков по отношению к денатурации чрезвычайно различна; в некоторых случаях биологическая активность может сохраняться при значительных изменениях физических свойств. Однако в последних случаях иные или более жесткие условия вызывают полную инактивацию белков. У некоторых очень устойчивых белков конфигурация обусловлена только ковалентными связями, поэтому такие белки неспособны денатурироваться.

Б. Сравнительное изучение структуры и активности

Сравнительные исследования такого рода могут проводиться для изучения структурных особенностей белков, обладающих весьма близкими химическими, но различными биологическими свойствами (например, различных антител, выделенных из одного и того же объекта), с целью выяснения причин различий активности белков. Сравнительное исследование можно также применять и для изучения белков, выделенных из различных объектов, но обладающих идентичными биологическими свойствами, чтобы установить характерные, значительно изменяющиеся свойства белков, не связанные с их активностью. Поскольку некоторые структурные свойства белка изменяются параллельно с изменением активности (как, например, у антигенов, выделенных из различных источников), можно сделать вывод о взаимосвязи этих явлений. Такой подход к исследованию имеет свои недостатки. Действительно, едва ли возможно (а если и можно, то только в исключительных случаях) проверить эти выводы экспериментально, изменив структуру белка так, чтобы получить предполагаемое изменение активности. Тем не менее по этому вопросу собраны некоторые интересные данные.

Первыми белками, применявшимися для сравнительных исследований, были антигены. В начале этого столетия Натталл [48] изучал образование преципитинов у животных, которым вводили сывороточные белки различных видов. Он обнаружил систематическое изменение антигенной специфичности этих белков, которое идет параллельно их зоологическому родству. Десять лет спустя

Уэллс и Осборн [49] в ряде работ описали подобные же изменения для глобулинов семян нескольких видов растений. Эти авторы применяли кристаллические белки и проводили наряду с иммунологическими и химические исследования, пытаясь связать структурные различия с антигенной специфичностью. Несмотря на ограниченность имевшихся в то время аналитических методов, полученные результаты все же дали возможность Уэллсу и Осборну [49] сформулировать важный вывод: «Из того факта, что химически близкие белки из семян растений различных видов реагируют анафилактически между собой, в то время как химически различные белки из одинаковых семян не реагируют подобным образом, мы можем заключить, что специфичность анафилактической реакции зависит от химической структуры белков». Подобную точку зрения изложил еще раньше Эрлих, но он не подтвердил ее достаточным количеством экспериментальных данных.

Благодаря доступности и легко осуществляемой очистке гемоглобинов последние часто применялись для различного рода сравнительных исследований. При этом, как правило, обнаруживались различия в свойствах, в зависимости от происхождения белка, при любых методах исследования — физических, физиологических или химических. Были также обнаружены систематические изменения антигенной специфичности, находящиеся в соответствии с зоологической классификацией [50—52], хотя подобные изменения других свойств белков (пока не начали определять свободные аминогруппы) не обнаружились [53]. Применение метода Сангера позволило идентифицировать и определить N-концевые аминокислоты открытых полипептидных цепей (см. т. I, гл. II и III). Результаты определений представлены в табл. 3. Из данных таблицы видно,

Таблица 3

КОНЦЕВЫЕ ОСТАТКИ ГЕМОГЛОБИНОВ [53]

Источник получения гемоглобина	Принятый молекулярный вес	Концевая аминокислота	Количество свободных ε-аминогрупп лизина
Человек (взрослый) . .	66 000	5 остатков валина	43
Человек (эмбрион) . . .	66 000	2,6 остатка валина	47
Лошадь	66 000	6 остатков валина	41
Осел	66 000	То же	41
Корова	66 000	2 остатка валина, 2—метионина	47
Овца	66 000	То же	47
Коза	66 000	» »	48
Миоглобин лошади . .	17 000	1 остаток глицина	20

что имеются систематические изменения, идущие параллельно зоологическому родству и изменениям антигенной специфичности. Эта зависимость в некоторых случаях может быть, однако, случайной, или, что более вероятно, антигенная специфичность и структурные особенности белка могут находиться в определенном соответствии с зоологической классификацией, но не зависят друг от друга. Как упоминалось выше, опытным путем невозможно определить влияние изменения числа цепей и концевых аминокислот на специфичность белка. Интересно отметить, что антигенные свойства белков зародышей выражены слабее, чем у тех же белков взрослых животных. Это подтверждается тем, что ткани зародышей гораздо легче переносят пересадку [54]. В этой области проведено очень мало структурных исследований, но если общепринятая теория эмбрионального развития верна, то сравнительные исследования, проведенные на различных стадиях развития, могут дать весьма интересные результаты.

Препараты инсулина, выделенные из различных объектов и полученные в кристаллическом виде, на первый взгляд кажутся идентичными как по химическому строению, так и по биологической активности [55]. Их весьма слабые антигенные свойства соответствуют химическому сходству препаратов, выделенных из различных объектов. Это мешает «признать» его чужеродным белком по отношению к животному, которому он инъецирован. Вассерман и Мирский [56] все же смогли сенсибилизировать морских свинок и вызвать анафилактический шок введением различных препаратов инсулина; однако, несмотря на применение этого весьма чувствительного метода, обнаружить видовые различия не удалось. Препараты инсулина коровы, овцы и свиньи имеют одни и те же концевые аминокислоты (определено динитрофенильным методом) [57] и поэтому, вероятно, обладают одинаковой структурой, состоящей из четырех пептидных цепей. В дальнейшем Сангер [58] обнаружил, что аминокислотный состав полипептидных цепей, содержащих в качестве N-концевой аминокислоты глицин, различен. Так, инсулин свиньи содержит треонин и мало аланина, в то время как инсулины коровы и овцы содержат больше аланина и не содержат треонина. Таким образом, инсулины, значительно различающиеся по структуре, могут обладать одинаковыми физиологическими свойствами.

Было установлено, что адренокортикотропные гормоны из гипофиза свиньи [59] и овцы [60] имеют весьма сходные физические и химические свойства, хотя в настоящее время возникли некоторые сомнения относительно идентичности выделенных белков, обладающих активным началом. Тиреоглобин обладает слабыми антигенными свойствами. По-видимому, справедливо то положение, что видовые различия, обычные для большинства белков, у белковых гормонов выражены значительно слабее.

Было отмечено, что препараты кристаллического пепсина, полученные от различных животных [3,61] и рыб [62, 63], незначительно отличались друг от друга в отношении растворимости и биологической специфичности. Однако химические исследования этих белков не проводились.

В настоящее время дальнейшие сравнительные исследования возможны путем разложения соединений, считавшихся гомогенными, на различные компоненты, обладающие активностью исходного вещества. Крейг [64] разложил грамицидин, который считался гомогенным, согласно данным по диффузии и адсорбции, на три или четыре активных компонента, использовав метод противоточного распределения. Подобным же методом было осуществлено частичное разложение инсулина на два компонента, но активность обоих компонентов, по-видимому, была меньше исходной [65, 65a]. Рибонуклеазу также разделяли хроматографическим методом на два компонента, обладающих ферментативной активностью [66, 67]. Мартин и Портер нашли, что рибонуклеаза панкреатической железы крупного рогатого скота существует в двух формах, однако химические различия, объясняющие различное хроматографическое поведение двух форм, не установлены*. Предположение о возможности существования нескольких форм одного и того же фермента было высказано на основании изучения растворимости пепсина свиньи [68]. Различия в величинах pH, соответствующих оптимуму действия фермента, или константах Михаэлиса не отмечались.

B. Блокирование активных групп

В течение многих лет проводилось исследование влияния химических изменений белка на его биологическое поведение. Оно началось, по-видимому, с работы Обермауера и Пика [69], которые изучали влияние нитрования и иодирования белков сыворотки на их антигенную специфичность. Эти работы успешно продолжил Ландштейнер [70], который изучал влияние на специфичность белков низкомолекулярных веществ, присоединяющихся к антигенам через диазосвязи. Следует, однако, отметить, что влияние природы замещающих групп отличается от эффекта действительного блокирования различных полярных групп в самом белке. Оба явления настолько важны, что их следует рассматривать отдельно.

Интерпретация всех обсуждаемых в настоящем разделе работ основывается на предположении, что активность белка локализуется в активных центрах и что если найти такой тип групп, блокирование которых вызывает потерю активности, то природу актив-

* О дальнейшем развитии хроматографического метода см. работы Портера и др. [67a].

ных центров можно считать установленной. При этом подразумевается, что применяемые химические реакции специфичны только для одного или двух типов полярных групп и что вторичные явления, такие, как денатурация, не происходят. Оба эти условия трудно осуществить. Необходимо также, чтобы применяемые реагенты и вступающие в реакцию функциональные группы белков можно было определить количественно. Кроме того, необходимо, чтобы при удалении замещающих групп биологическая активность восстанавливалась; это может служить указанием на отсутствие денатурации, если только последняя не является обратимой в условиях проводимого процесса. Для правильного объяснения полученных результатов необходимо соблюдать еще одно условие: замещающие группы должны быть небольшими, чтобы к первичному эффекту блокирования специфических групп белка, с которым они реагируют, не присоединялся эффект, обусловленный пространственными затруднениями для доступа бо́льших молекул к соседним группам. Эти условия трудно осуществить, и выводы, сделанные из таких работ, соответственно становятся менее обоснованными. Обзоры работ, посвященных реакциям замещения в белках, сделали Эррио [71] и Олкотт и Фрэнкель-Конрат [72]. Последний обзор имеет особое отношение к рассматриваемой проблеме. Эти работы подробно обсуждаются в т. I, гл. IV. Табл. 4, в которой собрано большинство данных, полученных этими методами, основывается на материалах, опубликованных Олкоттом и Фрэнкель-Конратом [72].

В качестве двух типичных примеров можно рассмотреть инсулин и лизоцим. Последний—фермент, выделенный из яичного белка,—вызывает быстрый лизис некоторых бактерий, по-видимому вследствие деполимеризации мукополисахаридов стенки клетки. Инсулин и лизоцим—белки с небольшим молекулярным весом, которые можно получить в виде хорошо очищенных кристаллических препаратов. Они исключительно устойчивы по отношению к денатурации, вызываемой обычными методами, и поэтому реакции замещения, особенно проводимые в кислой или нейтральной среде, по-видимому, не осложняются вторичными явлениями. Из табл. 4 видно, что для проявления активности инсулина необходимы только фенольные, карбоксильные и дисульфидные группы, тогда как для проявления активности лизоцима необходимы амино-, карбоксильные, гуанидингидроксильные и дисульфидные группы. Поскольку используемые реактивы не являются абсолютно специфичными для данных групп, то окончательно решить, все ли из перечисленных групп необходимы для проявления активности, невозможно. Однако применение нескольких реагентов с приблизительно одинаковой специфичностью дало возможность установить, что все вышеперечисленные группы имеют значение для проявления биологической активности.

Таблица 4

ГРУППЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ (ПО ОЛКОТТУ И ФРЭНКЕЛЬ-КОНРАТУ [72])

Белок	Группы, имеющие существенное значение	Литературная ссылка	Группы, не имеющие существенного значения	Литературная ссылка
Антитела				
Антиовальбумин кролика			Дисульфидная	73
Антиовальбумин лошади	Амино-	74, 75		
Антипневмококковый полисахарид лошади	»	76		
Антигены				
Овальбумин	Фенольная	78	Сульфгидрильная	77
Альбумин сывороточный			Фенольная	78
Ферменты				
Амилаза (из поджелудочной железы)	Амино-	79	Фенольная, сульфгидрильная, дисульфидная	79, 80
β-Амилаза (ячменя)	Фенольная, дисульфидная	81	Амино-	81
Химотрипсин	То же	82	»	82
Лизоцим	Амино-, карбоксильная, амидная, гуанидиновая, гидроксильная, дисульфидная	83		
Папаин	Фенольная, сульфгидрильная	84 85	»	84
Пепсин	Фенольная	86	»	86
Фосфатаза	Амино-	87		
Рибонуклеаза	»	88		
Соланин	Фенольная	89	Амино-, сульфгидрильная	78
Трипсин	Индольная, амидная	90	Амино-, фенольная, дисульфидная, карбоксильная, имидазольная	79

Продолжение табл. 4

Белок	Группы, имеющие существенное значение	Литературная ссылка	Группы, не имеющие существенного значения	Литературная ссылка
Гормоны				
Адренокортикотропный (гипофиза)	Амино-, фенольная	91		
Стимулирующий интерстициальные клетки	Амино-, дисульфидная	92 94		
Фолликулостимулирующий	Амино-, дисульфидная	92 93		
Пролан	Фенольная	92	Амино-	92
Сыворотка жеребой кобылы	Амино-, дисульфидная	92 94		
Инсулин	Фенольная, дисульфидная, карбоксильная	95 96 97	Амино-, гидроксильная, амидная, гуанидиновая	98 99 100 100
Лактогенный	Амино-, дисульфидная	92 94		
Паратироидный	Амино-, карбоксильная	101 102	Дисульфидная	103
Питоцин			»	104
Вирусы				
Мозаики табака	Фенольная	105	Амино-	105
Токсины				
Дифтерии	Амино-	106		
Скарлатины	Фенольная	107		
Кротоксин	Амино-, фенольная, дисульфидная, гидроксильная, карбоксильная	108		
Разные				
Овомукоид (ингибитор трипсина)	Карбоксильная, фенольная, гуанидиновая	90	Амино-	90

Обычно дисульфидные связи играют большую роль в молекулах белка с высоким содержанием цистина, так как именно эти связи в основном обусловливают создание определенной конфигурации молекулы. Действительно, пользуясь рентгеновским методом, Рудалл [72а] обнаружил, что если дисульфидные связи не восстановлены, то инсулин не образует β-диаграмм, характерных для вытянутой молекулы денатурированного белка. Остается невыясненным, означает ли большое количество полярных групп различных типов, которые, по-видимому, присутствуют в активном центре лизоцима, что этот центр имеет бо́льшую величину по сравнению с активным центром инсулина. Показано, что блокирование фенольных групп в инсулине может сопровождаться лишь незначительной потерей активности [100]. Точно так же этерификация $^2/_3$ карбоксильных групп не вызывает исчезновения активности инсулина [109]. При этерификации лизоцима активность падает постепенно, откуда следует, что если молекулы белка реагируют одинаково, то некоторые его карбоксильные группы не являются существенно необходимыми для проявления активности [83]. Следующая стадия исследования, заключающаяся в точном определении различных специфических групп в активных центрах, только начинает развиваться, хотя в ряде случаев такое определение не составляет особого труда. Приближенный метод был разработан Гопкинсом, Лутвак-Манном и Морганом [110], которые показали, что сукциндегидраза может быть защищена от инактивации, вызываемой блокированием сульфгидрильных групп, при наличии избытка или субстрата (янтарной кислоты), или конечного продукта реакции (фумаровой кислоты), или вещества, вызывающего конкурентное ингибирование (малоновой кислоты). Эта работа была подтверждена [110а], и, по-видимому, в тех случаях, когда возможно применение небелкового конкурентного ингибитора, определение активных группировок при наличии и в отсутствие ингибитора непосредственно указывает число специфических группировок, входящих в активный центр. Однако они могут составлять только небольшую часть общего числа групп, находящихся в молекуле, и числовые значения, полученные по разности, будут зависеть от точности определений. Сульфгидрильные группы занимают особое место в исследованиях по блокированию активных групп, так как они первыми были полностью изучены в этом отношении. Было обнаружено, что при блокировании или окислении групп —SH инактивируются многие ферменты [111, 111а]. Группы —SH обладают также различной степенью реакционной способности. Число определяемых групп —SH в белке зависит от применяемых реактивов и от того, находился ли белок в нативном или денатурированном состоянии. Как следствие, сульфгидрильные группы какого-либо одного белка часто можно разделить на различные категории в соответствии с их активностью по отношению к тому или иному реагенту. В различных белках сульфгидриль-

ные группы, необходимые для проявления ферментативной активности, могут также принадлежать к разным категориям (см. т. II, гл. VI). Так, Геллерман [112] различает в уреазе три вида сульфгидрильных групп: (а) легко вступающие в реакцию; (б) менее реакционноспособные; (в) два или три вида групп —SH, которые не реагируют ни с одним реагентом до тех пор, пока белок не денатурирован. Блокирование групп типа (а) не снижает ферментативной активности, в то время как блокирование групп (б) уничтожает ее полностью. Это исследование было продолжено Десноэлем и Ровери [113], применявшими в качестве реагента в основном фенилизоцианат. Они подтвердили, что при блокировании сульфгидрильных групп одного вида активность уреазы не снижается, а при продолжении реакции активность падает до нуля, прежде чем полностью прореагируют группы —SH типа (б). Эти факты, однако, были объяснены тем, что группы —SH типа (б) могут реагировать только после разрыва лабильных связей, и основной причиной потери активности является скорее местная денатурация, чем химическая реакция. С другой стороны, Геллерман [112] показал, что при отщеплении групп —SH типа (а) разбавленным раствором порфириндина с последующей обработкой *n*-хлормеркурибензоатом активность теряется, а при добавлении избытка цистеина—восстанавливается. Раньше обратимость реакции, сопровождающейся реактивацией, принимали как критерий, указывающий на основное значение конденсации; однако одновременно с этим процессом возможна также обратимая местная денатурация. Как установили французские исследователи, относительно недоступные группы, по-видимому, непосредственно не влияют на проявление биологической активности, особенно когда частицы субстрата и реагента сравнимы по величине. Далее, из данных Геллермана следует, что для инактивации уреазы должно быть блокировано более 40 сульфгидрильных групп на молекулу, тогда как Амброзе с сотрудниками [6], исследуя торможение действия фермента ионами серебра, нашел, что присоединение только 3 или 4 ионов к 1 молекуле фермента вызывает его инактивацию. Если, что кажется наиболее вероятным, серебро реагирует с сульфгидрильными группами, то трудно совместить результаты обоих исследований. Подобное же несоответствие между реакционной способностью сульфгидрильных групп и их значением для активности фермента наблюдается в случае миозина и проявляется как в его аденозинтрифосфатазных свойствах, так и в способности соединяться с актином [114].

Эти явления довольно подробно обсуждались, так как они дают особенно яркий пример неоднозначности результатов, которые могут получаться даже при использовании, казалось бы, идеальных реагентов. Интерпретация отрицательных результатов, например сохранение активности инсулина при полном блокировании аминогрупп, также не разрешает этих сомнений.

Недавно было открыто явление, представляющее большой интерес для исследования активных центров белков, а именно инактивирующее действие диизопропилфторфосфата (ДФФ) на эстеразы и другие белки [115—118]. При взаимодействии с химотрипсином 1 моль ДФФ вступает в реакцию конденсации с 1 молем химотрипсина [118, 119], при этом образуется 1 моль фтористоводородной кислоты. Аналогично ведут себя некоторые аналоги ДФФ. Однако ДФФ не реагирует при тех же условиях ни с химотрипсиногеном, ни с денатурированным химотрипсином [118а], как и с аминокислотами, входящими в состав фермента, или с его гидролизатом. Неактивное соединение ДФФ-химотрипсин можно получить в кристаллическом виде; оно обладает электрофоретической подвижностью, аминокислотным составом [119] и скоростью седиментации такими же, как и исходный белок.

Это позволяет предположить, что ДФФ реагирует с некоторыми группами фермента, существующими только в нативном белке. Прочность связи и малые размеры частиц реагента дают основание предполагать, что в реакции конденсации не принимают участия ни силы электростатического притяжения, ни водородные связи, ни какие-либо другие лабильные связи, которыми, как это обычно предполагают, определяются специфические свойства нативной молекулы. ДФФ и его аналоги, которые тоже тормозят действие эстеразы, являются эфирами, поэтому возможно (хотя и маловероятно), что стерические факторы облегчают их приближение к «уязвимым» ведущим группировкам, в результате чего происходит конденсация. Возможно также, что фермент содержит какую-либо новую группу, не входящую в состав аминокислот, из которых он построен, и что эта группа реагирует с ДФФ. Недавно было высказано предположение, что ДФФ и его аналоги являются субстратами для фермента и торможение вызывается необратимым связыванием органического фосфата [119а]. Каково бы ни было объяснение, реагирующая часть молекулы должна быть тесно связана с активным центром фермента, и этим, по-видимому, можно объяснить некоторые необычные свойства этой части поверхности молекул белка.

Г. Замещение определенных групп в белках и многообразие небелковых реагентов

1) АНТИГЕНЫ

Соединение антигенов с органическими веществами весьма различного строения, имеющими небольшие молекулы, Ландштейнер [120] осуществлял через азосвязь. Замещенные белки сохраняли свою антигенную способность, если соединение не было слишком экстенсивным, и специфичность выработанных антител почти полностью зависела от введенных небольших по величине групп, а не

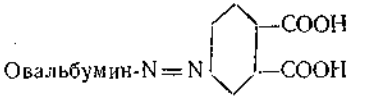
от исходного белка. После того как стало известно, что сами молекулы заместителя могут тормозить осаждение антигена его антисывороткой, техника эксперимента была упрощена. Такие молекулы называются гаптенами, и их тормозящая способность подтверждает тот факт, что специфичность антител зависит в основном от замещающих групп, введенных в белок. При помощи этой реакции Ландштейнер [120] смог исследовать громадную зону специфичности антител и по аналогии объяснить типы группировок, которые, по-видимому, должны играть значительную роль в природных антигенах. Специфичность антител может быть связана с большим числом различных органических химических группировок, и нет оснований предполагать, что природные соединения более активны, чем полученные искусственно.

Попытки установить специфические определяющие группировки в природных антигенах оказались успешными при исследовании полисахаридов пневмококков. Так, Гэбель [121] показал, что антисыворотка против целлобиуроновой кислоты, связанной с белками, реагирует и с дисахаридами и с входящими в их состав гексозами. Она также реагирует с капсулярным полисахаридом пневмококков типов III и VII, в котором целлобиуроновая кислота, по-видимому, является основной повторяющейся структурной единицей. Далее, этот антиген может быть использован для иммунизации и защиты мышей от инфекции указанными типами пневмококков [122]; это является убедительным доказательством того, что целлобиуроновая кислота представляет собой главный определяющий фактор антигенной специфичности капсулированных пневмококков.

Неудивительно, что это исследование оказалось менее успешным при выяснении связывающих центров белковых антигенов. При этом немедленно возникали осложнения вследствие того, что специфичность нативного белка обычно очень сильно отличается от специфичности денатурированного белка. Хотя комплексные конфигурационные явления играют важную роль, некоторые относящиеся к разбираемому вопросу данные получены при применении антигенов, образованных присоединением аминокислот и пептидов к белкам через диазосвязи. Применяя лейцил- или глицилпептиды, Ландштейнер [123—125] установил, что С-концевая аминокислота в пептиде играет более важную роль в проявлении специфичности, чем аминокислоты, находящиеся в цепи. Используя разработанную для гаптенов методику, он также изучил тормозящее действие продуктов частичного гидролиза белка, результаты которых будут рассмотрены ниже.

Это направление работ в дальнейшем было широко развито Паулингом с сотрудниками, которые изучали образование антител против белков, содержащих в качестве замещающих групп органические соединения, и тормозящее действие соответствующих гаптенов на реакцию антитело—антиген. На основании количествен-

ного изучения степени торможения они пытались установить распределение связывающих центров антитела, по которым происходит присоединение, выяснить главные особенности структуры и тип связи между антителом и гаптеном. Чтобы проиллюстрировать сказанное, можно сослаться на работу Прессмана и Паулинга [126]. Указанные авторы получали антисыворотку против белков сыворотки овцы, содержащих 4-азофталат, и изучали торможение соединения антисыворотки с овальбумином (I), содержащим азофталат. Чтобы устранить всякое влияние белковой части антигена, замещающую группу соединяли с различными белками



(I)

Было установлено, что тетрагалоидированный фталат является более эффективным ингибитором, чем фталат. Эти данные опровергают предположение о том, что стерические факторы играют какую-то роль в образовании соединения, так как вследствие большого объема галоидированной молекулы ее тормозящее действие должно было бы уменьшиться. Увеличение тормозящей способности объясняли более сильным вандерваальсовым притяжением атомов галоида. *о*-Сульфобензоат соединяется с антителом так же хорошо, как фталат, а *о*-нитробензоат—значительно хуже. Эти данные свидетельствуют о том, что для взаимодействия важно присутствие двух заряженных групп, но их природа имеет гораздо меньшее значение. Из всех полученных результатов можно сделать вывод, что связывающий центр антитела несет один или два положительных заряда, которые соединяются с отрицательными зарядами гаптена. Способность связывать у этого гаптена гораздо слабее, чем у большинства других гаптенов, изученных этой группой исследователей. С количественной стороны значение этой работы неопределенно, так как известно, что эти красители полимеризуются в растворе [126а] и что они связываются сывороточным альбумином [126б] так же, как и специфическим антителом.

Такие исследования могут дать сведения о связывающем центре антитела, которые в настоящее время нельзя получить другими методами, однако для более точной интерпретации реакции и проверки вытекающих отсюда следствий необходимо также иметь более подробные данные о структуре.

2) ФЕРМЕНТЫ

Бергман с сотрудниками [127] синтезировал значительное число пептидов и использовал их для исследования специфичности протеаз, полученных ранее в кристаллическом виде Нортропом. При-

менение синтетических субстратов и ингибиторов, имеющих небольшие молекулы, для исследования ферментативной специфичности в известной степени аналогично работам Ландштейнера, использовавшего гаптены для изучения специфичности антител. Исследование Бергмана получило дальнейшее развитие в нескольких лабораториях с целью накопления данных о специфичности ферментов и установления механизма их действия. Ниже рассматриваются эти исследования, которые производились параллельно с ранее описанными работами Паулинга.

Нейрат и Шверт [128] обобщили результаты, полученные при исследовании трипсина, химотрипсина и карбоксипептидазы. Самым неожиданным из полученных результатов было, по-видимому, то, что эти ферменты оказались способными расщеплять эфирные, гидразидные и оксамидные связи так же легко, как пептидные и амидные [129—131а]. Имеется много доказательств, что гидролиз связей такого различного типа осуществляется ферментами за счет одних и тех же содержащихся в них группировок. Изучали ускорение гидролиза или его торможение под влиянием большого числа пептидов, их аналогов и производных. Полученные результаты дали возможность установить в деталях специфические условия, необходимые для проявления ферментативной активности. Эти работы послужили также доказательством существования множественных связей между ферментом и субстратом. О характере действия ферментов были высказаны следующие предположения [128].

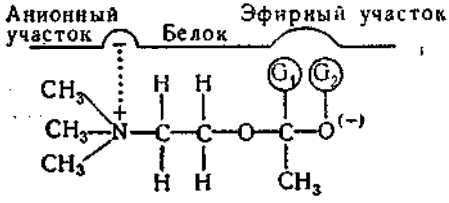
1) Последующее взаимодействие фермента с неадсорбированными ранее частями субстрата обусловливает деформацию гидролизуемых связей, достаточную, чтобы сделать их доступными воздействию воды.

2) Активация может не вызывать серьезных изменений в конфигурации комплекса фермент-субстрат, но может обусловить значительную поляризацию подвергаемой воздействию связи, облегчая подход водородного или гидроксильного иона.

3) Фермент может сконцентрировать водородные или гидроксильные ионы в непосредственной близости к гидролизуемой связи, в результате чего вслед за переносом протона или гидроксильного иона происходит расщепление. Дальнейших выводов с точки зрения теории активных центров не сделано.

До известной степени аналогичные работы по изучению специфичности некоторых экзопептидаз проводил Смит с сотрудниками [132—134]. В этих работах особое внимание уделялось значению ионов металлов в реакции. Было сделано допущение, что в комплексе фермент-субстрат ион металла соединен и с белком и с субстратом. Поскольку процесс присоединения металла к ферменту протекает медленно, то, по-видимому, он происходит не по типу образования солевой связи. Разработаны теории, касающиеся механизма действия ферментов, и в качестве примера выбрана карбоксипептидаза.

Однако Нейрат и Де-Мария [135] подвергли критике те положения, из которых следовало, что этот фермент является металлопротеином. До тех пор пока этот основной вопрос не будет решен, возможность приложения теории внутрикомплексных образований ко всем случаям является сомнительной, но эта теория кажется вполне вероятной в отношении механизма действия многих пептидаз. Систематические исследования Вильсона с сотрудниками [136—140] имели целью дать схему строения активного центра холинэстеразы. Снова были произведены количественные исследования по торможению ферментативных реакций конкурентными и необратимыми ингибиторами. Тщательное изучение влияния pH с использованием ионизированных и неионизированных субстратов и ингибиторов помогло установить относительное положение заряженных групп в активных центрах холинэстеразы. Предполагаемый порядок расположения зарядов показан на схеме:



На основании физико-химических данных, полученных при изучении кислотного и щелочного катализа гидролиза эфиров, было сделано предположение, что, помимо электростатической связи между анионным участком и атомом азота, следует также допустить наличие связи между нуклеофильной группой G_1 и углеродом эфира, а также связь между электрофильной группой G_2 и одним из атомов кислорода. При анализе зависимости между pH и ферментативной активностью было выведено значение pK для двух ионизированных групп на эфирном участке. Рассуждения, которые привели к этим выводам, построены на некоторых допущениях, но дают вполне убедительное объяснение экспериментальных данных.

Кирней и Зингер [41a] пришли к некоторым выводам относительно природы активного центра оксидазы *l*-аминокислот змеиного яда. Эти представления возникли при изучении обратимой инактивации этого фермента в растворе. Активная и неактивная формы находятся в равновесии, относительные количества каждой из них зависят от природы присутствующих ионов и от pH раствора; изменения температуры влияют на скорость перехода одной формы в другую, но не влияют на конечное равновесие. Во время инактивации не происходит значительных изменений растворимости в изоэлектрической точке, константы диффузии, скорости седиментации и электрофоретической подвижности. Простетическая группа фермента также не изменяется. На основании этого Кирней и Зингер сделали

вывод, что инактивация вызывается ограниченными изменениями конфигурации в небольшой части белковой молекулы. Кривая активности фермента при различных pH и кривая зависимости равновесия между активной и неактивной формами от pH сходны. В обоих случаях основная зона лежит около pH 6,5±1. Было сделано допущение, что притяжение субстрата к ферменту имеет электростатический характер, и постулировано, что при pH 7,5 положительно и отрицательно заряженные группы аминокислот удерживаются противоположно заряженными группами активного центра фермента. При pH 5,5, когда фермент не активен, положительная группа фермента остается заряженной, тогда как отрицательная, повидимому, изменяет свой знак, отталкивая, таким образом, субстрат. Полярные группы аминокислот, конечно, не могут изменять знак своего заряда. Авторы полагают, что в области значений pH 7,5—5,5 вблизи верхней границы pH имидазольная группа обладает достаточным отрицательным зарядом для притяжения аминогруппы субстрата; у нижней границы pH заряд имидазольной группы положительный.

Многочисленные исследования, проведенные с различными субстратами и ингибиторами, расширили наши знания о специфичности ферментов. Они внесли некоторую ясность в современные представления о механизме действия этих ферментов и вызвали ряд предположений о формах активных центров. Как и в аналогичных работах с антителами, соответствующая проверка высказанных предположений станет возможной только после накопления данных о структуре этих белков.

Д. Частичный гидролиз белков и поиски активных фрагментов

Гидролиз биологически активных белков и исследование активности продуктов гидролиза имеют длинную историю. Начало ее относится к периоду дискуссии о белковой природе ферментов и антител. С тех пор как этот спор закончился, были проведены исследования, в которых пытались выделить фрагменты белковой молекулы, обладающие активностью исходного белка; такой путь является наиболее простым и коротким для выяснения связи между структурой и активностью. Эти исследования получили особенно широкое развитие в силу практической необходимости, обусловленной потерями вещества при экстракции и недостатком сырья при работе с инсулином, а позднее с адренокортикотропными гормонами (АКТГ).

1) ГОРМОНЫ

Из множества опубликованных работ следует, что в инсулине разрыв ковалентных связей, пептидных или дисульфидных, не может произойти без полной потери активности. Это замечательное открытие подчеркивает сложность обсуждаемой проблемы.

Что касается АКТГ, то вопрос остается открытым и не может быть окончательно решен до опубликования результатов повсеместно ведущихся исследований. В 1943 г. Ли, Эванс и Симпсон [59] и Сайерс, Уайт и Лонг [60] сообщили о выделении АКТГ из гипофиза овцы и свиньи соответственно. Гормоны оказались простыми белками, очень похожими по физическим свойствам на белки с молекулярным весом 20 000. Исследования при помощи ультрацентрифуги и данные по электрофорезу показали, что эти белки однородны. Ли [141] в 1947 г. сообщил, что, по неопубликованным данным, гормоны овцы гидролизуются пепсином или горячей кислотой с образованием активных пептидов, способных к диализу и не осаждаемых трихлоруксусной кислотой. Было установлено, что эти пептиды в среднем содержат около семи аминокислотных остатков. О клиническом значении АКТГ при лечении ревматизма впервые сообщалось в 1949 г., и с тех пор в этой области проведено много исследований. Получено подтверждение, что биологическая активность АКТГ сохраняется при гидролизе кислотой и пепсином (но не трипсином) [142, 143]. Подтвердились также [144,145] прежние данные Тисловица [146], показавшего в 1943 г., что в гипофизе содержатся диализуемые активные вещества, не осаждающиеся трихлоруксусной кислотой.

В лабораториях военного ведомства был разработан метод экстракции, включающий гидролиз пепсином, посредством которого получен препарат, по крайней мере в 150 раз более активный, чем исходный белковый гормон [147]. При ультрацентрифугировании этот препарат обнаруживает гетерогенность; его молекулярный вес равен нескольким тысячам. Поэтому его активность, рассчитанная на молекулу, приблизительно в 15 раз превышает активность исходного белкового гормона. Остается неясной связь между обоими препаратами. В появившейся недавно работе Ли [148] сообщается о фракционировании продуктов гидролиза пепсином АКТГ методом адсорбционной хроматографии на угле. Молекулярный вес очищенного препарата оказался равным 2000.

В настоящее время считают, что гипофиз содержит гормон с молекулярным весом менее 10 000, устойчивый по отношению к гидролизу кислотами и пепсином. Кроме того, в гипофизе содержится белок с молекулярным весом 20 000. Он проявляет некоторую гормональную активность, которая или свойственна самому белку, или обусловлена прочно связанными примесями; его активность также сохраняется после гидролиза. Объяснение этих данных стало еще более затруднительным с тех пор, как Стэк-Дьюн и Ионг [149] сообщили, что у крыс с удаленным гипофизом сохранение веса надпочечников и снижение содержания в них аскорбиновой кислоты зависят от различных гормонов, которые удалось потом полностью выделить. Поскольку оба эти свойства приписывались АКТГ и составляли основу наиболее часто применяемых методов испытания, необходимо пересмотреть ранее полученные данные.

2) ФЕРМЕНТЫ

До сих пор не получено убедительных доказательств сохранения ферментативной активности после гидролиза. Тсоу [150] удалось получить продукт неполного гидролиза пепсином цитохрома с. Исходя из содержания железа, можно было заключить, что сохранилась связь гема с полипептидом, имеющим молекулярный вес 3000, т. е. равным $^1/_4$ молекулярного веса исходного белка. Однако специфичность была утеряна, поскольку полипептид самоокислялся и не мог служить промежуточным звеном в сукциноксидазной и цитохромоксидазной системах. Поскольку главная функция белковой части гемопротеинов состоит, по-видимому, в осуществлении специфичности, нельзя утверждать, что этот фермент выдерживает гидролиз.

Известно несколько ферментов, которые существуют в неактивной форме и превращаются в активные только после гидролиза. В качестве примера можно указать на пепсиноген [151] и трипсиноген [152]. Эти предшественники ферментов и соответствующие им ферменты были получены в виде хорошо очищенных кристаллов. При активации химотрипсиногена получается в основном α-химотрипсин [153]. Кунитцу [154], однако, удалось выкристаллизовать из маточного раствора, оставшегося после кристаллизации α-фермента, еще два фермента — β- и γ-химотрипсины. Все три фермента обладают сходной активностью, но отличаются по форме кристаллов и по степени устойчивости к кислоте, щелочи и раствору мочевины. Позднее Якобсен [155] изучал активацию химотрипсиногена при различных условиях, а именно при 0° и высокой концентрации трипсина. Из соотношения между потенциальной активностью зимогена, истинной активностью образовавшегося α-химотрипсина и числом пептидных связей, распавшихся во время гидролиза, он сделал вывод о промежуточном образовании еще двух химотрипсинов. π-Химотрипсин, образующийся вначале, обладает специфической активностью, в 2—2,5 раза превышающей активность α-химотрипсина; δ-химотрипсин примерно в 1,5 раза активнее α-фермента. Ни одно из этих промежуточных соединений не было выделено, хотя δ-химотрипсин являлся объектом дальнейшего изучения [153a]. Из трех кристаллических ферментов α-химотрипсин гораздо активнее β- и γ-химотрипсинов. На всех этих этапах перехода зимогена в фермент происходили разрыв пептидных связей и образование небелкового азота, количество которого, правда, невелико и никогда не превышало 10% азота зимогена. Результаты более ранних определений молекулярного веса сомнительны, так как Кунитц [154] установил, что молекулярный вес α-химотрипсина равен 41 000, Янсен, Наттинг и Болс [118]— 27 000, а по более поздним данным молекулярный вес зимогена и некоторых других ферментов равен 22 000 [154a, b, c]. По-види-

мому, только небольшая часть предшественника фермента подвергается расщеплению в процессе превращения в фермент. Хотя до сих пор нет окончательных доказательств, однако можно думать, что в этом случае возможен ограниченный гидролиз фермента без потери его активности.

3) АНТИГЕНЫ

Было показано, что специфичность искусственно образованных антигенов зависит почти всецело от гаптенов, которые обычно имеют сравнительно небольшие и простые молекулы. Поэтому можно было ожидать, что антигены окажутся более подходящими веществами для получения специфически активных продуктов гидролиза. Хотя окончательные доказательства выделения пептидов, способных подавлять связывание полного антигена с его антисывороткой, еще не получены, однако имеются данные, что это может быть достигнуто. Ландштейнер и Чэйз [156] вводили кроликам гетероальбумозу, полученную в результате 3-часового гидролиза сывороточных белков пепсином. Связывание полученной при этом антисыворотки с антигеном подавлялось диализуемыми фракциями гетероальбумозы. Позднее Ландштейнер [157] получил антисыворотку против растворимого фиброина шелка, который был адсорбирован на угле. После частичного гидролиза фиброина шелка серной кислотой он получил пептиды, способные подавлять действие антисыворотки. Средний молекулярный вес, определенный для этих смесей пептидов, равен 600—1000. Холидэй [158] и Клечковский [159] проводили гидролиз кристаллического сывороточного альбумина пепсином и выделили фракции, способные осаждать и ингибировать антисыворотку альбумина. Портер [73] отмечает, что яичный альбумин, гидролизованный папаином, утерявший способность к осаждению антисывороткой, все еще способен подавлять ее действие. Однако фрагменты чистого белкового антигена, обладающие ингибиторным действием, до сих пор не выделены и свойства их не описаны. Размеры их с достаточной точностью не установлены. Основная трудность в подобных исследованиях заключается в выделении активного пептида из сложной смеси других высокомолекулярных пептидов. Однако такое выделение станет возможным по мере дальнейшего развития новых методов фракционирования. Для успешного преодоления этой трудности можно использовать специфическую способность пептида-ингибитора обратимо соединяться с антителом.

До сих пор не получено четких доказательств того, что частично гидролизованный белок может при инъекции сохранить свою способность стимулировать образование антител. Опыты Ландштейнера и Чэйза [156] с гетероальбумозой как будто свидетельствуют о такой возможности, но поскольку тщательную очистку гидролизата не проводили, в нем могло находиться некоторое количество

негидролизованных молекул. Гидролиз антисыворотки, который будет рассмотрен ниже, показывает, что после частичного гидролиза глобулины менее активны в качестве антигенов, чем исходные препараты.

4) АНТИТЕЛА

Антитела—это единственный класс биологически активных белков, которые, как это было убедительно показано, сохраняют свою специфическую способность соединяться с антигенами после неполного гидролиза. Исследования в этом направлении возникли в связи с попыткой понизить чувствительность к белкам сыворотки лошади, которые часто применялись вместе с дифтерийной и другими антисыворотками. Парвеньтев [160] успешно гидролизовал пепсином дифтерийный антитоксин без потери его активности, а Поуп [161] исследовал действие на эту антисыворотку ряда протеаз. Петерман и Паппенгеймер [162] очистили продукт гидролиза пепсином псевдоглобулина, полученного из дифтерийного антитоксина лошади, и нашли, что его молекулярный вес равен приблизительно половине молекулярного веса исходного белка при полном сохранении антитоксической активности. Гидролиз хлопьев комплекса токсоид-антитоксин дает более чистый продукт с молекулярным весом 113 000. Руководствуясь соображениями симметрии, они сделали вывод, что исходная молекула расщепляется под прямым углом к ее главной оси. Нортроп [163] растворил преципитат дифтерийного токсин-антитоксина в кислоте и после нейтрализации подверг его гидролизу трипсином. В жидкости над осадком сохранилась приблизительно $^1/_3$ активности, и после многократного фракционирования высаливанием было получено некоторое количество кристаллического активного белка. Кристаллы оказались нестойкими и при попытке перекристаллизации, по-видимому, денатурировались. Испытание на растворимость показало, что они неоднородны, но их молекулярный вес, равный примерно 90 000, был значительно ниже молекулярного веса исходного белка. В результате этих, а также других исследований было установлено, что при гидролизе антидифтерийного глобулина лошади образуются молекулы, величина которых немного больше половины молекулы исходного белка; эти молекулы сохраняли способность флоккулировать и нейтрализовать токсин. Нейтрализующая способность таких молекул вдвое больше, чем исходная, при расчете на единицу веса [162, 164] и одинакова с исходной при расчете на 1 моль. Следовательно, активные центры антитоксина расположены только в одной половине его молекулы. Портер [165] установил, что γ-глобулин кролика, иммунизированного против альбумина, примерно $^1/_3$ которого осаждается альбумином, можно гидролизовать с образованием фракции, которая хотя уже не флоккулируется антигеном, но способна подавлять осаждение. Фракцию, обладающую ингиби-

торными свойствами, можно в течение некоторого времени подвергать дальнейшему гидролизу карбоксипептидазой без потери активности. На основании анализа концевых групп очищенного продукта гидролиза был сделан вывод, что при действии папаина образуется ингибитор с молекулярным весом около 40 000, а карбоксипептидаза вызывает его снижение до 30 000 без потери активности. По-видимому, отщепление активной фракции происходит от конца полипептидной цепи, имеющей свободную концевую аминогруппу; таким образом, было грубо установлено положение активного центра. Ингибитор, взятый в достаточной концентрации относительно антитела, может полностью предотвратить флоккуляцию, но и флоккуляция и ингибиторное действие обратимы при изменении концентрации реагентов. Наличие второй фракции, обладающей ингибиторным действием, не установлено, хотя следует допустить ее существование в том случае, когда антитело имеет два активных центра, как это принимается, согласно теории пространственной решетки [166], предложенной для объяснения реакции антитело—антиген.

Результаты исследований гидролиза показывают, что от молекул антитела и, вероятно, антигена можно отщепить фрагменты, обладающие полной или частичной активностью исходного белка. То же самое возможно для АКТГ и, вероятно, для химотрипсина, и хотя успешное проведение подобного рода работ с гормонами и ферментами в настоящее время кажется менее вероятным, все же нет оснований предполагать, что в проявлении специфичности и активности участвует вся белковая молекула. Дальнейших обобщений сделать нельзя, но неудачи при попытке получить активные продукты посредством гидролиза только доказывают, что применявшиеся методы не эффективны.

Е. Исследования механизма образования биологически активных белков

Вопросы, относящиеся к механизму образования биологически активных белков, и проблема зависимости их активности от структуры связаны между собой, и, следовательно, успех в любой из этих областей будет способствовать решению обеих задач. Если механизм образования связан с полным синтезом белка, то, вероятно, в настоящее время исследования в этой области будут малоэффективными, если же этот механизм заключается в частичном синтезе или в активации неактивного предшественника, то можно получить ценные сведения.

1) ФЕРМЕНТЫ

Активацию *in vitro* следует рассматривать как явление, свойственное, по-видимому, исключительно ферментам. Они могут не

проявлять своего каталитического действия до тех пор, пока не добавлены коферменты, весьма различные по сложности форм: от ионов металла до нуклеотидов. В других случаях для активирования фермента необходимо образование сульфгидрильных групп при помощи восстанавливающего агента или проведение частичного гидролиза, как, например, в случае пепсиногена.

Различие между ферментами, содержащими простетическую группу, и ферментами, являющимися простыми белками, для проявления активности которых требуются коферменты, часто основано только на степени легкости, с какой белок отделяется от небелкового компонента. Возможно, сложный фермент правильнее определять как фермент, простетическая группа которого не может быть удалена обратимо, т. е. без разрушения белка. Химическая природа многих простетических групп и коферментов, а также их роль в катализе в настоящее время установлены. Однако мы располагаем лишь незначительными сведениями о характере связи простетических групп с белком и почти не имеем данных о том, каким образом белок придает специфичность и каталитическую активность, во много тысяч раз превышающую активность каждого из них в отдельности. Активация простетической группы или кофермента белком—явление, вероятно, очень похожее на прямую активацию субстрата; их наличие в определенных участках цепи может быть использовано для выяснения последовательности в расположении пептидных связей, непосредственно участвующих в активации. Образование фермента в результате гидролиза неактивного предшественника представляет тип активации, совершенно отличный от упомянутых выше. О превращении химотрипсиногена в химотрипсин уже говорилось. Автокаталитическое образование пепсина из пепсиногена имеет ту интересную особенность, что при определенных условиях часть отщепившегося небелкового азота может быть выделена в виде пептида с молекулярным весом 5000 [167]. Этот высокомолекулярный пептид действует на пепсин как ингибитор, но это действие проявляется только при pH 5, так как в более кислом растворе пепсин очень быстро гидролизует ингибитор. Это—необычный пример ингибитора, который при более благоприятных условиях катализа сам становится субстратом. Участвует ли пептид в какой-то степени в экранировании потенциальных активных центров пепсиногена, не установлено, однако ясно, что в пепсиногене должны быть и некоторые другие стабилизующие факторы.

2) АНТИТЕЛА И АДАПТИВНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Образование антител и адаптивных ферментов представляет два таких процесса, при которых получение специфически активного белка *in vivo* можно по желанию стимулировать. В первом случае вновь образованный белок можно выделить и идентифицировать

как таковой, во втором случае о его присутствии судят по повышению ферментативной активности. Очищенный адаптивный фермент, однородный по всем свойствам, еще не получен [168], хотя нет оснований предполагать, что его получение должно вызывать какие-то особые затруднения.

Что касается возникновения антител у животных, то почти не остается сомнений в том, что происходит не стимулирование образования уже существующего белка, а возникновение белка с новыми специфическими свойствами. Диапазон специфичности, который можно достичь, применяя искусственно полученные антигены, слишком велик, чтобы объяснить это иначе. Образование адаптивных ферментов у микроорганизмов еще не изучалось достаточно полно в иммунохимии, но, по-видимому, в этом случае скорее происходит процесс стимулирования, чем синтез нового белка. Из известных в настоящее время адаптивных ферментов большинство имеет основной уровень [169—172], т. е. они обнаруживаются без добавления субстрата к питательной среде, хотя иногда их идентификация и вызывает некоторые трудности. Если это так, то адаптацию следует рассматривать как усиленное образование ферментов, и она должна значительно отличаться от образования антител. Были обнаружены и другие существенные различия. Так, весьма близкие штаммы бактерий вырабатывают различные адаптивные ферменты (например, образование лактазы [173] и тетратионазы [174] в группе бактерий, сходных с кишечной палочкой). Способность адаптироваться к данному субстрату путем образования специфического фермента наследуется, как и всякие другие характерные для бактерий свойства. С другой стороны, хотя обычно животные одного вида не одинаково реагируют на один и тот же антиген, доказательства того, что этот признак является наследственным, отсутствуют.

Значение этих явлений для рассматриваемого вопроса заключается в том, что новая биологическая активность, по-видимому, возникает при сравнительно простом превращении неактивного предшественника и не требует сложного синтеза нового белка из пептидов или аминокислот. Так ли обстоит дело в действительности, неизвестно, но в иммунологии получено достаточное количество данных для создания нескольких конкурирующих теорий относительно образования антител.

Брейнл и Гауровитц [175], Александер [176], Мад [177] и Барнет [178] высказали предположение, согласно которому антиген вызывает образование антитела, участвуя в синтезе сывороточного глобулина либо непосредственно, образуя матрицу, вокруг которой происходит синтез, либо косвенно, изменяя систему синтеза белка. Барнет [178] привел доказательства в пользу последней точки зрения. Ни одна из этих теорий не исключает возможности существования химического различия между антителами и нормальным глобулином. В противоположность этому Паулинг [179] считает, что

образование антитела в присутствии антигена происходит вследствие раскручивания молекулы преформированного γ-глобулина. По этой теории, биологическая активность зависит только от конфигурации, и предположение о том, что специфичность, по существу, одной и той же белковой молекулы может быть бесконечно разнообразна, представляет большой интерес. Многие детали теории Паулинга несовместимы с экспериментальными данными [178], но важное предположение о том, что все антитела и инертные глобулины построены из одних и тех же аминокислот, расположенных в том же порядке и связанных друг с другом теми же ковалентными связями, еще не опровергнуто. Неоднородность γ-глобулинов у животных была установлена изучением электрофоретической подвижности [180], ультрацентрифугированием [181] и высаливанием [182]. У лошади антибелковые антитела обнаруживаются в новой электрофоретической фракции [183]; молекулярный вес антиуглеводных антител превышает молекулярный вес нормального глобулина [184], но в обоих случаях с этими новыми фракциями связано некоторое количество инертного глобулина. До сих пор ни разу активность антител нельзя было связать исключительно с их особыми химическими или физическими свойствами. Насколько известно, значительных различий в аминокислотном составе антител и других глобулинов не обнаружено [31—34]. В антиовальбумине кролика и инертном γ-глобулине, с которым он связан, можно было определить только N-концевые остатки аланина. В обоих белках в концевом пептиде аминокислоты чередовались в следующем порядке: аланил—лейцил—валил—аспарагил—глутамил [73]. По-видимому, молекулы γ-глобулина кролика, включая фракцию, осаждаемую овальбумином, состоят из единичных длинных полипептидных цепей, имеющих одинаковый порядок чередования аминокислот если не по всей длине цепи, то на какой-то ее части. Работы с мечеными аминокислотами [185] показывают, что обмен антител и других глобулинов протекает как будто с одинаковой скоростью. Заметной разницы между антигенной специфичностью различных антител и инертных глобулинов в пределах одного вида не отмечено.

До сих пор не удалось связать какие-либо химические или физические характерные особенности глобулина с его функцией как антитела, и это является подтверждением теории Паулинга, что биологическая активность зависит только от конфигурации, которая в свою очередь определяется лабильными связями. Однако это негативные доказательства, и их нельзя считать убедительными до тех пор, пока не будут получены дополнительные данные о структуре глобулина. Два факта, хотя и с трудом, все же можно объяснить с точки зрения теории Паулинга. Один из них, установленный Эриксоном и Нейратом [44], заключается в том, что антипневмококковые антитела не теряют активности при денатурации солянокислым гуанидином и мочевиной. Однако денатурированная анти-

сыворотка нерастворима в солевом растворе, и чтобы выявить ее активность, ее растворяли в растворе тиоцианата натрия. Установлено, что нативный и денатурированный нормальные глобулины по своим антигенным свойствам ближе друг к другу, чем к нативным и денатурированным глобулинам антител. Второе наблюдение заключалось в том, что при восстановлении дисульфидных связей в антиовальбумине кролика скорость флоккуляции при взаимодействии с антигеном уменьшается, однако способность к связыванию антигена остается [73]. В обоих случаях должны были произойти изменения конфигурации молекулы, но они могли ограничиться частью молекулы, не содержащей активных центров. Значительные различия в специфичности у неразличимых иными способами белков свойственны только антителам, так как ферменты, антигены и гормоны сильно отличаются по своим физическим и химическим свойствам, хотя связь между этими свойствами и биологической активностью еще не установлена. Несмотря на кажущиеся противоречия, это явление, по-видимому, можно объяснить на основе чисто структурных соображений. Однако до сих пор нет никаких прямых доказательств этого предположения.

Ж. Исследование природы биологической активности белка

Чтобы изучить вопрос о связи между биологической активностью белка и его структурой, необходимо располагать исчерпывающими данными о природе реакций, в которых проявляется эта активность. Для этого наиболее целесообразно изучать изолированные системы *in vitro* с очищенными компонентами. Изящные исследования Кейлина [186] цитохромной системы в таких живых объектах, как крылья пчел и дрожжевые клетки, показали, что это положение не обязательно. Но, по-видимому, этот случай представляет исключение. Когда образование антител или действие гормонов или токсинов изучают *in vivo*, то очень трудно решить, что́ считать первичным явлением и что́—вторичным. Исследования, проводимые *in vitro*, конечно, могут вызвать возражения, что полученные результаты не вполне соответствуют поведению активного белка в организме. Для настоящей цели, по-видимому, это не является серьезным возражением, так как любое объяснение активности, основанное на структуре белка, несомненно, ценно. Желательно также, чтобы методы, применяемые для исследования биологической активности, позволяли проводить наблюдения быстро и непрерывно. Только при помощи таких методов можно выяснить вопрос, достигается ли окончательный результат в один или в несколько этапов.

1) ФЕРМЕНТЫ

Множество исследований, касающихся механизма действия ферментов, было посвящено тщательному изучению их специфичности. Эти работы значительно обогатили имеющиеся сведения о поведении ферментов и позволили в нескольких случаях объяснить их действие на основе данных о структуре активных центров. Этот вопрос обсуждается в другом разделе настоящей главы. Исследования кинетики проводились на основании концепции, предложенной Михаэлисом и Ментеном, а именно, что образование комплекса фермент-субстрат является существенной промежуточной стадией каталитического процесса. Все проведенные исследования подтвердили это положение, и существование такого комплекса считается доказанным. Сравнительно недавно при помощи быстро проводимых наблюдений гемопротеинов в процессе катализа удалось непосредственно обнаружить комплекс такого рода. Впервые это осуществили в 1937 г. Кейлин и Манн [187] при работе с пероксидазой; впоследствии Чэнс [188] разработал методы непрерывной регистрации таких реакций. Он обнаружил, что пероксидаза хрена и перекись водорода образуют два промежуточных комплекса, как это видно из следующих уравнений:

$$FeOH + H_2O_2 \longrightarrow FeOOH\ [I] + H_2O,$$

$$FeOOH\ [I] \longrightarrow FeOOH\ [II],$$

$$FeOOH\ [II] + AH_2 \longrightarrow FeOH + H_2O.$$

Первоначальный комплекс I зеленого цвета быстро превращается в бледно-красный комплекс II, который, реагируя с акцептором, окисляет его и регенерирует свободную пероксидазу. Алкилированная перекись водорода реагирует аналогично.

Подобный же зеленый комплекс образуется и с каталазой. Он вступает в реакцию со второй молекулой перекиси водорода, которая сопровождается выделением кислорода и регенерированием свободной каталазы [189]. Этот комплекс может вступать в реакцию с рядом веществ, которые он окисляет, подобно пероксидазе, но реакция идет в 10^4—10^5 раз медленнее, чем реакция со второй молекулой H_2O_2. Каталаза также образует второй красный комплекс, если фермент некоторое время соприкасается с перекисью водорода [190]. Этот комплекс неактивен и не является промежуточным в каталитических реакциях, как это наблюдается в случае красного комплекса пероксидазы с перекисью водорода. Все эти и другие работы по механизму действия окислительных ферментов хорошо освещены в обзоре Херберта [191]. Однако роль белка в этих сложных ферментах до сих пор остается невыясненной.

2) РЕАКЦИИ АНТИТЕЛ С АНТИГЕНАМИ

В результате взаимодействия антитела с антигеном *in vivo* могут произойти нейтрализация токсического антигена и агглютинация, лизис или усиленный фагоцитоз клеточного антигена; однако из исследований, проведенных *in vitro*, следует, что первоначальная стадия реакции заключается в соединении антигена с антителом. Выводы, сделанные на основании работ, в которых изучалась степень специфичности этой реакции, уже обсуждались. Влияние концентрации реагентов, температуры и присутствия ингибиторов на скорость соединения изучали на очищенных белковых антигенах. Были разработаны методы исследования, основанные на измерении светорассеяния [192], которые позволят вести непрерывные наблюдения над изменением величины макромолекул. Одновременно появились две статьи, описывающие применение этого метода к системе антитело—антиген. Гольдберг и Кэмпбелл [193] изучили реакцию между сывороточным альбумином быка и соответствующим ему очищенным антителом кролика. Немедленно после смешения образуется комплекс, величина частиц которого постепенно возрастает, вплоть до образования осадка, причем появление видимой мути не изменяет никаких других свойств. Гитлин и Эдельхох [194] смешивали сывороточный альбумин человека с гомологичным антителом лошади. В этой системе при избытке антитела или антигена осаждение не происходит, но было отмечено появление растворимых комплексов, частицы которых увеличивались до максимальных размеров, причем конечное состояние достигалось быстрее в зоне избытка антигена. Все реакции были обратимыми, растворение осадка при добавлении антигена также происходило быстрее, чем при добавлении антитела.

Интересно установить состав комплексов в период увеличения размеров их частиц, степень их однородности в каждый данный момент, а также какое из свойств—изменение стабильности, величина частиц комплекса или состав—в большей мере определяет их растворимость. Такие данные наряду с результатами термодинамических исследований Бойда [195], которые имели целью установить тип связей, образующихся в этих реакциях, могут дать более ясное представление об истинном механизме соединения.

3) ДАЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИЕ СИЛЫ

Вся концепция о необходимости тесного контакта между ферментом и его субстратом, а также между антигеном и антителом была поставлена под вопрос в работе Розена с поверхностными пленками. Новое представление о том, что взаимодействие между белками может происходить под влиянием дальнодействующих сил, было

предметом продолжительных дискуссий. В недавно опубликованной статье Розен [196] обобщил свои взгляды. Зингер [197] подверг эту работу критической проверке. Экспериментальные данные Розена были подтверждены в нескольких лабораториях, но объяснение этих данных отвергалось большинством исследователей. Полученные при этом данные можно суммировать следующим образом.

1. Мономолекулярные пленки некоторых белков, особенно сывороточного альбумина рогатого скота, сохраняют способность специфически соединяться с гомологичными антителами, о чем можно судить по увеличению толщины пленки после контакта с антисывороткой.

2. При обработке раствором трипсина такие слои теряют способность соединяться с антителами, вероятно в результате протеолитического переваривания.

3. Иммунологическая и ферментативная активность сохраняются даже тогда, когда первоначальный слой сывороточного альбумина защищен от контакта с антителами инертным барьером в виде пленки стеарата бария, формвара (поливинилметилальной смолы) и других полимеров. Действие проявляется даже при толщине барьера в несколько сот ангстрем.

4. Предотвратить взаимодействие могут пленки из таких веществ, как металлы или парлодион (коллодий), только при толщине 5—20 Å.

5. Количественные результаты, выражающиеся в толщине адсорбированного слоя антител или в толщине экрана, необходимого для предотвращения реакции, зависят от таких условий, как pH, при котором наносились первоначальные белковые пленки, и природы буфера, использованного для растворения антитела и трипсина. Если сывороточный альбумин нанесен на пластинку в виде нескольких последовательных слоев, то количество удерживаемого антитела и толщина защитного барьера, необходимого для предотвращения взаимодействия, больше, чем при одном слое.

Розен рассматривает эти данные как доказательство наличия сил, действующих на расстоянии 50—200Å. Основное возражение заключается в том, что дефекты структуры слоев белка и защитного вещества не исключают возможности существования отверстий, через которые антитело или фермент могут диффундировать к пленкам антигена. Айбол [198] установил, что если даже исходное количество этих отверстий очень мало, то в результате последующей реакции между антителом и антигеном, протекающей под защитным слоем, могут произойти дальнейшие разрывы пленки. Трюрни [199, 200] наблюдал, что фосфатные буферы обладают свойством смещать первоначальную пленку, и допускал, что антиген может диффундировать к наружной поверхности. Розен отверг оба эти предположения, но аргументов «за» и «против» слишком много, чтобы их

здесь обсуждать. Он полагал, что или специфические дальнодействующие силы действуют через защитные слои, или эти силы обусловливают встречную диффузию компонентов реакции, которая при других условиях невозможна. Если исходить из второго предположения, то специфическая реакция произойдет при сближении. Эта работа создает впечатление, что возможности метода поверхностных пленок уже исчерпаны и что окончательное подтверждение существования этих новых сил можно получить только при использовании других методов. Действительно, есть данные о дальнодействующем протеолизе, происходящем в растворе через бумажные мембраны, пропитанные коллодием и некоторыми полимерами [201], но эти данные требуют подтверждения.

Поскольку нет убедительных опровергающих данных, в настоящее время считают, что ферментативный катализ и иммунологические реакции зависят от тесного контакта между реагентами, по-видимому имеющегося на участках со значительной поверхностью. Высокая степень специфичности биологического действия белков является общим их свойством и, вероятно, зависит в некоторых отношениях от близкого контакта с активным белком. Число таких контактов в каждой данной реакции, их длительность и действующие силы в большинстве своем неизвестны.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании рассмотренных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы.

1. Аминокислотный состав белков не имеет прямого отношения ни к механизму биологической активности, ни к их специфичности. Имеющиеся исключения недостаточно убедительны.

2. Химическая природа и механизм действия многих коферментов и простетических групп уже установлены, но в решении вопроса о влиянии белка на эти соединения больших успехов не достигнуто.

3. Взаимосвязь между основными физическими свойствами, например величиной и формой молекулы, электрофоретической подвижностью или растворимостью и биологической активностью белков, до сих пор не установлена.

4. Денатурация белка обычно уничтожает его специфическую биологическую активность, однако для некоторых ферментов эта деструкция может быть обратимой, что доказывается восстановлением активности. Это явление очень сложно, и пока еще не нашло достаточно удовлетворительного объяснения.

5. Белки, обладающие весьма различной специфичностью, могут иметь чрезвычайно сходную структуру, и, наоборот, белки с почти одинаковой биологической активностью могут иметь различную структуру.

6. Сравнительные исследования подчеркнули зависимость биологической активности от структуры белка, не вскрыв основы этой взаимосвязи.

7. Блокирование реакционноспособных групп в белках показало, что в проявляемой различными белками активности существенная роль может принадлежать различным полярным группам. Технические трудности заставляют интерпретировать положительные результаты с большой осторожностью. Объем имеющихся количественных данных весьма невелик. Блокирование активных групп некоторых ферментов можно предотвратить, применяя субстрат или ингибитор.

8. Применение небольших молекул определенной структуры таких веществ, как гаптены или ферментные субстраты и ингибиторы, помогло детально разработать вопрос об условиях, необходимых для проявления специфичности в случае некоторых белков. Из экспериментальных данных можно сделать некоторые выводы о природе активных центров, о механизме их действия и о силах, принимающих участие в обсуждаемых процессах.

9. При изучении частичного гидролиза установлено, что биологическая активность может сохраниться в выделенном фрагменте белка, однако такие фрагменты имеют значительную величину. В настоящее время считают, что это явление не может быть общим.

10. При изучении механизма образования активных белков получено еще мало данных о взаимосвязи структуры и активности.

11. Ферментативные и иммунологические реакции, вероятно, происходят в несколько стадий. По-видимому, имеет место обратимое соединение реагентов с белком.

Из этих наблюдений можно сделать вывод о том, что биологическая активность белка зависит от структуры небольшой части его поверхности, которая обратимо связывается с другими реагентами. В некоторых случаях структура активных центров не зависит от всей молекулы в целом, но в других случаях дело обстоит иначе. Активные центры характеризуются наличием полярных групп, которые в некоторых белках для проявления активности должны быть заряжены. Пространственная конфигурация является очень важным свойством и может зависеть как от лабильных, так и от ковалентных связей в молекуле. Возможно, что незначительные изменения этой конфигурации могут происходить без потери активности.

За неимением опровергающих данных предполагают, что свойства активных центров в конечном счете можно объяснить, исходя из известных свойств боковых цепей аминокислотных остатков, соединенных вместе пептидными связями и имеющих особую трехмерную конфигурацию. Не исключена возможность, что эти боковые цепи могут каким-либо образом вступать во взаимодействие с небольшими, еще не известными группировками или замещаться ими.

Возможность такого явления в молекулах, построенных только из аминокислот, подтверждается особыми химическими свойствами грамицидина [202]. Исследования конденсации диизопропилфторфосфата с химотрипсином, находящиеся пока в предварительной стадии, дают основание предполагать, что подобные неожиданные группировки могут существовать и в белках и быть связанными с их биологической активностью.

В свое время были выдвинуты теории, касающиеся механизма действия различных классов биологически активных белков, и некоторые из них явились стимулом для проведения успешных исследований. Вопрос о том, какую роль в действии ферментов играет простетическая группа или кофермент, в некоторых случаях был в значительной мере разрешен. Большинство теорий при объяснении роли белков ограничивается весьма общими положениями.

Соединение очищенного антигена с его антителом, казалось бы, является простейшим примером проявления специфической биологической активности, но в действительности эта реакция состоит из нескольких этапов, протекающих относительно медленно и дающих в результате или нерастворимый осадок, или большие частицы растворимого комплекса. Эти частицы комплекса могут иметь весьма различный состав, зависящий от количественных соотношений реагирующих компонентов. Число активных центров в нативном белковом антигене или антителе еще точно не установлено. Основы структуры таких соединений известны пока только в весьма общих чертах, не позволяющих провести решающей проверки.

Исследования механизма действия других белков, активность которых проявляется только *in vivo*, не привели к обсуждению структурных основ их биологической активности. Некоторые токсины являются ядами потому, что они — ферменты и каталитически ускоряют процессы деструкции клеток или тканей. Механизм действия не был выяснен не только для белковых гормонов, но и для химически более простых гормонов. На основании имеющихся данных можно предположить, что инсулин оказывает свое действие, влияя на одну из ферментных систем, участвующих в углеводном обмене. Возможно, объяснению действия токсинов и гормонов с точки зрения их структуры будет способствовать разрешение проблемы ферментативной активности. Разрешение этого вопроса для вирусов и генов является еще более отдаленной проблемой.

В будущем изучении этих проблем успех будет зависеть от возможности сведения их к наиболее простым вопросам. Ферментативные и иммунологические реакции могут быть упрощены до специфического соединения очищенного белка с небольшими молекулами известной структуры, если при этом применяются ингибиторы или гаптены, хотя в подобных случаях специфическое соединение может осложняться явлением неспецифической адсорбции. Если размеры

частиц белка можно уменьшить без потери активности, то соответственно упрощаются и проблемы, связанные со структурой. Благодаря замечательным работам Сангера и др. [203—205] по химии инсулина впервые полностью стал известен порядок расположения аминокислотных остатков в молекуле белка. В этом случае можно построить полную модель молекулы инсулина, хотя вопрос, чем именно определяется его биологическая активность, остается попрежнему нерешенным. Если аналогичные успехи будут достигнуты для ферментов или антител, то возможно, что параллельное исследование факторов, необходимых для проявления специфичности, которое в отдельных случаях уже обогатило наши знания об активных центрах, поможет установить основной участок молекулы, определяющий биологическую активность. Решить вопрос о пространственной структуре белка, по-видимому, легче в том случае, когда белок исключительно устойчив по отношению к денатурирующим агентам и, следовательно, его конфигурация определяется главным образом ковалентными связями.

Вероятно, первым шагом в разрешении этого вопроса будет выяснение механизма специфического обратимого связывания небольших молекул белком. Однако, как это часто случается при решении столь обширных проблем, разгадка может быть найдена в результате исследований, ведущихся в совершенно ином направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sumner J. B., J. Biol. Chem., **69**, 435, 1926.
2. Abel J. J., Geiling E. M. K., Rouiller C. A., Bell F. K., Wintersteiner O., J. Pharmacol. Exptl. Therap., **31**, 65, 1927.
3. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **13**, 739, 1930.
4. Northrop J. H., Kunitz M., Science, **73**, 262, 1931.
5. Kunitz M., Northrop J. H., Science, **78**, 558, 1933.
6. Ambrose J. F., Kistiakowsky G. B., Kridl A. G., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1232, 1951.
7. Pedersen K. O., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 140, 1949.
8. Landsteiner K., Longsworth L. G., Van der Scheer J., Science, **88**, 83, 1938.
9. Tint H., Reiss W., J. Biol. Chem., **182**, 385, 1950.
10. Velick S. F., J. Phys. & Colloid Chem., **53**, 135, 1949.
11. Paul K. G., in Sumner and Myrbäck, The Enzymes, vol. 2, part 1, Academic Press, Inc., New York, 1951.
12. Sumner J. B., Science, **108**, 410, 1948.
13. Bailey K., Chemistry and Industry, **1950**, 243.
14. Chibnall A. C., J. Intern. Soc. Leather Trades Chemists, **30**, 1, 1946.
15. Brand E., quoted by Northrop J. H., Kunitz M. and Herriott R. M., Crystalline Enzymes, Columbia University Press, New York, 1948.
16. Fromageot C., Privat de Garilhe M., Biochim. Biophys. Acta, **3**, 82, 1949.
17. Clutton R. F., Harington C. R., Yuill M. E., Biochem. J., **32**, 1111, 1119, 1938.
18. Hopkins S. J., Wormall A., Biochem. J., **27**, 1706, 1933.

19. Markham R., Matthews R. E. F., Smith K. M., Nature, **162**, 88, 1948.
20. Smith E. L., Greene R. D., J. Biol. Chem., **167**, 833, 1947.
21. Roche J., Michel R., Tichadou M. B., Compt. rend. soc. biol., **144**, 100, 1950.
22. Rockland L. B., Dunn M. S., J. Am. Chem. Soc., **71**, 4121, 1949.
23. Neuman R. E., Arch. Biochem., 24, 289, 1949.
24. Bergmann M., Niemann C., J. Biol. Chem., **118**, 301, 1937.
25. Vickery H. B., White A., Proc. Soc. Exptl. Boil. Med., **31**, 6, 1933.
26. Tristram G. R., Haemoglobin, Butterworths Scientific Publications, London, 1949.
27. Csonka F. A., Denton C. A., Ringel S. J., J. Biol. Chem., **169**, 259, 1947.
28. Jacobsen C. F., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **26**, 455, 1949.
29. Knight C. A., J. Biol. Chem., **171**, 297, 1947.
30. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **46**, 513, 1950.
31. Calvery H. O., J. Biol. Chem., **112**, 167, 1935.
32. Smith E. L., J. Biol. Chem., **164**, 345, 1946.
33. Smith E. L., Green R. D., Bartner E., J. Biol. Chem., **164**, 359, 1946.
34. Velluz L., Compt. rend. soc. biol., **116**, 981, 1934.
35. Callow R. K., Work T. S., Biochem. J., **51**, 558, 1952.
36. Mirsky A. E., Pauling L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **22**, 439, 1936.
36a. Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **37**, 251, 1951.
37. Waugh D. F., J. Am. Chem. Soc., **70**, 1850, 1948.
38. Porter R. R., Biochem. J., **46**, 304, 1950.
39. Anson M. L., Advances in Protein Chem., **2**, 361, 1945.
40. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **16**, 323, 1932.
41. Kunitz M., Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **18**, 433, 1935.
41a. Kearney E. B., Singer T. P., Arch. Biochem. and Biophys., **33**, 337, 1951.
42. Hofstee B. J. H., J. Gen. Physiol., **32**, 339, 1949.
43. Rapkine L., Shugar D., Siminovitch L., Arch. Biochem., **26**, 33, 1950.
44. Erickson J. O., Neurath H., J. Gen. Physiol., **28**, 421, 1944.
45. Corter E., Nature, **142**, 1024, 1938.
46. Langmuir I., Schaefer V. J., J. Am. Chem. Soc., **60**, 1351, 1938.
47. Rothen A., J. Biol. Chem., **168**, 75, 1947.
48. Nuttall G. H. F., Blood Immunity and Blood Relationship, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1904.
49. Wells H. G., Osborne T. B., J. Infectious Diseases, **19**, 183, 1916.
50. Heidelberger M., Landsteiner K., J. Exptl. Med., **38**, 561, 1923.
51. Hektoen L., Schulhof K., J. Infectious Diseases, **33**, 224, 1924.
52. Hektoen L., Boor A. K., J. Infectious Diseases, **49**, 29, 1931.
53. Porter R. R., Sanger F., Biochem. J., **42**, 287, 1948.
54. Needham J., Biochemistry and Morphogenesis, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1942.
55. Scott D. A., Fisher A. M., Trans. Roy. Soc. Can., **34**, (V), 137, 1940.
56. Wasserman P., Mirsky I. A., Endocrinology, **31**, 115, 1942.
57. Porter R. R., Sanger F., Haemoglobin, Butterworths Scientific Publications, London, 1949.

58. Sanger F., Nature, **164**, 529, 1949.
59. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 149, 413, 1943.
60. Sayers G., White A., Long C. N. H., J. Biol. Chem., **149**, 425, 1943.
61. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **16**, 615, 1933.
62. Norris E. R., Elam D. W., J. Biol. Chem., **134**, 443, 1940.
63. Sprissler G. P., An Investigation of the Proteinase of the Gastric Mucosa of Shark, The Catholic University of America Press, Washington, D. C., 1942.
64. Gregory J. D., Craig L. C., J. Biol. Chem., 172, 839, 1948.
65. Harfenist E. F., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., **73**, 877, 1951.
65a. Harfenist E. F., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3083, 1952.
66. Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1893, 1951.
67. Martin A. J. P., Porter R. R., Biochem. J., **49**, 215, 1951.
67a. О дальнейшем развитии хроматографической техники см. также Porter R. R., Biochem. J., **53**, 320, 1953; Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **200**, 493, 1953; Tallan H. H., Stein W. H., J. Biol. Chem., **200**, 507, 1953.
68. Desreux V., Herriott R. M., Nature, **144**, 287, 1939.
69. Obermayer F., Pick E. P., Wien. klin. Wochschr., **16**, 569, 1903; ibid., **17**, 265, 1904; ibid., **19**, 327, 1906.
70. Landsteiner K., Lampl H., Biochem. Z., **86**, 343, 1917.
71. Herriott R. M., Advances in Protein Chem., **3**, 170, 1947.
72. Olcott H. S., Fraenkel-Conrat H., Chem. Revs., **41**, 151, 1947.
72a. Rudall K. M., Fibrous Proteins, Soc. Dyers and Colourists, London, 1946.
73. Porter R. R., Biochem. J., **46**, 473, 1950.
74. Eagle H., J. Exptl. Med., **67**, 495, 1938.
75. Mudd S., Joffe E. W., J. Gen. Physiol., **16**, 947, 1933.
76. Chow B. F., Goebel W. F., J. Exptl. Med., **62**, 179, 1935.
77. Blumenthal D., J. Biol. Chem., **113**, 433, 1936.
78. Kabat E. A., Heidelberger M., J. Exptl. Med., **66**, 229, 1937.
79. Little J. E., Caldwell M. L., J. Biol. Chem., **142**, 585, 1942.
80. Little J. E., Caldwell M. L., J. Biol. Chem., **147**, 229, 1943.
81. Weill C. E., Caldwell M. L., J. Am. Chem. Soc., **67**, 212, 1945.
82. Weill C. E., Caldwell M. L., J. Am. Chem. Soc., **67**, 214, 1945.
83. Fraenkel-Conrat H., Arch. Biochem., **27**, 109, 1950.
84. Balls A. K., Lineweaver H., J. Biol. Chem., **130**, 669, 1939.
85. Balls A. K., Lineweaver H., Nature, **144**, 513, 1939.
86. Herriott R. M., J. Gen. Physiol., **19**, 283, 1935.
87. Baccari V., Auricchio G., Boll. soc. ital. biol. sper., **21**, 49, 1946.
88. Zittle C. A., J. Franklin Inst., **246**, 266, 1948.
89. Greenberg D. M., Winnick T., J. Biol. Chem., **135**, 761, 1940.
90. Fraenkel-Conrat H., Bean R. S., Lineweaver H., J. Biol. Chem., **177**, 385, 1949.
91. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., Arch. Biochem., **9**, 259, **1946**.
92. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., Science, **90**, 140, 1939.
93. McShan W. H., Meyer R. K., J. Biol. Chem., **135**, 473, 1940.
94. Fraenkel-Conrat H., Simpson M. E., Evans H. M., Science, **91**, 363, 1940.
95. Harington C. R., Neuberger A., Biochem. J., **30**, 809, 1936.
96. du Vigneaud V., Fitch A., Pekarek E., Lockwood W. W., J. Biol. Chem., **94**, 233, 1931.

97. Carr F. H., Culhane K., Fuller A. T., Underhill. S. W. F., Biochem. J., 23, 1010, 1929.
98. Stern K. G., White A., J. Biol. Chem., 122, 371, 1938.
99. Glendening M. B., Greenberg D. M., Fraenkel-Conrat H., J. Biol. Chem., 167, 125, 1947.
100. Fraenkel-Conrat J., Fraenkel-Conrat H., Biochim. et Biophys. Acta, 5, 89, 1950.
101. Wood T. R., Ross W. F., J. Biol. Chem., 146, 59, 1942.
102. Tweedy W. R., Torigoe M., J. Biol. Chem., 99, 155, 1932.
103. Tweedy W. R., Bell W. P., Vicens-Rois C., J. Biol. Chem., 108, 105, 1935.
104. Sealock R. R., du Vigneaud V., J. Pharmacol., 54, 433, 1935.
105. Schramm G., Müller H., Z. physiol. Chem., 266, 43, 1940.
106. Pappenheimer A. M., Jr., J. Biol. Chem., 125, 201, 1938.
107. Barron E. S. G., Dick G. F., Lyman C. M., J. Biol. Chem., 137, 267, 1941.
108. Fraenkel-Conrat H., Fraenkel-Conrat J., Biochim. et Biophys. Acta, 5, 98, 1950.
109. Mommaerts W. F. H. M., Neurath H., J. Biol. Chem., 185, 909, 1950.
110. Hopkins F. G., Morgan E. J., Lutwak-Mann C., Biochem. J., 32, 1829, 1938.
110a. Potter V. R., Dubois K. P., J. Gen. Physiol., 26, 391, 1943.
111. Singer T. P., Brewers Digest, 20, 85T, 1945.
111a. Barron E. S. G., Advances in Enzymol., 11, 201, 1951.
112. Hellerman L., Chinard F. P., Deitz V. R., J. Biol. Chem., 147, 443, 1943.
113. Desnuelle P., Rovery M., Biochim. et Biophys. Acta, 3, 26, 1949.
114. Bailey K., Perry S. V., Biochim. et Biophys. Acta, 1, 506, 1947.
115. Mazur A., Bodansky O., J. Biol. Chem., 163, 261, 1946.
116. Dubois K. P., Mangun G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 64, 137, 1947.
117. Jansen E. F., Nutting M. D. F., Balls A. K., J. Biol. Chem., 175, 975, 1948.
118. Jansen E. F., Nutting M. D. F., Balls A. K., J. Biol. Chem., 179, 201, 1949.
118a. Balls A. K., Jansen E. F., Adv. Enzym., 13, 321, 1952.
119. Jansen E. F., Nutting M. D. F., Jang R., Balls A. K., J. Biol. Chem., 185, 209, 1950.
119a. Hartley B. S., Kilby B. A., Biochem. J., 50, 672, 1952.
120. Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1945.
121. Goebel W. F., J. Exptl. Med., 68, 469, 1938.
122. Goebel W. F., J. Exptl. Med., 69, 353, 1939.
123. Landsteiner K., Van der Scheer J., J. Exptl. Med., 55, 781, 1932.
124. Landsteiner K., Van der Scheer J., J. Exptl. Med., 59, 769, 1934.
125. Landsteiner K., Van der Scheer J., J. Exptl. Med., 69, 705, 1939.
126. Pressman D., Pauling L., J. Am. Chem. Soc., 71, 2893, 1949.
126a. Pardee A. B., Swingle S. M., J. Am. Chem. Soc., 71, 148, 1949.
126b. Karush F., J. Am. Chem. Soc., 72, 2705, 1950.
127. Bergmann M., Fruton J. S., Advances in Enzymol., 1, 63, 1941.
128. Neurath H., Schwert G. W., Chem. Revs., 46, 69, 1950.

129. Schwert G. W., Neurath H., Kaufman S., Snoke J. E., J. Biol. Chem., **172**, 221, 1948.
130. Snoke J. E., Neurath H., Arch. Biochem., **21**, 351, 1949.
131. Snoke J. E., Schwert G. W., Neurath H., J. Biol. Chem., **175**, 7, 1948.
131a. MacAllister R. V., Niemann C., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3855, 1949.
132. Smith E. L., Federation Proc., **8**, 581, 1949.
133. Smith E. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **35**, 80, 1949.
134. Smith E. L., Lumry R., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 168, 1949.
135. Neurath H., De Maria G., J. Biol. Chem., **186**, 653, 1950.
136. Wilson I. B., Bergmann F., J. Biol. Chem., **185**, 479, 1950.
137. Wilson I. B., Bergmann F., J. Biol. Chem., **186**, 683, 1950.
138. Bergmann F., Wilson I. B., Nachmansohn D., J. Biol. Chem., **186**, 693, 1950.
139. Wilson I. B., Bergmann F., Nachmansohn D., J. Biol. Chem., **186**, 781, 1950.
140. Wilson I. B., Biochim. et Biophys. Acta, **7**, 466, 1951.
141. Li C. H., Ann. Rev. Biochem., **16**, 291, 1947.
142. Li C. H., Conference on Metabolic Aspects of Convalescence, Josiah Macy Foundation, New York, 1948.
143. Brink N. G., Meisinger M. A. P., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **72**, 1040, 1950.
144. Astwood E. B., Cleroun A. P., Payne R. W., Ruben M. S., Bull. New England Medical Center, **12**, 2, 1950.
145. Cortis-Jones B., Crooke A. C., Henly A. A., Morris P., Morris C. J. O. R., Biochem. J., **46**, 173, 1950.
146. Tyslowitz R., Science, **98**, 225, 1943.
147. Lesh J. B., Fisher J. D., Bunding I. M., Kocsis J. J., Walaszek L. J., White W. F., Hays E. E., Science, **112**, 43, 1950.
148. Li C. H., Tiselius A., Pedersen K. O., Hagdahl L., Cartinsen H., J. Biol. Chem., **190**, 317, 1951.
149. Stack-Dunne M., Young F. G., J. Endocrinol., **7**, LXVI, 1951.
150. Tsou C. L., Nature, **164**, 1134, 1949.
151. Herriott R. M., J. Gen. Physiol., **22**, 65, 1938.
152. Kunitz M., Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **19**, 991, 1936.
153. Kunitz M., Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **18**, 433, 1935.
153a. Schwert G. W., Kaufman S., J. Biol. Chem., **180**, 517, 1949.
154. Kunitz M., J. Gen. Physiol., **22**, 207, 1938.
154a. Schwert G. W., J. Biol. Chem., **190**, 799, 1951.
154b. Schwert G. W., Kaufman S., J. Biol. Chem., **190**, 807, 1951.
154c. Smith E. L., Brown D. M., Laskowski M., J. Biol. Chem., **191**, 639, 1951.
155. Jacobsen C. F., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **25**, 327, 1947.
156. Landsteiner K., Chase M. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **30**, 1413, 1933.
157. Landsteiner K., J. Exptl. Med., **75**, 269, 1942.
158. Holiday E., Proc. Roy. Soc. (London), **A170**, 79, 1939.
159. Kleczkowski A., Brit. J. Exptl. Path., **26**, 24, 1945.
160. Parvetjev I. A., пат. США 2065196, 1936.
161. Pope C. G., Brit. J. Exptl. Path., **20**, 132, 1939.
162. Petermann M. L., Pappenheimer A. M., Jr., J. Phys. Chem., **45**, 1, 1941.
163. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., **25**, 465, 1942.

164. Pope C. G., Healey M., Brit. J. Exptl. Path., **20**, 213, 1939.
165. Porter R. R., Biochem. J., **46**, 479, 1950.
166. Marrack J. R., Chemistry of Antigens and Antibodies, H. M. Stationery Office, London, 1938.
167. Herriott R. M., J. Gen. Physiol., **24**, 325, 1941.
168. Cohn M., Monod J., Biochim. et Biophys. Acta, **7**, 153, 1951.
169. Mirick G. S., J. Exptl. Med., **78**, 255, 1943.
170. Pollock M. R., Brit. J. Exptl. Path., **27**, 419, 1946.
171. Pollock M. R., Brit. J. Exptl. Path., **31**, 739, 1950.
172. Wainright S. D., Brit. J. Exptl. Path., **31**, 495, 1950.
173. Monod J., Colloques Internationaux du C.R.N.S. VIII, Unités Biologiques Douées de Continuité Génétique, Paris, 1949.
174. Knox R., Gell P. G. H., Pollock M. R., J. Hyg., **43**, 149, 1943.
175. Breinl F., Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **192**, 45, 1930.
176. Alexander J., Protoplasma, **14**, 296, 1932.
177. Mudd S., J. Immunol., **23**, 423, 1932.
178. Burnet F. M., The Production of Antibodies, Macmillan, Melbourne, Australia, 1941 and 1948.
179. Pauling L., J. Am. Chem. Soc., **62**, 2643, 1940.
180. Deutsch H. F., Alberty R. A., Gosting L. J., J. Biol. Chem., **165**, 21, 1946.
181. Pedersen K. O., Ultracentrifuge Studies on Serum and Serum Function, Almquist and Wiksel, Uppsala, Sweden, 1945.
182. Derrien Y., Svensk. Kem. Tid., **59**, 139, 1947.
183. Fell N., Stern K. G., Coghill R. D., J. Immunol., **39**, 223, 1940.
184. Wyckoff R. W. G., Science, **84**, 291, 1936.
185. Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D., Heidelberger M., Tveffers H. P., J. Biol. Chem., **144**, 541, 555, 1942.
186. Keilin D., Ergeb. Enzymforsch., **2**, 239, 1933.
187. Keilin D., Mann T., Proc. Roy. Soc. (London), **B122**, 119, 1937.
188. Chance B., Arch. Biochem., **22**, 224, 1949.
189. Chance B., Acta Chem. Scand., **1**, 236, 1947.
190. Chance B., Biochem. J., **46**, 387, 1950.
191. Herbert D., Ann. Repts. on Progress Chem. (Chem. Soc. London), **47**, 335, 1950.
192. Doty P., Edsall J. T., Advances in Protein Chem., **6**, 37, 1951.
193. Goldberg R. J., Campbell D. H., J. Immunol., **66**, 79, 1951.
194. Gitlin D., Edelhoch H., J. Immunol., **66**, 67, 1951.
195. Boyd W. C., Conn J. B., Gregg D. C., Kistiakowsky G. B., Roberts R. M., J. Biol. Chem., **139**, 787, 1941.
196. Rothen A., Helv. Chim. Acta, **33**, 834, 1950.
197. Singer S. J., J. Biol. Chem., **182**, 189, 1950.
198. Iball J., Science, **109**, 18, 1949.
199. Trurnit H. J., Science, **111**, 1, 1950.
200. Trurnit H. J., Science, **112**, 329, 1950.
201. Hanig M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **73**, 381, 1950.
202. Synge R. L. M., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 191, 1949.
203. Sanger F., Tuppy H., Biochem. J., **49**, 463, 1951.
204. Sanger F., Tuppy H., Biochem. J., **49**, 481, 1951.
205. Sanger F., Thompson E. O. P., Biochem. J., **53**, 353, 363, 1953.

НУКЛЕОПРОТЕИДЫ И ВИРУСЫ

Р. Маркхэм и *Дж. Смит*

R. Markham, J. D. Smith, «Nucleoproteins and Viruses»
(vol. II, part A, pp. 1—122)

I. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

1. ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые кислоты находятся во всех живых клетках как животных, так и растений, и в соединении с белками содержатся во всех системах, принимающих участие в образовании составных частей клетки и синтезе белков.

Начало изучению нуклеиновых кислот было положено блестящей работой швейцарского физиолога Ф. Мишера [2]*, который в двадцатипятилетнем возрасте открыл, что главным компонентом ядра клетки является вещество, содержащее фосфор. Мишер в своих исследованиях стремился определить химический состав клеток, а Хоппе-Зейлер высказал предположение, что хорошим источником однородных клеток может служить гной. Среди различных компонентов клеток его интересовали главным образом клеточные ядра, их состав. Обрабатывая клетки сильно разбавленной соляной кислотой на холоду с последующим энергичным встряхиванием с эфиром и водой [3], ему удалось выделить свободные ядра клеток. В воде ядра клеток не изменялись, но в разбавленных растворах щелочей или солей они набухали. Щелочью было экстрагировано вещество, которое осаждалось уксусной или соляной кислотой. Это вещество давало биуретовую и ксантопротеиновую реакции, но по своим общим свойствам оно не было похоже ни на один из всех известных в то время белков.

Для получения большего количества материала Мишер применял различные методы выделения; действуя растворами неочищенного пепсина на обработанные спиртом клетки, он получил препарат, устойчивый к дальнейшей обработке ферментом. Новый препарат состоял «исключительно из выделенных клеточных ядер без всяких следов остаточной протоплазмы». Эту массу ядер, которая после обработки спиртом, вероятно, содержала некоторое количество денатурированного белка, он назвал «нуклеином», так как она представляла собой вещество, из которого образуются клеточ-

* Многие работы Мишера опубликованы в малодоступных журналах; большинство этих работ после смерти Мишера было перепечатано в сборнике [1].

ные ядра. Это вещество содержало около 14% азота, 1,77% серы и 4,5 % фосфора.

Обнаружив подобные вещества и в других тканях, Мишер сразу понял, что им открыта одна из важных функций фосфора в живых организмах.

Следующая его работа была посвящена «нуклеину» из яичного желтка, впоследствии оказавшемуся «парануклеином» [4], причем Мишер, очевидно, выделил денатурированный фосфопротеин.

По-видимому, самое значительное исследование, результаты которого были опубликованы в 1874 г., было произведено этим автором на сперматозоидах [5]. Мишер, как и в предыдущих своих исследованиях, воспользовался тем обстоятельством, что в семенной жидкости лосося нет других клеток, кроме сперматозоидов. Он установил, что промытые сперматозоиды содержат около 5% фосфора и 18,8% азота. Из обезжиренных клеток он экстрагировал кислотой протамин. Это вещество, обладающее сильно основными свойствами, по его вычислениям, содержало 28% азота и соединение, предположительно определенное им как ксантин (в действительности это был гуанин, обладающий до некоторой степени сходными с ксантином свойствами). Остаток, в котором еще находились оболочки головок сперматозоидов, содержал 8% фосфора и 13,5% азота. Обработкой суспензии этих головок избытком NaOH Мишер получил раствор, из которого при добавлении равного объема спирта, содержащего HCl (в присутствии NaCl), выпадал бесцветный осадок. В этом осадке совсем не было белка, и Мишер отождествил его с нуклеином, полученным им из клеток гноя. В осадке содержалось приблизительно 9,5 % фосфора, 12,5% азота, 37% углерода и 5% водорода, что, вероятно, соответствует составу нуклеиновой кислоты, частично лишенной пуринов. Мишер отметил, что этот нуклеин является многоосновной кислотой и присутствует в головках сперматозоидов главным образом в виде соли основного протамина. Он получил это соединение искусственным путем и показал, что протамина, содержащегося в головках сперматозоидов, не вполне достаточно для нейтрализации нуклеина; он установил также, что по сравнению с протамином нуклеин диффундирует довольно медленно.

Подобные же вещества были получены из спермы карпа и быка; Мишер показал, что в клетках спермы лягушки также содержатся нерастворимые в разбавленной кислоте соединения фосфора, и обнаружил, что эти клетки не содержат протамина.

Следует отметить, что Мишер интересовался преимущественно экстрагированием вещества ядра и основывал свою работу главным образом на опыте с клетками гноя, содержащего гистон, который, конечно, не удалялся при экстрагировании по его методу. Поэтому выделенный им «нуклеин» по своему составу варьировал в данном случае от частично денатурированного комплекса белок-нуклеи-

новая кислота до очень чистой, но, вероятно, отчасти деградированной нуклеиновой кислоты в случае «нуклеина», полученного из спермы лосося. Спустя несколько лет Альтман [6], в 1889 г. выделивший из дрожжей чистую, но деградированную (рибо-) нуклеиновую кислоту, предложил термин «нуклеиновая кислота» и высказал предположение, что «нуклеин» представляет собой просто смесь белка с нуклеиновой кислотой и что белок можно удалить щелочью.

В 1886 г. Коссель [7] показал, что получаемое из нуклеиновых кислот основание, которое считалось гипоксантином, в действительности является аминопурином, а именно аденином. В 1893 г. тот же автор [8], исследуя выделенную из дрожжей нуклеиновую кислоту, обнаружил, что она отличается от других нуклеиновых кислот содержанием восстанавливающего углевода, который был выделен путем гидролиза разбавленной серной кислотой; изучение его свойств показало, что этот углевод является пентозой. В то время Косселю было хорошо известно происхождение и значение нуклеиновой кислоты, что можно видеть из его высказывания: «То, что гистологи называют хроматином, в действительности представляет собой соединения нуклеиновых кислот с бóльшим или меньшим количеством белка. В некоторых случаях это вещество, вероятно, является чистой нуклеиновой кислотой». Коссель впервые применил термин «простетическая группа», чтобы определить связь между нуклеиновой кислотой и белком, которая, по его утверждению, состоит в том, что физиологические свойства нуклеиновой кислоты зависят от ее исключительной способности соединяться с белками.

В 1894 г. Коссель [9] установил различие между собственно «нуклеинами» и парануклеинами, подобными полученным Мишером и другими исследователями из яичного желтка и молока (казеина), основываясь на том, что в последних нет «нуклеиновых оснований», или, как их теперь называют, пуринов, хотя они и содержат связанный фосфор.

Коссель и Нейман [10] в 1894 г. рассматривали пиримидины, цитозин и тимин как продукты гидролиза «адениловой кислоты». Этот термин они применили для обозначения типа дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученной из зобной железы. Последнее из главных оснований—урацил—было найдено в 1900 г. Асколи [11] в нуклеиновой кислоте, выделенной из дрожжей.

В 1902 г. Осборн и Харрис [12] выделили из зародыша зерна пшеницы рибонуклеиновую кислоту, которую они назвали «тритиконуклеиновой кислотой». Оказалось, что она содержит аденин и гуанин приблизительно в эквимолярном соотношении, но в пиримидиновой фракции в большом количестве содержится урацил со следами цитозина (бóльшая часть которого, вероятно, была дезаминирована до урацила) в результате применения этими авторами чрезвычайно грубого метода гидролиза. В этой нуклеиновой кислоте ими было

установлено присутствие пентозы; отмечая сходство этой нуклеиновой кислоты с нуклеиновой кислотой из дрожжей, они предположили, что пентозосодержащие нуклеиновые кислоты, вероятно, характерны для растительных организмов, а другой тип нуклеиновых кислот—для животных. Хотя это мнение было выражено Осборном и Харрисом лишь предположительно, оно оставалось общепринятым в течение многих лет. Обсуждая связь нуклеиновых кислот с другими клеточными веществами, эти авторы высказали вполне справедливое замечание, что нуклеиновые кислоты вследствие чрезвычайно сильного сродства к белкам не могут не соединяться с последними.

В 1909 г. Левен и Джекобс достоверно установили, что углевод нуклеиновой кислоты из дрожжей является *d*-рибозой [13], но лишь в 1929 г. было установлено, что углевод нуклеиновых кислот «животного» типа представляет собой 2-дезоксирибозу [14].

А. Тетрануклеотидная гипотеза

Данные, относящиеся к нуклеиновым кислотам, полученные в начале развития химии этих кислот, наводили на мысль, что оба типа нуклеиновых кислот содержат по четыре вида нуклеотидов и что, по-видимому, эти нуклеотиды присутствуют в нуклеиновых кислотах приблизительно в эквивалентных соотношениях, насколько об этом можно судить по результатам весьма грубых методов анализа, применявшихся в то время. Поэтому не удивительно, что химики с их склонностью округлять цифровые данные анализа для упрощения структурных формул органических соединений пришли к выводу, что в нуклеиновой кислоте каждого типа действительно содержатся только четыре вида нуклеотидов. Таково происхождение тетрануклеотидной гипотезы, которая в той или иной форме удерживалась в продолжение более 40 лет и была причиной множества бесплодных трудов и дискуссий.

Уже в 1902 г. Осборн и Харрис [12] отметили, что среди химиков, исследовавших нуклеиновые кислоты, преобладало мнение о том, что молекула нуклеиновой кислоты содержит 4 атома фосфора. Названные авторы применили к такой предполагаемой структуре свои результаты анализа рибонуклеиновой кислоты зародыша зерна пшеницы, хотя считали, что в этой нуклеиновой кислоте содержатся только аденин, гуанин и урацил, и, следовательно, им пришлось допустить, что в каждой молекуле имеется два остатка урацила. Несколько лет спустя Штейдель [15], приняв тетрануклеотидную гипотезу в качестве рабочей гипотезы для тимонуклеиновой кислоты, старался подогнать данные своих анализов к принятой теории, несмотря на то, что найденное им количество цитозина составляло лишь 54% того, что требовалось по этой теории. Однако всеобщее признание тетрануклеотидная гипотеза получила главным образом

благодаря Левену [16], который, обладая большим научным авторитетом, придал ей убедительность и даже приводил теоретические цифры Штейделя в качестве фактического подтверждения этой теории [17].

К сожалению, методы, применявшиеся для выделения нуклеиновой кислоты из дрожжей, давали сильно деградированные образцы с короткими цепями длиной в среднем от трех до пяти единиц, в соответствии с методами обработки материала и фракционирования, применявшимися в последующих стадиях осаждения. Таким образом, физические методы способствовали сохранению тетрануклеотидной теории. Однако исследования путем электрометрического титрования не дали ожидаемых результатов, и получаемые данные даже не были воспроизводимы у разных исследователей. Все это вместе с энзиматическими исследованиями вызвало появление большого числа фантастических структурных формул нуклеиновой кислоты, доведенных до абсурда в работе Макино [18].

Постепенно начали приобретать значение исследования Сигнера, Касперссона и Хаммарстена [19], которые показали, что тщательно приготовленная тимонуклеиновая кислота состоит из очень больших молекул. В 1945 г. Галленд, Бэркер и Жордан [20] предложили иную гипотезу, предположив, что нуклеиновые кислоты являются скорее «статистическими», чем «структурными» тетрануклеотидами. Эта теория как будто давала возможность учитывать различие в степени первичной и вторичной ионизации гидроксильных групп в остатках фосфорной кислоты в нуклеиновых кислотах и объясняла расхождения в величинах молекулярных весов. Эта гипотеза просуществовала недолго; с появлением методов хроматографического анализа от нее полностью отказались, и этому в немалой степени способствовало представленное Уайтом [21] доказательство того, что многие нуклеиновые кислоты содержат по пять оснований, причем новым основанием является 5-метилцитозин, о котором много лет назад сообщалось [22] (ошибочно) как о компоненте туберкулиновой кислоты—дезоксирибонуклеиновой кислоты *Mycobacterium tuberculosis*.

В настоящее время известно, что число различных нуклеиновых кислот в действительности очень велико и, возможно, превосходит число белков и что нуклеиновые кислоты, выделяемые даже из таких небольших однородных частиц, как растительные вирусы, являются сложными смесями кислот различных типов.

Б. Распределение двух типов нуклеиновых кислот

Обнаружение рибонуклеиновых кислот как составных веществ растительных клеток двух типов, а именно дрожжей и зародышей пшеницы, привело к убеждению, что рибонуклеиновая кислота

встречается только в растительных тканях, хотя Левен и Джекобс [13] в 1909 г. доказали тождество углевода нуклеиновой кислоты из дрожжей с углеводом гуаниловой и инозиновой кислот, полученных из животных тканей. Как известно, предполагалось также, что другой тип нуклеиновой кислоты—дезоксирибонуклеиновая, или, как ее тогда называли, тимонуклеиновая кислота—встречается лишь в животных тканях. Однако в 1924 г. Джонс и Перкинс [23] доказали, что в поджелудочной железе, несомненно, содержится нуклеиновая кислота растительного типа.

В том же году Фёльген и Россенбек [24] на основе фёльгеновской реакции на тимонуклеиновую кислоту [25] разработали способ окрашивания ядра, давший возможность обнаруживать дезоксирибонуклеиновые кислоты в клетках; они установили, что эту реакцию дает зародыш пшеницы, но не тритиконуклеиновая кислота, получаемая из зародыша. Они также отметили сильную базофильную реакцию клеток зародышей пшеницы и предположили, что рибонуклеиновая (тритиконуклеиновая) кислота находится в цитоплазме, а не в ядрах клеток. Присутствие дезоксирибонуклеиновых кислот в растениях было подтверждено работой Кизеля и Белозерского [26], выделивших тимин из гороха и спор папоротника (*Aspidium*) [27]. В 1937 г. Фёльген [28] выделил ядра клеток зародышей ржи и показал, что в них содержится дезоксирибонуклеиновая кислота. Этими исследованиями более или менее четко была установлена связь дезоксирибонуклеиновой кислоты с ядрами клеток.

Реакцию рибонуклеиновых кислот с основными красителями, особенно с метиловым зеленым, использовали для обнаружения нуклеиновых кислот в тканях клетки. Сомнительно, чтобы этот метод давал очень ценные количественные данные. Здесь интересно отметить, что цитохимики по привычке употребляют термины «нуклеиновая кислота» и «нуклеопротеид» в качестве синонимов, возвращаясь в этом отношении к временам Мишера, но в то же время пользуются более специализированной номенклатурой для обозначения того, что́, вероятно, является только абстракцией.

Очень большие успехи в описательной цитохимии были достигнуты после появления проложившей новые пути работы Касперсона [29]. Последний воспользовался для микроскопических наблюдений локализации и внутриклеточного обмена нуклеиновых кислот ярко выраженной способностью этих кислот к поглощению в области коротковолновой ультрафиолетовой части спектра. Оптические трудности этого метода велики, так как во многих случаях светопоглощающий материал концентрируется в структурах, растворимых только частично; спектры поглощения имеют лишь поверхностное сходство со спектрами изолированных нуклеопротеидов, причем поглощение в большей своей части обусловлено такими факторами, как рассеяние света. Поэтому мнение сторонников

такого метода, что он дает количественно точные результаты, ошибочно, хотя никто не стал бы отрицать, что его применение позволяет получать ценные сведения.

Одним из результатов цитохимических исследований являлось некоторое видоизменение строгого различия между дезоксирибонуклеиновыми кислотами ядра и рибонуклеиновыми кислотами цитоплазмы. Рибонуклеиновая кислота, несомненно, присутствует в ядрах в небольших количествах; имеется сообщение [30], что дезоксирибонуклеиновая кислота была обнаружена в цитоплазме; при этом исключаются случаи, подобные тому, который наблюдается при наличии «каппа» фактора *Paramecium* (стр. 174), где присутствие дезоксирибонуклеиновой кислоты вне ядра связано с жизнедеятельностью паразита.

В. Нуклеопротеиды

Параллельно с исследованием структуры и распределения нуклеиновых кислот биохимики изучали комплексы нуклеиновой кислоты с белком, которые можно было экстрагировать из клеток. Многие из ранних работ не имеют никакой ценности, поскольку применялись такие способы обработки, которые приводили к денатурации белков и деполимеризации нуклеиновых кислот. Последние отличаются настолько сильным сродством к белкам, что простое смешивание тех и других в водном растворе дает комплексы, трудно разделимые на исходные компоненты, и, по-видимому, можно считать несомненным, что большинство описанных в литературе «нуклеопротеидов» являются артефактами. Если, как это теперь предполагают, нуклеиновые кислоты имеют отношение к образованию белков в клетках, то нет ничего неправдоподобного в том, что все белки возникают в виде нуклеопротеидов, и можно ожидать, что в каждой клетке будут найдены многие тысячи различных типов этих соединений. Однако в нормальных активных клетках эти нуклеопротеиды, по-видимому, существуют кратковременно, и только при самых необычных обстоятельствах какой-либо из них будет находиться в клетках как таковой в большом количестве.

С вирусами, особенно с молекулярными растительными вирусами, дело обстоит иначе. В этих сравнительно небольших молекулах минимально необходимые условия генетической последовательности и регулирования синтеза белков сосредоточиваются в отдельных паразитических частицах. Поэтому из зараженных вирусом растений можно выделить большое количество однородных нуклеопротеидов и изучать их, применяя различные методы. Все выделенные до сих пор молекулярные растительные вирусы являются рибонуклеопротеидами, тогда как большинство других вирусов, вероятно, состоит из нуклеиновых кислот обоих типов; исключе-

нием являются бактериофаги и полиэдровые вирусы насекомых, в которых, насколько известно, содержатся только дезоксирибонуклеиновые кислоты.

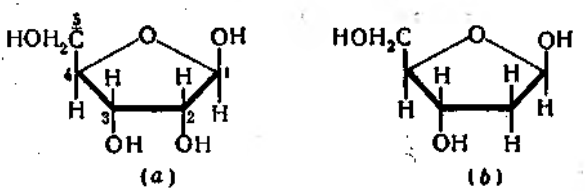
2. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

А. Состав нуклеиновых кислот*

Нуклеиновые кислоты являются полимеризованными молекулами, построенными из более простых веществ трех типов: 1) азотистых оснований—пуринов и пиримидинов, 2) пентозы и 3) фосфорной кислоты. Эти компоненты можно выделить из гидролизатов либо в чистом виде, либо в виде различных промежуточных соединений, из которых наиболее важными являются глюкозиды оснований, известные под названием нуклеозидов, и фосфорные эфиры последних—нуклеотиды. Соединением другого типа, которое можно выделить, является фосфорилированный сахар. Нуклеотиды находятся в таком же отношении к нуклеиновым кислотам, как аминокислоты к белкам, и хотя число пуринов и пиримидинов, найденное в нуклеотидах, невелико (в настоящее время известно только шесть), однако циклические углеводные компоненты, имеющие по две или по три группы OH, доступные для этерификации, позволяют предположить, что число возможных нуклеотидов может быть очень большим.

1) УГЛЕВОДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Углеводным компонентом нуклеиновых кислот является *d*-рибоза (*a*) в рибонуклеиновых кислотах или 2-дезокси-*d*-рибоза (*b*) в дезоксирибонуклеиновых кислотах. Оба эти углевода встречаются в нуклеиновых кислотах в виде фуранозидов.

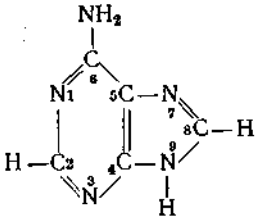


(*a*) (*b*)

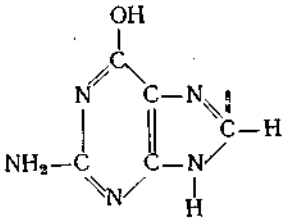
* Обзор многих более ранних работ по этому вопросу дан в классической монографии Левена и Басса [16]; обширная библиография приведена в книге Джонса [31].

2) ПУРИНЫ И ПИРИМИДИНЫ

В нуклеиновых кислотах найдено только два пурина: аденин (6-аминопурин) (*c*) и гуанин (2-амино-6-оксипурин) (*d*).

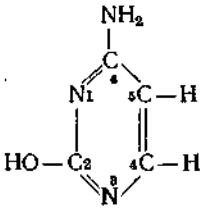


(*c*)

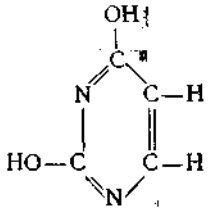


(*d*)

Пиримидиновое основание цитозин (2-окси-6-аминопиримидин) (*e*) присутствует во всех нуклеиновых кислотах, за исключением, может быть, кислот, образующихся в некоторых бактериофагах, а урацил (2,6-диоксипиримидин) (*f*) встречается во всех рибонуклеиновых кислотах.

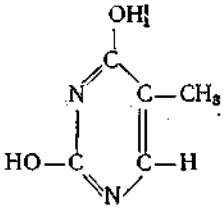


(*e*)

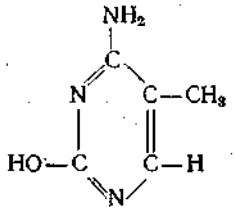


(*f*)

Во всех дезоксирибонуклеиновых кислотах имеется тимин (5-метилурацил) (*g*), а в некоторых из них в небольшом количестве 5-метилцитозин (*h*).



(*g*)



(*h*)

3) НУКЛЕОЗИДЫ

Нуклеозиды являются глюкозидами пуринов и пиримидинов. В этих соединениях глюкозидная связь образуется с N-3 в пири-

мидиновом кольце и с N-9 в пуриновом кольце. В табл. 5 дан перечень нуклеозидов, которые, как было установлено, являются продуктами распада нуклеиновых кислот. В этот перечень включены только те нуклеозиды, которые, вероятно, присутствуют в нативных нуклеиновых кислотах. Однако дезаминирование нуклеиновых кислот перед гидролизом дает начало и другим нуклеозидам, в том числе дезоксиуридину [32] и нуклеозидам, содержащим гипоксантин и ксантин.

Таблица 5

ПРОДУКТЫ РАСПАДА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Основание	Рибонуклеозид	Дезоксирибонуклеозид
Аденин	Аденозин	Дезоксиаденозин
Гуанин	Гуанозин	Дезоксигуанозин
Цитозин	Цитидин	Дезоксицитидин
Урацил	Уридин	—
Тимин	—	Тимидин
5-Метилцитозин	—	5-Метилдезоксицитидин

Из нуклеиновых кислот нуклеозиды лучше всего получаются при помощи ферментативного гидролиза, а рибонуклеозиды—путем гидролиза водными растворами слабых щелочей, таких, как аммиак или пиридин, при нагревании.

Пиримидиновые рибонуклеозиды можно выделить путем продолжительного кислотного гидролиза рибонуклеиновых кислот.

4) НУКЛЕОТИДЫ

Нуклеотиды являются элементарными звеньями, из которых строятся цепные молекулы нуклеиновых кислот. Число теоретически возможных нуклеотидов равно 26, из которых 5 еще не выделены (3′-фосфаты дезоксирибонуклеозидов). Из остальных 4 являются артефактами, получающимися при гидролизе рибонуклеиновой кислоты. Принятая в настоящее время номенклатура нуклеотидов имеет целью отметить специфический нуклеозид и ту группу, по которой он этерифицирован, например аденозин-5′-фосфат, хотя многие нуклеотиды имеют также и другие названия, например аденозин-5′-фосфат называется адениловой кислотой или мышечной адениловой кислотой в отличие от дрожжевой адениловой кислоты [аденозин-2′- и (или) 3′-фосфат].

Б. Выделение и деградация нуклеотидов

При обработке на холоду едкими щелочами (1 н. NaOH или 1 н. KOH) рибонуклеиновая кислота быстро распадается и дает нуклеотиды, которые долгое время считали нуклеозид-3′-фосфатами. Новейшие работы с применением хроматографического анализа показали, что нуклеотиды присутствуют в гидролизатах в виде пар, названных изомерами (*a*) и (*b*) [33, 34]. Посредством ферментативного исследования этих изомеров получено значительное количество данных, показывающих, что изомеры (*b*) являются нативными нуклеотидами, тогда как изомеры (*a*) образуются при щелочном гидролизе. Изомеры (*a*) и (*b*) считались продуктами α- и β-изомеризации глюкозидной связи в нуклеотидах, но Браун и Тодд [35] показали, что по своим свойствам эти изомеры похожи на некоторые другие фосфорные эфиры, поэтому образование изомеров (*a*) и (*b*) можно было бы объяснить миграцией остатков фосфорной кислоты. Предложенная названными авторами схема образования этих нуклеотидов включает возникновение циклического промежуточного продукта (*a*) (точнее—нуклеозид 2′,3′-моногидрофосфата) в процессе щелочного гидролиза нуклеиновой кислоты. Затем этот продукт гидролизуется щелочью по одной из двух возможных эфирных связей, давая нуклеозид-2′- и 3′-фосфаты.

Так, образованием циклического промежуточного продукта объясняется существование двух изомеров, а также рацемизация кислотой выделенных нуклеотидов (*a*) и (*b*). Схема гидролиза рибонуклеиновых кислот щелочью включает образование гипотетического промежуточного продукта, обладающего трижды этерифицированными фосфатными группами.

Теория Брауна и Тодда полностью подтвердилась выделением всех четырех циклических нуклеотидов после гидролиза рибонуклеиновой кислоты водными суспензиями $BaCO_3$ [36]. В этих условиях циклические промежуточные продукты вполне устойчивы, и их можно выделить и индентифицировать. Определение их несложно, так как циклические нуклеотиды лишены вторичной группы OH^- фосфорной кислоты. Отсутствие этой группы значительно изменяет хроматографические и электрофоретические свойства нуклеотидов.

В настоящее время идентичность нуклеотидов (*a*) и (*b*) вполне установлена в одной из последних работ Кона с сотрудниками, исследовавшими изомеры адениловой кислоты [36а]. Они адсорбировали эти изомеры на сильно кислой смоле дауэкс-50, а затем гидролизовали N-глюкозидную связь этой же смолой. Адениловые кислоты адсорбируются на смоле дауэкс-50 через аминогруппу адениновой половины, так что, когда разрывается глюкозидная связь, рибоза 2′- или 3′-фосфат (в зависимости от условий) не подвергается в дальнейшем рацемизации под воздействием кислой смолы.

(В действительности образующиеся при этом фосфорилированные сахара до некоторой степени рацемизируются; природа соединения, получаемого в преобладающем количестве, определяется использованным в опыте изомером адениловой кислоты.) Заметим, что в пиранозной форме рибозо-2′-фосфата присутствует *цис*-гликоль, содержащий С-3 и С-4, в аналогичном рибозо-3′-фосфате подобная структура отсутствует. Оказалось, что фосфорилированный сахар из адениловой кислоты (*а*) действительно связывает 1 моль HJO_3, а выделенный из адениловой кислоты (*b*)—не связывает. Аналогично был оптически активным и образовывал комплекс с боратом производный адениловой кислоты (*а*)—рибитолфосфат. Хотя до сих пор нет подобных данных о других нуклеотидах, но результаты многих ферментативных и хроматографических исследований показывают, что нуклеотиды (*а*) представляют одну группу, а нуклеотиды (*b*)—другую; поэтому теперь можно вполне обоснованно утверждать, что нуклеотиды (*а*) являются 2′-фосфатами, а нуклеотиды (*b*)—3′-фосфатами.

Наличие нуклеозид-5′-фосфатов в рибонуклеиновых кислотах было достоверно установлено путем выделения этих веществ из продуктов расщепления рибонуклеиновых кислот фосфодиэстеразой [37].

В. Методы анализа

Первые методы анализа нуклеиновых кислот можно разделить на две категории. К первой категории относятся непрямые методы, с помощью которых, например, содержание пурина в соединении можно определить по количеству фосфора, освобождаемого 1 н. HCl за 1 час при 100°, или же по количеству пентозы, реагирующей со смесью орцинол — HCl — $FeCl_3$. Применение таких методов зависит от сравнительной устойчивости пиримидиновых нуклеотидов к кислотному гидролизу, и полученные результаты дают, конечно, только указание на количественное соотношение двух главных типов оснований.

Более прямые методы включают гидролиз нуклеиновых кислот с последующим выделением продуктов гидролиза и их определением общими методами. Например, после гидролиза нуклеиновой кислоты в течение 1 часа 1 н. HCl при 100° можно выделить пурины, осадить гуанин добавлением NH_4OH и затем осадить аденин в виде относительно нерастворимого пикрата. Пиримидины в чистом виде получить труднее: для выделения их необходим сильный гидролиз, в результате которого цитозин, как правило, частично дезаминируется до урацила. Многие из прежних определений состава нуклеиновых кислот были неправильными, так как не было способа установления степени деструкции, происходящей при предварительном гидролизе.

В настоящее время такие методы больше не применяются вследствие развития хроматографических методов, дающих возможность производить точный микроанализ нуклеиновых кислот, количества которых не превышают 0,1 *мг* [38—43]. Техника хроматографии доказала свое превосходство именно в химии нуклеиновых кислот. Это связано главным образом с тем фактом, что все производные пуринов и пиримидинов, получаемые из нуклеиновых кислот, имеют интенсивные и характерные спектры поглощения в ультрафиолетовой области, и поэтому пятна на бумажных хроматограммах, содержащие всего несколько микрограммов этих веществ, можно обнаружить в ультрафиолетовом свете либо простым фотографированием [41], либо визуальным наблюдением флуоресценции самой бумаги, интенсивность которой уменьшается при наличии абсорбированных веществ [33, 44]. Такое обнаружение хроматографических пятен не сопровождается разрушением пуринов и пр. Последующая техника очень проста: соответствующие участки фильтровальной бумаги вырезают и подвергают экстрагированию в небольшом объеме 0,1 н. HCl или другого подходящего растворителя и концентрацию полученного раствора определяют в ультрафиолетовом спектрофотометре. Аналогично посредством спектрофотометрии можно определять эффлуенты с ионообменных или других колонок [45]. Однако в общем почти любое разделение веществ, по-видимому, можно произвести на бумаге либо путем хроматографирования, либо электрофоретически [46]; поэтому нет необходимости применять для обычных анализов хроматографические колонки. Только в некоторых случаях, когда разделения веществ нельзя достигнуть на бумаге, применяют ионообменные колонки. Так, например, оказалось невозможным разделить на бумаге уридин-2′- и 3′-фосфаты, но с некоторыми трудностями это разделение можно произвести на ионообменных колонках.

В этом разделе будет описано несколько простых и точных методов определения общего химического состава нуклеиновых кислот, но обсуждение всех методов, о которых сообщалось в литературе, не представляется возможным. Самая большая трудность хроматографического анализа нуклеиновых кислот состоит в том, чтобы установить подходящие условия гидролиза, подбор же систем растворителей для разделения веществ имеет второстепенное значение.

1) РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

1) Простейшим способом разложения рибонуклеиновых кислот является нагревание их в течение 1 часа при 100° в 1 н. HCl [42]. При этом освобождаются пурины как таковые и пиримидины в виде нуклеотидов. Для гидролиза необходимо брать около 0,1—1,0 *мг* нуклеиновой кислоты на 20 *мл* 1 н. HCl. После гидролиза каплю

испытуемой жидкости наносят на фильтровальную бумагу и хроматографирование производят в растворителе, состоящем из изопропилового спирта, концентрированной HCl и воды [43]. В результате смесь разделяется на четыре пятна, соответствующие (в порядке увеличения показателя R_f) гуанину, аденину, цитидиловой и уридиловой кислотам. В процессе гидролиза около 5% пиримидиновых нуклеотидов гидролизуется до нуклеозидов, но это приводит к небольшой ошибке, которую можно компенсировать, увеличивая на 5% данные, получаемые посредством спектрофотометрирования [47].

2) Рибонуклеиновые кислоты гидролизуются 72-процентной $HClO_4$ в течение 2 час. при 100°, давая свободные пурины и пиримидины [48]. После гидролиза раствор перед нанесением на бумагу разбавляют равным объемом воды и центрифугируют для удаления углерода. Количество нуклеиновой кислоты, которое требуется для получения одной хроматограммы, и система растворителей такие же, как и в способе (1). Этот растворитель можно использовать и для дезоксирибонуклеиновых кислот; в нем растворяются все пурины и пиримидины, которые могут находиться в гидролизате. Последовательность их передвижения и приблизительные значения R_f следующие: гуанин (0,27), аденин (0,40), цитозин (0,54), 5-метилцитозин (0,60), урацил (0,73), тимин (0,86); для полного разделения требуется перемещение растворителя примерно на 30 *см*.

3) Рибонуклеиновая кислота гидролизуется 1 н. NaOH или 1 н. KOH при 20° в течение 18 час. и дает только нуклеотиды. Эту смесь трудно разделить путем одномерной хроматографии, хотя в литературе указаны системы растворителей, производящие разделение [49]. К сожалению, они содержат фенол, что делает невозможным обнаружение пятен в ультрафиолетовом свете.

Иным и более быстрым способом разделения этой смеси является электрофорез на бумаге [50]. Полученный при помощи KOH гидролизат нейтрализуют $HClO_4$, и образующийся при этом нерастворимый $KClO_4$ удаляют. Затем раствор наносят на фильтровальную бумагу, смоченную буфером, имеющим pH 3,5, и концы фильтровальной бумаги соединяют с источником постоянного электрического тока. Все нуклеотиды передвигаются к положительному электроду; их подвижности относительно уридиловой кислоты равны: гуаниловая кислота 0,87, адениловая кислота 0,5, цитидиловая кислота 0,4, при учете передвижения жидкости в фильтровальной бумаге. Для разделения четырех (пар) нуклеотидов вполне достаточна экспозиция в течение 2 час. при 20 *в/см* [51].

Коэффициенты экстинкции, необходимые для вычисления абсолютных количеств пуринов, пиримидинов и рибонуклеотидов, приведены в табл. 6. Во всех случаях необходимо производить контрольные определения, для того чтобы ввести поправку на поглощающие материалы, находящиеся в фильтровальной бумаге. Чтобы сделать минимальным этот источник ошибок, желательно иметь возможно

Таблица 6

КОЭФФИЦИЕНТЫ МОЛЯРНОЙ ЭКСТИНКЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ОБЛАСТИ МАКСИМУМА ПОГЛОЩЕНИЯ В 0,1 н. HCl

Соединение	$\varepsilon \cdot 10^{-3}$	Длина волны, *мμ*
Аденин	13,0	260
Гуанин	11,0	250
Цитозин	10,5	275
Тимин	7,95	265
5-Метилцитозин	9,8	283
Адениловая кислота	13,7	255
Гуаниловая »	12,2	255
Цитидиловая »	12,95	280
Уридиловая »	9,89	260

большее количество гидролизата. Следовательно, для анализа растворов, содержащих гуанин, необходимо применять сильно кислую систему растворителей. Растворы, приготовленные на основе нейтральных или аммиачных спиртов, совершенно непригодны для гуанина по причине его слабой растворимости в этих растворах, что выражается в очень плохом проявлении пятен.

2) ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

В связи с тем, что в дезоксирибонуклеиновых кислотах недостает гидроксильных групп у C-2′ в углеводных циклах, связь между нуклеотидами в них гораздо устойчивее, чем в рибонуклеиновых кислотах. Именно поэтому при кислотном или щелочном гидролизе не может образоваться циклический 2′,3′-моногидрофосфат в качестве промежуточного продукта [35]. Вследствие этого химическими методами невозможно произвести количественный гидролиз дезоксирибонуклеиновой кислоты до нуклеотидов или нуклеозидов, и единственно подходящими будут методы, с помощью которых освобождаются пурины и пиримидины как таковые.

Имеются два таких метода. По одному из них обработку материала производят 72-процентной $HClO_4$ в течение 1 часа при 100° [48]. Затем раствор разбавляют равным объемом воды, и хроматографирование осуществляют в смешанном растворителе изопропиловый спирт — HCl. Второй метод, вероятно более подходящий для очень точной работы, состоит в том, что материал гидролизуют чистой HCOOH в течение 30 мин. при 175°, а затем хроматографируют, применяя указанный выше смешанный растворитель [43].

Результаты, полученные такими методами для рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, приведены соответственно

Таблица 7

СОСТАВ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ[a]

Источник	Аденин	Гуанин	Цитозин	Урацил	Ссылка на литературу
Дрожжи	0,24	0,30	0,19	0,27	52
	0,26	0,31	0,20	0,23	42
	0,26	0,31	0,20	0,23	43
	0,31	0,30	0,19	0,22	53
	0,27	0,27	0,20	0,26	54
	0,28	0,31	0,20	0,20	55
	0,25	0,27	0,21	0,24	56
	0,24	0,30	0,21	0,25	50
	0,26	0,14	0,17	0,43	33
Поджелудочная железа быка	0,21	0,49	0,21	0,08	52
Поджелудочная железа свиньи	0,22	0,49	0,21	0,10	53
Печень овцы	0,22	0,37	0,29	0,12	53
Карцинома печени	0,10	0,39	0,41	0,07	53
Саркома домашней птицы	0,14	0,46	0,28	0,12	57
Цитоплазма зобной железы теленка	0,19	0,36	0,28	0,17	55a
Рыбий нуклеотропомиозин	0,17	0,35	0,31	0,18	58
Вирус мозаики табака	0,28	0,25	0,20	0,27	59
То же	0,29	0,26	0,18	0,27	60
Вирус желтой мозаики репы	0,23	0,17	0,38	0,22	47
Вирус карликовой кустистости томата	0,25	0,28	0,22	0,25	47

[a] Единственной рибонуклеиновой кислотой, которая была изучена многими исследователями, является рибонуклеиновая кислота, выделяемая из дрожжей. Имеются некоторые данные о том, что состав ее непостоянен. Данные, относящиеся к рибонуклеиновым кислотам, выделенным из тканей животных, взяты из литературы; большинство этих кислот можно считать частично деполимеризованными и не представляющими изучаемого материала в том виде, в каком он присутствует в клетке. Данные приведены в молярных долях по отношению к общему количеству находимых оснований и в большинстве случаев в сумме составляют более 90%.

Таблица 8

СОСТАВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ[a]

Источник	Аденин	Гуанин	Цитозин	Тимин	5-Метилцитозин	Ссылка на литературу
Человек (в среднем)	0,31	0,23	0,21	0,25	0,01	61
Человек (эндометрий)	0,27	0,20	0,19	0,34	—	62
Человек (в среднем)	0,30	0,19	0,19	0,32	—	63
Зобная железа теленка	0,30	0,24	0,19	0,28	—	64
То же	0,28	0,21	0,21	0,28	0,01	43
» »	0,27	0,24	0,28	0,20	—	65
» »	0,28	0,21	0,21	0,28	0,02	66
Селезенка быка	0,29	0,21	0,21	0,28	0,01	66
То же	0,30	0,23	0,20	0,28	—	64
» »	0,28	0,21	0,21	0,28	0,01	43
Саркома мыши	0,30	0,22	0,23	0,26	—	66
Зародыш цыпленка	0,29	0,24	0,20	0,26	0,01	67
Черепаха	0,29	0,22	0,21	0,28	—	65
Икра сельди	0,27	0,19	0,22	0,27	0,03	66
То же	0,28	0,22	0,21	0,28	0,02	43
Саранча	0,29	0,21	0,21	0,29	0,002	43
Echinus	0,31	0,20	0,19	0,30	0,02	43
Arbacia	0,28	0,19	0,19	0,33	—	65
Escherichia coli	0,23	0,24	0,26	0,27	0,0	68
Pneumococcus	0,30	0,21	0,18	0,30	—	65
Mycobacterium tuberculosis	0,19	0,28	0,35	0,20	0,0	66
То же	0,18	0,28	0,33	0,14	0,0	68
» »	0,16	0,37	0,34	0,26	—	69
Rickettsia burneti	0,30	0,22	0,22	0,26	0,0	67
Rickettsia prowazeki	0,36	0,17	0,15	0,32	0,0	70
Полиэдровый вирус непарного шелкопряда	0,21	0,30	0,28	0,20	0,0	68
Зародыш зерна пшеницы	0,28	0,21	0,21	0,26	0,05	66
	0,26	0,23	0,17	0,26	0,05	43
	0,27	0,23	0,17	0,27	0,06	71
	0,29	0,25	0,17	0,29	—	65

[a] В этой таблице приведены многие опубликованные данные анализов. Отбор данных произведен таким образом, чтобы включить в таблицу как можно больше различных типов нуклеиновой кислоты и предпочтительно те из них, с которыми работали многие исследователи. Можно заметить, что между высшими организмами различия очень невелики и выражаются главным образом в количестве 5-метилцитозина. В таблицу не включены данные анализов нуклеиновых кислот бактериофагов, так как эти данные не точны. Данные представлены в молярных долях по отношению к общему количеству находимых оснований и округлены до второй значащей цифры.

в табл. 7 и 8. Можно заметить, что в некоторых случаях отклонение от тетрануклеотидной структуры очень велико. Однако анализ количественных соотношений между четырьмя или пятью возможными составными частями нуклеиновой кислоты не дает полного представления о действительной структуре последней, зависящей от порядка расположения этих частей, которым определяется биологическая специфичность нуклеиновых кислот.

Однако некоторое более детальное представление о структуре можно получить, применяя методы частичного гидролиза, наиболее подходящим из которых, по-видимому, является гидролиз нуклеазами и фосфатазами. Исследование получаемых при этом продуктов распада дает возможность составить более обоснованное, хотя и неполное, представление о внутренней организации молекул нуклеиновой кислоты.

Г. Деградация нуклеиновых кислот в связи с их структурой

Хотя продукты химического гидролиза указывают на то, что нуклеиновые кислоты являются полимерными соединениями, состоящими из нуклеотидных остатков, однако более тонкие детали строения этих больших молекул были установлены главным образом путем сравнения продуктов, полученных химическими методами гидролиза, с веществами, выделяющимися под действием специфических или иных ферментов. По отношению к ферментам оба типа нуклеиновых кислот обнаруживают существенные различия, поэтому каждый из них необходимо рассмотреть отдельно.

1) РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Рибонуклеиновые кислоты подвергаются действию многих ферментов, даже когда они находятся в сравнительно недеградированном состоянии. Так, фосфатазы могут действовать на рибонуклеиновые кислоты непосредственно, давая различные продукты распада, о которых будет упомянуто ниже. Но есть и специфический фермент, способствующий гидролизу рибонуклеиновых кислот, известный под названием рибонуклеазы.

Джонс [72] в 1920 г. первый обнаружил в поджелудочной железе присутствие рибонуклеазы, имеющей необычное свойство: устойчивость при температуре кипения. Он считал, что этот фермент гидролизует рибонуклеиновые кислоты до нуклеотидов. Но впоследствии Кунитц и другие исследователи [73, 74], работая с очищенным ферментом, установили, что лишь около 60% конечных продуктов не осаждается растворами ацетата уранила; другие же исследователи заметили, что в то время как основная масса продуктов расщепления диффундирует через целлофан, около 20%

их все же задерживается даже после сравнительно длительного диализа против воды. Вещество, остающееся в мешочке для диализа, имеет несколько названий, одно из которых—«ядро»—будет применяться здесь как наиболее подходящее.

За последнее время при помощи методов бумажной хроматографии, электрофореза на бумаге и ионообменной хроматографии изолировано большое число продуктов частичного или полного расщепления рибонуклеиновых кислот рибонуклеазой [36, 46, 51, 75] и затем определена их структура; таким образом, появилась возможность составить представление как о способе действия фермента, так и о тех ограничениях, которые налагает специфичность фермента на характер возможных структур нуклеиновой кислоты.

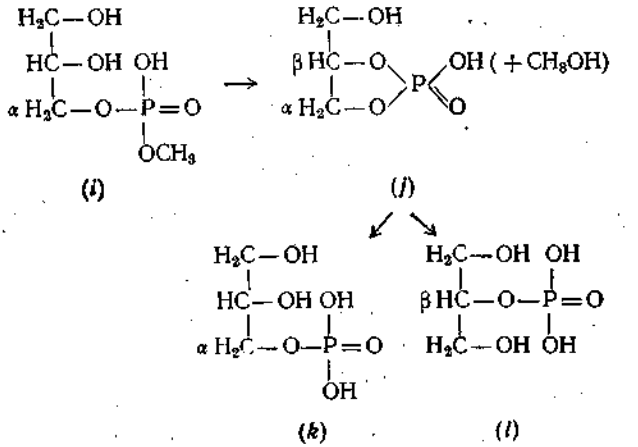
Уже с самого начала было достаточно ясно, что нуклеиновые кислоты соединяются фосфатными мостиками и что имеется несколько путей, которыми это может осуществиться. Наиболее вероятная структура, в которой предполагалось наличие ряда двойных эфирных связей, соединяющих углеводные остатки, хотя и казалась привлекательной, но ею, по-видимому, нельзя было объяснить чрезвычайную неустойчивость рибонуклеиновых кислот к щелочи, поскольку двойные фосфорные эфиры обычно довольно стойкие соединения. На основании исследований Левена и Харриса [76] по расщеплению нуклеиновых кислот (результаты которых, как впоследствии показали Браун и Тодд [77], являются неубедительными) было сделано предположение, что фосфатный остаток нуклеотидов находится у С-3 углевода, тогда как для остальных гидроксильных групп углеводов у С-2 и С-5 возможность такой связи, по-видимому, должна быть исключена, о чем свидетельствует трудность отделения путем гидролиза фосфорной кислоты от нуклеозид-2′- и 5′-фосфатов.

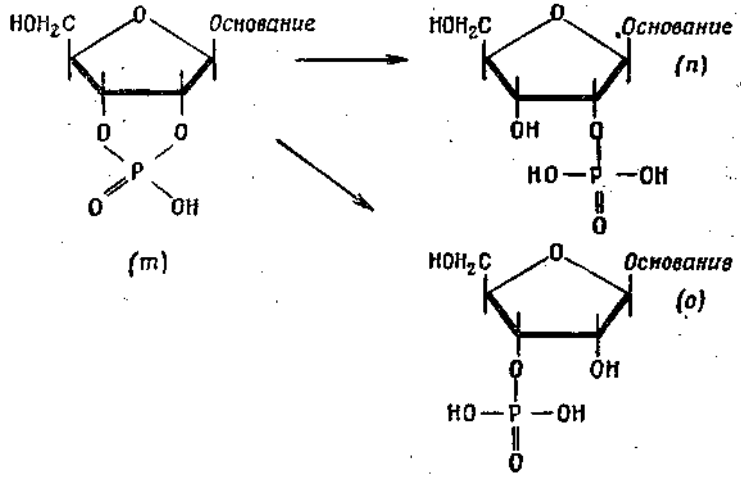
Позднее было обнаружено, что метод синтеза нуклеозид-«2′»-фосфатов фактически приводил к образованию 5′-фосфатов, поэтому доводы относительно устойчивости первых оказались несостоятельными [78].

Открытие того факта, что «нуклеотиды», получаемые путем щелочного гидролиза рибонуклеиновых кислот, в действительности являются парами изомерных нуклеотидов [33, 34], хотя сначала и усложнило вопрос, но в дальнейшем оказалось ключом к решению всей проблемы. Браун и Тодд [77] синтезировали из 5-тритиладенозина адениловые кислоты (*a*) и (*b*) и установили, что, судя по свойствам, эти вещества, вероятно, являются аденозин-2′- и 3′-фосфатами, хотя порядок соответствия не обязательно такой, как указано. Кроме того, обработка каждого из этих нуклеотидов разбавленной кислотой приводила к образованию смеси изомеров, что свидетельствовало о миграции остатков фосфорной кислоты в процессе гидролиза. Эту возможность много лет назад предсказал Галленд [79] по аналогии с поведением простых соединений,

таких, как α-глицеролметилфосфат (*i*), который при обработке кислотой или щелочью чрезвычайно легко дает смесь α- и β-глицерофосфатов, причем освобождается метиловый спирт. Этот связанный с миграцией фосфатов гидролиз, вероятно, осуществляется через циклический α, β-глицеролметилфосфат (*j*), который, будучи третичным фосфорным эфиром, довольно неустойчив. Кроме того, при обработке разбавленной кислотой α-глицерофосфат дает смесь α- (*l*) и β- (*k*) фосфатов.

Поскольку нуклеозид-2′- и 3′-фосфаты с их смежными, находящимися в *цис*-положении группами OH имеют структуру, аналогичную структуре глицерофосфатов, Браун и Тодд предположили, что эфиры каждого из этих нуклеотидов должны быть неустойчивыми по отношению к щелочам или кислотам, как и глицеролметилфосфаты; об этом свидетельствует тот факт, что в процессе их гидролиза в качестве промежуточного продукта может образоваться циклический третичный фосфат. Последний затем может лишь подвергнуться распаду и дать нуклеотид-2′- или 3′-фосфаты путем образования промежуточного соединения, которое является (циклическим) нуклеозид-2′,3′-моногидрофосфатом (*m*). После этого в кислом растворе 2′- (*n*) и 3′- (*o*) фосфаты могут подвергаться взаимному превращению аналогичным путем. Таким образом, теория, согласно которой рибонуклеиновые кислоты являются неустойчивыми по отношению к щелочам вследствие наличия смежных групп OH в кольцах углеводных остатков, объясняет как образование нуклеотидов (*a*) и (*b*), так и устойчивость дезоксирибонуклеиновых кислот, которые, не имея группы OH в положении 2′, не могут образовать циклического промежуточного соединения и поэтому не гидролизуются щелочью.





Приблизительно в это же время авторы данной главы занимались хроматографическим анализом продуктов, получаемых при расщеплении нуклеиновых кислот рибонуклеазой, и первые выделенные ими соединения в общем имели состав уридиловой и цитидиловой кислот, но явно отличались от них в двух отношениях [80]. Во-первых, хроматографически они вели себя иначе, чем свободные нуклеотиды, давая в спиртовых растворителях более высокие, а в водных растворах солей более низкие значения R_f; во-вторых, при дальнейшей обработке этих соединений рибонуклеазой, щелочью или кислотой они превращались в обыкновенные нуклеотиды [при ферментативном гидролизе выделяются только изомеры (*b*) вследствие специфического действия фермента, о чем будет сказано ниже]. Именно такими свойствами и должны были обладать циклические нуклеотиды, существование которых предполагали Браун и Тодд, и это подтвердилось при сравнении естественных веществ с синтетическими препаратами. В дальнейшем это было доказано еще и тем, что в естественных циклических нуклеотидах отсутствует вторичная группа OH^- остатка фосфорной кислоты, что легко можно установить путем электрофореза на бумаге при pH 7,4; при этом значении pH диссоциируют как первичные, так и вторичные фосфатные группы [36]. При pH 3,5 нуклеотиды обоих типов несут одинаковый заряд и поэтому при электрофорезе передвигаются приблизительно с одинаковой скоростью.

Впоследствии было показано, что циклические нуклеотиды образуются не только путем ферментативного гидролиза, но могут быть получены и при кипячении нуклеиновых кислот в присутствии $BaCO_3$, когда происходит очень слабый щелочный гидролиз. В этом

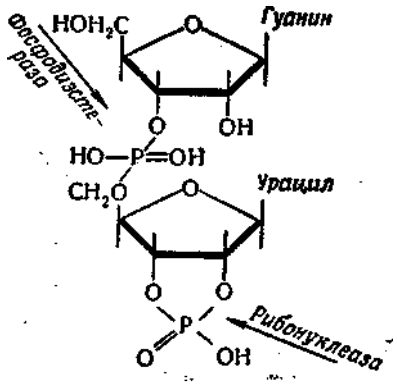
случае все циклические нуклеотиды образуются с хорошим выходом, и интересно отметить, что циклические пуриновые нуклеотиды отличаются от их пиримидиновых аналогов своей полной устойчивостью к действию рибонуклеазы [36], что облегчает их последующее выделение.

Исследование остальных продуктов расщепления нуклеиновых кислот рибонуклеазой показало, что большинство их (за исключением лишь концевых группировок) освобождается ферментом сходным образом, а именно первые выделяющиеся фрагменты имеют на одном конце остаток пиримидинового нуклеозид-2′,3′-моногидрофосфата, который затем расщепляется рибонуклеазой с разрывом циклической связи, оставляя полинуклеотиды, имеющие на конце единственный остаток пиримидинового нуклеотида (*b*). Таким образом, состав всех продуктов полного расщепления нуклеиновых кислот рибонуклеазой можно выразить простой формулой: nПу+1Ру, где Ру и Пу—соответственно пиримидиновые и пуриновые остатки нуклеотидов, а $n \geqslant 0$. Это позволяет непосредственно составить представление о действии рибонуклеазы, так как фермент, очевидно, является специфической диэстеразой, расщепляющей эфиры пиримидиновых нуклеотидов (*b*). Следует отметить, что такая структура имеется в самих циклических нуклеотидах. Эту специфичность действия фермента подтвердили Браун и Тодд [80a], применившие синтетические эфиры пиримидиновых (*b*) нуклеотидов, таких, как цитидилат (*b*) бензила, который гидролизуется рибонуклеазой, давая сначала циклическую цитидиловую, а затем (*b*) цитидиловую кислоту. Эфиры нуклеотидов типа (*a*) рибонуклеазой не гидролизуются.

В цельной рибонуклеиновой кислоте все остатки пиримидиновых нуклеотидов, по-видимому, имеют конфигурацию (*b*), и, следовательно, по окончании действия рибонуклеазы все они находятся в свободной форме (*b*). Поэтому после дальнейшего щелочного гидролиза пиримидиновые нуклеотиды освобождаются только в форме (*b*), хотя при этом должны присутствовать обе формы пуриновых нуклеотидов. Как теперь вполне определенно установлено, это связано с миграцией фосфора, которая происходит в процессе гидролиза, поскольку в состав нуклеиновой кислоты основная масса пуриновых нуклеотидов также входит в виде изомеров (*b*) [80 *b*,*c*].

Как уже упоминалось, другая связь с полинуклеотидной цепью находится при С-5′, что было обнаружено Коном и Волкиным [81], которые получали большие выходы 5′-нуклеотидов методами ферментативной деградации. Дополнительные данные, подтверждающие это, заключаются в том, что циклические динуклеотиды имеют все три возможные группы ОН в одном фосфорилированном нуклеозидном остатке, причем 2′,3′-группы образуют циклический фосфат, а 5′-группа участвует в образовании межнуклеотидной связи.

Так, циклический динуклеотид гуанина и урацила [уридин-5′-(гуанозин-3′-фосфатный) эфир, моногидро-2′-3′-фосфат] (*р*) может деградировать следующим образом:



а) Рибонуклеаза разрывает циклический 2′,3′-фосфат, оставляя 3′-фосфат в уридиновом остатке. Затем его можно удалить фосфомоноэстеразой, а при последующем щелочном гидролизе получаются гуаниловые кислоты (*а*) и (*b*) и уридин.

б) Фосфодиэстераза змеиного яда освобождает гуанозин, оставляя уридин-5′-, циклический 2′,3′-дифосфат, который разрушается щелочью, давая смесь уридин-2′,5′- и уридин-3′,5′-фосфатов.

Подобной деградации могут подвергаться и другие полинуклеотиды, получаемые расщеплением нуклеиновых кислот рибонуклеазой, но следует отметить, что нециклические динуклеотиды не подвергаются действию чистой диэстеразы змеиного яда, если они предварительно не были дефосфорилированы фосфомоноэстеразой. Вероятно, это препятствие создает вторичная фосфатная группа. Можно также предположить, что диэстераза змеиного яда представляет собой преимущественно 2′- (или 3′-)фосфатазу, причем связь 5′ остается нетронутой. (Однако диэстераза змеиного яда разрушает, хотя сравнительно и медленно, такие вещества, как диаденозин-5′,5′-монофосфат.)

Из этого описания действия рибонуклеазы и других гидролитических агентов можно сделать вывод, что вероятной структурой рибонуклеиновых кислот является прямая цепь нуклеотидов, соединенных 3′,5′-связями. Рассмотрим теперь вопрос о том, в каком порядке нуклеотиды могут размещаться в этой цепи, какими группами оканчиваются цепи и каковы возможности образования боковых цепей.

Для упрощения описания структуры рибонуклеиновых кислот предлагается следующая сокращенная номенклатура. Буквы

А, Г, Ц и У обозначают остатки адениловой, гуаниловой, цитидиловой и уридиловой кислот соответственно. В такой цепи, как например А, Г, Ц, остаток, расположенный слева, связан своей 3′-группой с 5′-группой остатка, расположенного непосредственно справа от него, а остаток на правом конце цепи является концевым. Если последний циклический, то после обозначающей его буквы ставится восклицательный знак, например А! или Ц! Если, как это сделано выше, остаток обозначен курсивом, то это значит, что он может быть дефосфорилирован фосфомонодиэстеразой. Двоеточие между буквами означает связь, которая может быть разорвана рибонуклеазой. Так, отдельную цепь рибонуклеиновой кислоты вируса желтой мозаики репы можно схематически представить следующим образом: А *Ц*: *У*: *Ц*: *Ц*: АГАГ*Ц*: *У*: *Ц*:*Ц*: АА*У*: *У*: Г*У*: А*У*: *Ц*: Г*Ц*: *Ц*: *У*: АГ*Ц*: А*Ц*: *Ц*: *У*: Г*У*: *Ц*: *Ц*: А*У*: АА*Ц*: АГ*Ц*: *Ц*: *У*: А*Ц*: А*У*: А!

Ясно, что такие вещества, как А!, могут происходить только от концов цепей (или боковых цепей), поскольку циклические пуриновые нуклеотиды устойчивы к действию рибонуклеазы. Большинство веществ, обозначенных в этой цепи, было действительно выделено и определено, но некоторые тринуклеотиды и более крупные фрагменты еще не выделены. Эти вещества составляют «ядро», которое, как это можно обнаружить путем дефосфорилирования его концевой группы, имеет длину, равную в среднем только 3—4 остаткам; «недиализируемость» «ядра» обусловлена влиянием электрического заряда или ассоциацией; в концентрированных растворах солей диализ проходит легко.

Концевые группы можно определять несколькими методами. Если концевые группы циклических пуриновых нуклеотидов примыкают к остатку пиримидинового нуклеотида, то при расщеплении рибонуклеазой они освобождаются в виде циклических нуклеотидов, которые можно разделить хроматографически. Нециклические пуриновые нуклеотиды, находящиеся в таком же положении, выделяются как свободные нуклеотиды и являются единственными свободными пуриновыми нуклеотидами, находимыми в продуктах расщепления рибонуклеазой. Все нециклические концевые группы могут быть дефосфорилированы фосфомоноэстеразой. При гидролизе нуклеиновой кислоты холодной щелочью эти группы освобождаются в виде нуклеозидов, которые легко можно определить. Разумеется, что фосфомоноэстераза не должна содержать ни рибонуклеазы, ни фосфодиэстеразы, иначе можно получить завышенные результаты. Методы определения концевых групп циклических пиримидиновых нуклеотидов детально еще не разработаны, однако известно, что в нуклеиновых кислотах могут существовать небольшие полинуклеотидные концевые группы, содержащие по два и более пуриновых нуклеотида, которые пока еще не обнаружены в продуктах расщепления рибонуклеазой (за исключением АГ

который был найден в продуктах расщепления нуклеиновой кислоты из продажных дрожжей).

Вышеуказанными методами в рибонуклеиновых кислотах дрожжей и вируса желтой мозаики репы [75] было обнаружено несколько концевых группировок. Данные по рибонуклеиновой кислоте вируса приведены в табл. 9. В рибонуклеиновой кислоте вируса

Таблица 9

КОНЦЕВЫЕ ГРУППЫ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ВИРУСА ЖЕЛТОЙ МОЗАИКИ РЕПЫ

Группа	Число групп на 100 нуклеотидных остатков
: А!	0,16
: Г!	0,20
Ц	0,97
У	0,22
А	0,17
Г	0,18

желтой мозаики репы, которая является, по-видимому, наименее деградированной из всех исследованных до сих пор нуклеиновых кислот этого типа, содержится по 1 концевой группе на каждые 53 остатка, что соответствует максимальному среднему молекулярному весу ~17 000 на каждую концевую группу.

а) Образование боковых цепей. Очевидно, что разветвленная цепь может иметь более одной концевой группы. До сих пор предполагалось, что цепи не имеют ветвей. Какие же имеются возможности построения разветвленных цепей в рибонуклеиновых кислотах? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо рассмотреть факторы, ограничивающие разветвление цепей. Цельная нуклеиновая кислота при обработке щелочью должна полностью разлагаться на 2′- и 3′-нуклеотиды, после же обработки рибонуклеазой все остатки ее пиримидиновых нуклеотидов должны занимать концы коротких цепей или выделяться в виде мононуклеотидов. Принимая во внимание это обстоятельство и специфичность рибонуклеазы, можно показать, что единственно возможная ветвь, на которой может быть большее количество концевых (содержащих фосфор) групп, находится на трижды этерифицированном фосфатном остатке в главной цепи, соединенном с первым нуклеотидным остатком в боковой цепи при С-5′. Кажется совершенно невероятным, что рибонуклеаза будет воздействовать на такую боковую цепь, а если это воздей-

ствие не происходит, то в продуктах полного расщепления рибонуклеазой можно было бы найти остатки пиримидиновых нуклеотидов со связанными фосфатными группами. Таким образом, существование подобных ветвей кажется весьма маловероятным.

Другой предполагаемый и теоретически возможный тип ветви нельзя было обнаружить, применяя рибонуклеазу. Это—ветвь, отходящая от остатка пиримидинового нуклеозида при С-2′ или С-3′, которые не участвуют в образовании связей главной цепи. Эта ветвь должна быть соединена с первым нуклеозидным остатком в положении *b* в боковой цепи. Доказательство существования этого типа ветви дает работа Кона и Волкина [81], которые обнаружили, что фосфодиэстераза змеиного яда неизменно освобождает некоторое количество дифосфатов пиримидиновых нуклеозидов вместе с примерно эквивалентным количеством пуриновых нуклеозидов. Такие вещества могли бы образоваться при наличии двух смежных пиримидиновых нуклеотидов, один из которых, связанный с остатком пуринового нуклеозида в положении 5′, находился бы в боковой цепи, а другой, соединенный связью 2′,3′,—в главной цепи. Структура такого типа возможна, но доказательства в пользу ее существования довольно скудны. Согласно данным Кона и Волкина, пришлось бы допустить, что в боковых цепях находится около 40% остатков пиримидиновых нуклеозидов, причем все образовавшиеся дифосфаты должны относиться к типу (*a*)5′, а диэстераза змеиного яда должна действовать преимущественно на связи типа (*b*). Иное объяснение образования эквивалентных количеств дифосфатов пиримидинового нуклеозида, с одной стороны, и пуринового нуклеозида—с другой, предполагает действие диэстеразы змеиного яда на вещество типа АЦ!, АУ!, ГЦ! и ГУ!, когда циклические (2′,3′-),5′-дифосфаты цитидина и уридина освобождаются вместе с аденозином и гуанозином в эквивалентных количествах.

В итоге, по имеющимся в настоящее время сведениям, можно сказать, что разветвленность цепи не является обязательной характерной особенностью структуры рибонуклеиновой кислоты. Если боковые цепи и существуют, то, вероятно, только при углеводных остатках, и они могли возникнуть только в том случае, если остатки пиримидиновых нуклеотидов находились как в главной, так и в боковой цепях.

2) ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ РАСПАД ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

При обработке дезоксирибонуклеиновых кислот фосфодиэстеразой змеиного яда после воздействия на них дезоксирибонуклеазы образуются нуклеозид-5′-фосфаты [82]. Поскольку они не имеют гидроксильных групп при атомах С-2′, то остатки углеводов могут быть соединены двойными эфирными связями только через гидро-

ксильные группы у атомов углерода в положении 3′,5′. До сих пор не установлено, что 3′-фосфаты являются продуктами гидролиза дезоксирибонуклеиновых кислот, но еще в 1912 г. Левен и Джекобс выделили дифосфаты пиримидиновых нуклеозидов из кислотных гидролизатов дезоксирибонуклеиновой кислоты [83]. Эти вещества должны быть 3′,5′-дифосфатами дезоксицитидина и тимидина. Дополнительным доказательством существования двойных эфирных связей в дезоксирибонуклеиновых кислотах является присутствие в продуктах расщепления дезоксирибонуклеазой таких соединений, как дидезоксиаденциловой кислоты, поскольку достоверно установлено, что пуриновые остатки можно удалить из дезоксирибонуклеиновых кислот, не нарушая структуры главной цепи.

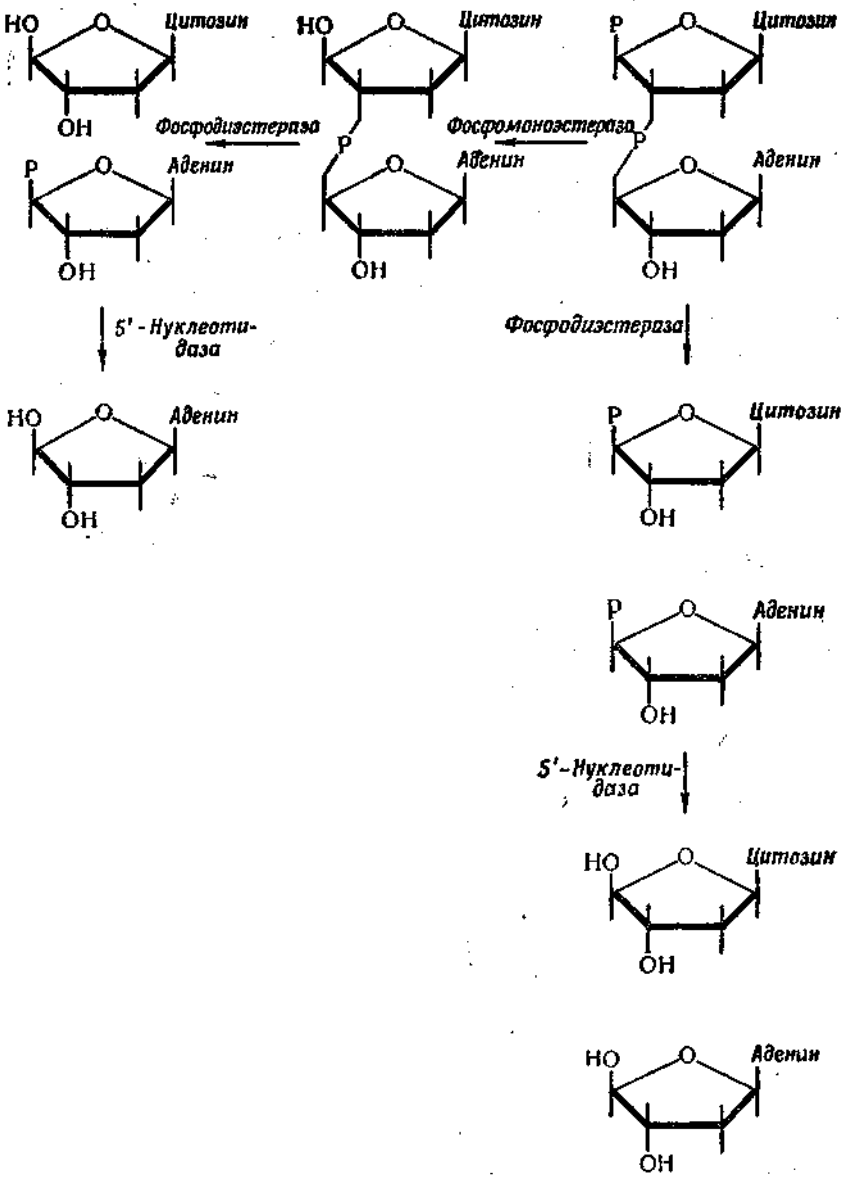
Действие дезоксирибонуклеазы на дезоксирибонуклеиновые кислоты более сложно, чем действие рибонуклеазы на ее субстраты; при этом совсем не освобождаются мононуклеотиды. В продуктах расщепления дезоксирибонуклеиновых кислот были найдены многие динуклеотиды и некоторые тринуклеотиды, но еще не установлено, что этот фермент обладает какой-либо простой структурной специфичностью [84, 85].

Из десяти выделенных до сих пор динуклеотидов довольно тщательно была исследована структура только одного динуклеотида аденина и цитозина; применявшиеся при этом методы изображены в упрощенном виде (см. стр. 81).

Определение таких структур полностью зависит от применения препаратов специфических ферментов, так как нет соответствующих химических методов расщепления различных связей.

Наиболее интересная структурная особенность, обнаруженная этими методами, относится к распределению в цепях 5-метилцитозина [86]. Оказалось, что динуклеотид 5-метилцитозина и гуанина присутствует в продуктах расщепления дезоксирибонуклеазой в гораздо большей концентрации по сравнению с динуклеотидом цитозина и гуанина, чем это можно было бы ожидать, судя по относительному содержанию цитозина и 5-метилцитозина в цельной нуклеиновой кислоте. Могло показаться весьма вероятным, что в цепях нуклеотидные остатки 5-метилцитозина должны примыкать к нуклеотидным остаткам гуанина. Но этого, по-видимому, не бывает в случае других динуклеотидов, которые отличаются от первых только тем, что вместо цитозина имеют в своем составе 5-метилцитозин.

Приблизительная длина цепи «ядра» дезоксирибонуклеиновых кислот составляет 5—6 нуклеотидов.


HO
Цитозин
OH
Фосфодиэстераза
Фосфомоноэстераза
P
Аденин
5'-Нуклеотидаза
Фосфодиэстераза
Цитозин
Аденин
5'-Нуклеотидаза
Цитозин
Аденин

3. ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Из рассмотрения химического состава нуклеиновых кислот становится очевидным, что они являются чрезвычайно сложными полиэлектролитами, молекулы которых имеют значительные размеры. Дезоксирибонуклеиновые кислоты, по-видимому, полимеризованы в большей степени, чем рибонуклеиновые кислоты, и легко проявляют двойное лучепреломление в потоке (отрицательное) [19] и образуют волокна, обладающие двойным лучепреломлением, которое по знаку может быть и отрицательным и положительным (в зависимости от степени влажности и способа приготовления образцов [87, 88]), что, вероятно, является следствием изменения формы молекул. Рибонуклеиновые кислоты в концентрированных растворах также обнаруживают двойное лучепреломление в потоке при высоких скоростях сдвига, но при низких скоростях сдвига это явление наблюдается только у сравнительно недеградированных рибонуклеиновых кислот вирусов. Растворы, в которых молекулы обладают сильно выраженной асимметрией, отличаются высокой вязкостью, причем она является аномальной, и так как при малых скоростях сдвига растворы застудневают [89], то инкремент вязкости при этом должен стремиться к бесконечности. Это обстоятельство является причиной того, что все попытки определить классическими методами «молекулярные веса» препаратов нуклеиновых кислот дают довольно сомнительные результаты, хотя получаемые при этом данные, конечно, представляют ценность в том отношении, что характеризуют материал, получаемый различными способами.

Нуклеиновые кислоты—вещества, обладающие значительной плотностью, с удельным объемом (порядка 0,55—0,60 [90—92]), значительно меньшим удельных объемов большинства белков, чем объясняется и сравнительно малый удельный объем нуклеопротеидов. Однако на том основании, что их удельный объем невелик, нельзя считать их молекулы плотно упакованными по тому типу, как это предполагал Астбери; в действительности это означает лишь то, что отдельные нуклеотиды являются сами по себе плотными. Однако имеются некоторые данные, подтверждающие, что эти молекулы сравнительно компактны.

Присутствие в молекулах пуриновых и пиримидиновых колец обусловливает сильное и характеристическое поглощение нуклеиновых кислот, максимум которого находится около 263 *мμ* (рис. 1). Возможно, наиболее удобным способом выражения экстинкции является способ, предложенный Чаргафом и Заменгофом [93], которые применяли величину $\varepsilon(P)$, обозначавшую коэффициент молярной экстинкции, отнесенный к молю фосфора (в большинстве случаев его относят к молю нуклеотида). Однако такой метод вычисления имеет некоторые недостатки, так как, особенно в случае дезоксирибонуклеиновых кислот, может и не быть эквивалентности

между Р и основаниями, и в то же время какая-то часть поглощения является неспецифичной и связана с рассеянием света молекулами, причем эта часть поглощения изменяется со степенью полимеризации молекул. Обычные значения ε (Р), соответствующие максимуму поглощения, для дезоксирибонуклеиновых кислот достигают 7000—8000, а для рибонуклеиновых кислот — 8500—11 000 и изменяются в зависимости от источника нуклеиновой кислоты и от способа ее выделения.

При полном или частичном гидролизе коэффициенты экстинкции превышают коэффициенты для отдельных нуклеотидов (11 000—14 000) [94, 95]. Причина точно не установлена, но предполагалось, что это зависит от разрыва слабых связей между молекулами или между смежными частями одной и той же молекулы. Трудно представить, что подобные связи обнаруживают этот эффект сами по себе; для объяснения его авторы считают правдоподобным предположение, что кольца в «нативной» нуклеиновой кислоте ориентированы относительно друг друга, возможно, при помощи водородных связей, и вследствие такой ориентации эффективное поглощение света всеми кольцами может быть меньше суммы поглощений отдельными кольцами; при гидролизе этот эффект исчезает.

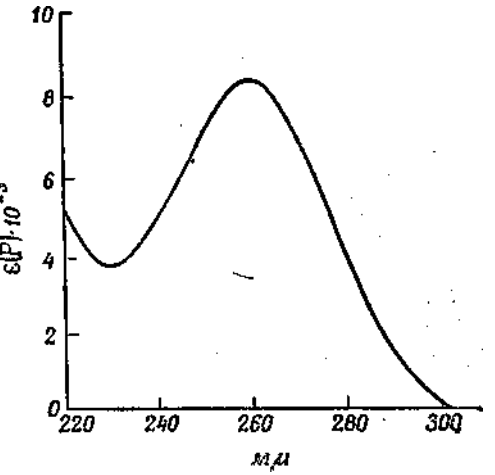


Рис. 1. Спектр поглощения рибонуклеиновой кислоты (из вируса желтой мозаики репы).

Нуклеиновые кислоты обстоятельно исследовались методом электрометрического титрования. Первоначальной целью этих исследований было подтверждение существования тетрануклеотидной структуры; доля вторичных диссоциирующих фосфатных OH^- групп на каждую молекулу фосфора дает возможность определить длину цепи. О титруемых группировках в нуклеиновых кислотах судят по наличию их в отдельных нуклеотидах, делая несколько сомнительное допущение, что различные ионизирующие группы в молекуле совершенно не взаимодействуют. Ниже указываются такие группы с соответствующими им значениями pK': первичные фосфатные группы OH^- (pH 0,7—1,02), которые нельзя титровать, так как нуклеиновые кислоты гидролизуются при pH выше этих значений; аминогруппы аденина (3,70), цитозина (4,24), гуанина (2,3); вторичные фосфатные группы OH^- (5,9—6), энольные группы OH

гуанина (9,36) и урацила (9,43). Остальные группы ОН оснований диссоциируют при значениях pH, достаточно высоких для того, чтобы вызвать распад нуклеиновых кислот [96, 97].

Следует отметить, что титрованию вторичных фосфатных групп OH^- до некоторой степени препятствуют смежные группы NH_2^+ и кольцевые группы ОН; поэтому приходится вносить поправку либо на основании предполагаемого состава нуклеиновой кислоты, либо, как это было в одном случае, по данным действительного анализа [98]. В связи с тем, что первичные фосфатные группы OH^- диссоциируют при очень низких значениях pH, их приходится определять либо по общему количеству присутствующего фосфата, либо по содержанию натрия в его нуклеате при некотором определенном значении pH. Поэтому не удивительно, что многие результаты, получаемые титрованием, истолковывают по-разному. Во многих прежних исследованиях титрование случайно производилось на частично деградированном материале, частицы которого в среднем содержали лишь несколько нуклеотидов, и это обстоятельство способствовало укреплению тетрануклеотидной гипотезы, хотя можно получить любое требуемое количественное соотношение между первичной и вторичной диссоциацией, подвергая нуклеиновые кислоты гидролизу в соответствующих условиях.

На кривых титрования дезоксирибонуклеиновых кислот при pH выше 9 наблюдалось весьма интересное явление гистерезиса; очевидно, при этих значениях pH некоторые связи разрываются необратимо [99]. Причиной гистерезиса считали разрыв водородных связей. В литературе имеются сообщения о том, что непродолжительное воздействие среды с pH 12 вызывало небольшое увеличение числа вторичных фосфатных групп, причем при более длительном воздействии число таких групп продолжало увеличиваться. При значениях pH, находящихся на другом конце шкалы кислотности, нуклеиновые кислоты подвергаются быстрой и необратимой деполимеризации, причем вязкость растворов и двойное лучепреломление в потоке сильно уменьшаются.

Как уже упоминалось, гидродинамическое поведение нуклеиновых кислот сильно усложняется в результате взаимодействия их частиц в растворе. Вследствие этого константы седиментации сильно зависят от концентрации раствора. Константа седиментации дезоксирибонуклеиновой кислоты зобной железы изменяется от 6,4 *S* при 0,29% до 17,1 *S* при 0,025% [90]—концентрации, при которой чрезвычайно трудно сохранить устойчивую границу раздела. Константа диффузии этого препарата составляет приблизительно $1 \cdot 10^{-7}$ *см*^{2}*/сек*, молекулярный вес оценен примерно в полмиллиона.

Константы седиментации рибонуклеиновых кислот гораздо меньше: они выражаются величинами порядка 2—3 *S* [100—101], за исключением рибонуклеиновой кислоты вируса мозаики табака, для которой, по данным Коэна и Стэнли [102], константа седимен-

тации равна 8,6 S, а «молекулярный вес»—300 000. Однако эти авторы обнаружили, что «молекулярный вес» нуклеиновой кислоты вируса, обработанной при 4° в течение 2 час. 5-процентным раствором едкого натра, все еще был равен примерно 10 000; эта величина весьма маловероятна, что заставляет сомневаться в правильности истолкования результатов опытов.

Невозможно объяснить также результаты измерений диффузии дезоксирибонуклеиновых кислот не только из-за асимметрии границы диффузии [103], но и вследствие того, что вся масса раствора находится в движении—признак того, что «растворы» в действительности являются набухающими гелями [89]. Здесь следует упомянуть, что во многих случаях определения молекулярного веса по одним только константам диффузии в высшей степени недостоверны и могут быть причиной неверных выводов [104].

Поэтому «молекулярные веса» нуклеиновых кислот следует считать довольно сомнительными, но можно с уверенностью сказать, что они имеют очень сложный состав и что молекулы рибонуклеиновых кислот меньше молекул дезоксирибонуклеиновых кислот, «молекулярные веса» которых при осторожном выделении выражаются величинами порядка миллиона.

Рентгенографические исследования волокон дезоксирибонуклеиновых кислот хотя и не дали многого относительно структуры этих волокон, но показали, что по направлению оси волокон существует строгая периодичность с величиной периода 3,34 Å, которая была истолкована как расстояние между отдельными нуклеотидами [105]. Если же, как теперь предполагается, в действительности молекулы спиралевидны, то это истолкование следует несколько изменить. Несомненно, при растяжении волокон пуриновые и пиримидиновые кольца должны поворачиваться по отношению к оси волокна и располагаться к ней в среднем под углом 45° [87].

Несколько лет назад стало известно, что группа исследователей в Лондонском королевском колледже получила исключительно отчетливые рентгенограммы для одного образца дезоксирибонуклеиновой кислоты и что эти рентгенограммы указывали на спиралевидное строение молекул дезоксирибонуклеиновых кислот. Эти данные были недавно опубликованы [105a, b]. Учитывая замечание Чаргафа [105c] о приблизительном равенстве отношений аденина к тимину и гуанина к цитозину, получаемых при анализе дезоксирибонуклеиновых кислот (см. табл. 8), Уотсон и Крик [105d] предложили схему двойной спиралевидной структуры, в которой пары цепей, расположенные в противоположных направлениях относительно 3′,5′-фосфатных связей, соединены парами водородных связей между парами оснований. Предполагают, что эти связи соединяют цитозин с гуанином и тимин с аденином в смежных спиралях, причем N-1 пиримидиновых остатков соединяется с N-1 пуриновых остатков, а другие связи образуются между 6-OH-

группой тимина и 6-NH_2- группой аденина и соответственно между 6-аминогруппой цитозина и 6-ОН-группой гуанина. Это приводит к тому, что в спаренной структуре плоскости оснований располагаются под прямым углом к оси спирали. Расстояние между парой витков последней равно 34 Å, и на каждый виток приходится по десяти (пар) оснований.

Такая структура интересна как модель возможного механизма самоудвоения [105e], но не совсем ясно, каким образом эта структура может функционировать, поскольку она должна иметь до 150 витков на каждый миллион молекулярного веса и до 3000 водородных связей, которые должны более или менее одновременно подвергнуться распаду, чтобы могло произойти необходимое развертывание спирали.

Недавно были опубликованы первые расчеты, произведенные на основе действительных рентгенограмм дезоксирибонуклеиновой кислоты [105f]. Хотя нельзя считать, что эти данные противоречат гипотезе спаренной спиралевидной структуры, но в некоторых отношениях они, по-видимому, не совпадают с моделью Уотсона—Крика. Наблюдалось два типа структуры: кристаллическая структура *A* и менее упорядоченная структура *B*, более близкая к модели Уотсона—Крика. При изменении степени влажности исследуемого образца структура *A* может перейти в структуру *B*, и наоборот. В структуре *A* фосфатные группы, по-видимому, располагаются на спирали радиусом 9 Å с числом остатков, равным 11 на каждый виток. Расстояние между парой витков спирали равно 28 Å, и плоскости оснований располагаются приблизительно на расстоянии 2,55 Å один от другого, что делает необходимым наклон оснований к главной оси под углом около 25°. В структуре *B* расстояние между парой витков спирали равно 34 Å и имеется по 10 остатков на каждый виток, но радиус спирали, по-видимому, равен 8,5 Å, а не 10 Å, как это следует из модели Уотсона—Крика.

Следует отметить, что в структурах предполагаемого типа пары спиралей располагаются значительно ближе между собой, чем это было бы, если бы они были расположены эквидистантно. Вследствие этого между спиралями образуется «желобок». Вопрос о том, может ли этот желобок, как предполагалось, способствовать образованию полипептидной цепи или нет, является предметом обсуждений.

4. НУКЛЕОПРОТЕИДЫ

Размеры и структура молекул нуклеиновых кислот и большое число имеющихся в них заряженных групп способствуют соединению нуклеиновых кислот с белками.

В клетке нуклеиновые кислоты присутствуют вместе с белками и могут быть извлечены из нее в виде белковых комплексов, извест-

ных под названием нуклеопротеидов. Последние широко исследовались, причем во многих случаях полагали, что их препараты содержат молекулы только одного вида. На самом же деле из нормальных клеток не было выделено ни одного нуклеопротеида, который можно было бы считать однородным по размерам молекул, физическим свойствам и химическому составу. Для этого имеются основательные причины. В клетке находятся многие разновидности молекул рибонуклеиновой и, вероятно, дезоксирибонуклеиновой кислот, которые различным образом могут связываться с белками. Если, что кажется вероятным, рибонуклеиновая кислота непосредственно участвует в синтезе белков, то все белки цитоплазмы должны в определенный момент соединяться с рибонуклеиновой кислотой. В выделенных из клеток нуклеопротеидах нуклеиновая кислота и белки соединены друг с другом главным образом солевыми связями; эти соединения могут легко диссоциировать. Действительно, при некоторых методах получения нуклеопротеиды распадаются в процессе их экстрагирования. Отсюда не следует, что выделенный нуклеопротеид существует в клетке непременно как таковой. Для правильного определения того места, которое занимает нуклеиновая кислота и связанный с ней белок в структуре клетки, необходимы дополнительные данные.

Первые сведения о нуклеопротеидах были получены Мишером при исследовании клеточных ядер [1], когда он открыл нуклеиновые кислоты и доказал, что нуклеиновая кислота присутствует в ядре вместе с белком.

В ядрах сперматозоидов взрослого лосося Мишер обнаружил нуклеиновую кислоту, связанную с веществом основного характера, содержащим большое количество азота, которое можно было экстрагировать разбавленными кислотами. Это вещество не давало многих из обычных реакций на белок, и Мишер назвал его протамином. Он установил, что протамин образует с нуклеиновой кислотой нерастворимую соль, по составу весьма сходную с солью, получаемой из головок сперматозоидов. Позднее Коссель [106] выделил из спермы осетра и других рыб основания, подобные, но не идентичные основаниям протамина из спермы лосося, и предложил объединить все такие вещества под общим названием протаминов. Обнаружив аргинин, лизин и гистидин среди продуктов гидролиза стурина—протамина из спермы осетра, Коссель [107] получил первые данные, указывающие на белковую природу протаминов. Позднее его мнение, что протамины являются простыми белками с большим содержанием основных аминокислот, подтвердилось.

В 1884 г. Коссель [108] открыл в ядрах эритроцитов гуся основной белок, который по своим свойствам отличался от других известных белков и от протаминов. Этот белок был экстрагирован разбавленной соляной кислотой из нерастворимой массы ядер, оставшихся после повторного промывания эритроцитов водой. Этот белок осаж-

дался из кислых растворов поваренной солью или аммиаком. В нем содержалось 52,3% углерода, 7,1% водорода и 18,5% азота. Аналогичные основные белки были найдены в некоторых других клеточных ядрах, и вся группа была названа гистонами. Гистоны отличаются высоким содержанием основных аминокислот, что определяет их свойство растворяться в разбавленных кислотах и не растворяться в аммиаке, а также тем, что они находятся в клеточных ядрах. От протаминов они отличаются большей величиной молекул и более сложным аминокислотным составом.

Гистоны и протамины представляют два главных типа основных белков, находимых в клеточных ядрах. Протамины встречаются только в ядрах зрелых сперматозоидов некоторых видов рыб, а гистоны присутствуют в ядрах большинства других клеток.

А. Выделение нуклеопротеидов

При экстрагировании разбавленным раствором едкого натра или раствором карбоната натрия большинство клеток дает раствор, содержащий нуклеиновую кислоту и белок, которые при подкислении осаждаются вместе. При добавлении к этому раствору разбавленной неорганической кислоты удаляется некоторое количество белка, остальной же белок остается более прочно связанным с нуклеиновой кислотой. Прежде в литературе этот последний комплекс назывался «нуклеином» (здесь этот термин, первоначально введенный Мишером, имеет несколько иной смысл). Таким путем были получены многие препараты «нуклеопротеида» даже в последние годы. Они мало интересны, так как в процессе их приготовления нуклеиновые кислоты деполимеризуются, белки денатурируются, и получаемый продукт, по существу, имеет мало общего с тем, который находится в неповрежденной клетке.

Тем не менее уже давно были известны менее грубые методы выделения нуклеопротеидов из некоторых тканей. Лилиенфельд [109] экстрагировал нуклеопротеид из зобной железы теленка дистиллированной водой. Этот нуклеопротеид осаждался уксусной кислотой. (Вообще же нуклеопротеиды нерастворимы в кислых растворах.) При экстрагировании разбавленной HCl гистон переходил в раствор, а из остатка можно было выделить щелочью нуклеиновую кислоту. Препарат состоял в основном из нуклеогистона и содержал 16,9% азота и 3,0% фосфора. Подобные же методы применяли Холлибертон [110] для выделения нуклеопротеидов из печени и Хаммарстен [111] для приготовления нуклеопротеидов из поджелудочной железы быка. Гюискемп [112] изучал растворимость нуклеопротеида из зобной железы в растворах нейтральных солей различной концентрации и обнаружил, что этот нуклеопротеид осаждается при определенных малых концентрациях NaCl, $CaCl_2$ и $MgSO_4$, тогда как при более высоких и более

низких концентрациях он растворяется. Основная масса этого нуклеопротеида не растворялась в 0,1-процентном растворе $CaCl_2$ или 0,9-процентном NaCl. Однако часть его оставалась в растворе и содержала около 1% фосфора, тогда как содержание фосфора в нерастворимой фракции составляло 3,8%. Нуклеопротеид с низким содержанием фосфора не содержал гистона, вместо него был белок, имевший в своем составе меньшее количество азота. Этот белок был сравним с нуклеопротеидом с малым содержанием (0,43%) фосфора, найденным Лилиенфельдом [109] в цитоплазме лейкоцитов. Вероятно, это был рибонуклеопротеид из цитоплазмы. Подобный нуклеопротеид был получен Бангом [113, 114] экстрагированием зобной железы 0,9-процентным раствором NaCl с последующим осаждением нуклеопротеида разбавленной уксусной кислотой. Результаты этих исследований растворимости нуклеопротеидов легли в основу методов их выделения, впоследствии описанных Мирским.

Одним из важных моментов в выделении нуклеопротеидов является отделение составных веществ ядра от компонентов цитоплазмы. В своих первоначальных исследованиях клеток гноя Мишер удалял цитоплазму путем переваривания ее пепсином. В дальнейшем Мишер пользовался спермой рыб, основную массу которой составляют клеточные ядра. Хвостики и цитоплазму сперматозоидов он удалял разбавленным раствором уксусной кислоты. Этот способ, по существу, идентичен с более поздним методом, в котором для выделения клеточных ядер применялась лимонная кислота. Коссель впервые выделил гистон из ядер эритроцитов птиц, гемолизируя клетки и вымывая цитоплазму водой. Когда нуклеопротеиды экстрагируют из цельной ткани, не пытаясь разделить компоненты ядер и цитоплазмы, такие нуклеопротеиды представляют собой смеси рибо- и дезоксирибонуклеопротеидов из совершенно различных частей клетки. (Это менее важно в случае зобной железы, в которой ядра составляют основную массу клеток.) Примером могут служить два нуклеопротеида печени, полученные Гринштейном и Дженреттом [115] путем экстрагирования 0,5 *М* раствором KCl при pH 8 с последующим осаждением при pH 4,2. Препараты этого типа содержат значительно больше рибонуклеиновой кислоты, чем дезоксирибонуклеиновой, и получаются как из ядер, так и из цитоплазмы [116].

1) ЭКСТРАГИРОВАНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ РАСТВОРАМИ СОЛЕЙ

В 1865 г. Хоппе-Зейлер обнаружил, что при экстрагировании клеток гноя 10-процентным раствором NaCl с последующим фильтрованием экстракта получается вязкая жидкость, из которой при разбавлении водой выпадает волокнистый осадок. Это вещество исследовал Мишер [1], который очень близко подошел к объяснению

его происхождения; после того как заметил, что головки сперматозоидов лосося набухают в концентрированном растворе соли. Волокнистое вещество, полученное также из других тканей, сравнивали с миозином и фибрином. (Бенсли [117] назвал его плазмозином и ошибочно считал, что оно, хотя бы частично, происходит из цитоплазмы.) Его истинная природа была установлена после того, как Мирский и Поллистер показали, что основная масса материала, составляющего клеточное ядро, растворяется в 10-процентном растворе NaCl и снова осаждается в 0,14 *М* NaCl в виде волокнистого нуклеопротеида.

Такова основа примененного Мирским и Поллистером [116, 118] метода выделения нуклеопротеидов. Ткань подвергают повторному экстрагированию 0,14 *М* раствором NaCl, при этом удаляется основная масса компонентов цитоплазмы и остается вещество ядер. Последнее экстрагируется 1 *М* NaCl и переходит в вязкий раствор, после разбавления которого до 0,14 *М* NaCl осаждаются волокна. Вещество снова растворяют в 1 *М* NaCl и несколько раз осаждают. Таким способом Мирский и Поллистер выделили комплекс протамина с дезоксирибонуклеиновой кислотой (нуклеопротамин) [118] из спермы форели и из зобной железы, нуклеопротеидную фракцию которого они назвали «хромозином» [116]. (Хромозин не следует смешивать с «хромозомином» Стедмена.) Белковым и нуклеопротеидным фракциям, полученным из ядер, даны такие названия, как «хромозомин», «хромозин» и «генопротеин». Эти термины следует сохранить до выяснения связи названных веществ со структурой хромосом. Хромозин выделяли также из печени, почек, селезенки, поджелудочной железы и мозга млекопитающих, из семенников лягушки, из эритроцитов птиц и рыб, из печени рыб, из зародышей зерна пшеницы и из микроорганизмов типа III *Pneumococcus*. Нуклеопротеиды не экстрагируются растворами NaCl из спермы млекопитающих и из многих бактерий.

Доказательство того, что перечисленные выше препараты ядерного происхождения, основывается на следующих данных: 1) по многим физическим свойствам они сходны с нуклеопротеидами спермы, которые большей частью должны происходить из клеточных ядер; 2) почти вся находящаяся в них нуклеиновая кислота является дезоксирибонуклеиновой кислотой; 3) цитологическое исследование ткани показывает, что эти вещества исчезают из ядер лишь при экстрагировании 1 *М* NaCl, когда ядра теряют наибольшую часть своих компонентов; 4) количества этих веществ, выделенных из различных тканей, пропорциональны отношению объемов ядер и цитоплазмы; 5) один и тот же материал был получен из изолированных ядер и из тех структур, которые считаются изолированными хромосомами. Хотя не может быть сомнения в том, что основная масса «хромозина» происходит из ядра, степень его загрязнения компонентами цитоплазмы зависит от полноты их уда-

ления 0,14 *М* раствором NaCl. Для исследования негистоновых белковых компонентов ядер Мирский и Поллистер использовали в качестве исходного материала клеточные ядра, выделенные путем центрифугирования после отделения цитоплазмы разбавленным раствором лимонной кислоты.

Таким методам выделения нуклеопротеида из клеточных ядер присущи некоторые недостатки. В большинстве тканей содержатся ферменты, способные деполимеризовать дезоксирибонуклеиновые кислоты, которые могут экстрагироваться вместе с нуклеопротеидами. Чтобы уменьшить возможность автолиза, нуклеопротеиды обычно выделяют при 0—5°. Некоторые исследователи для подавления активности дезоксирибонуклеазы при выделении дезоксирибонуклеопротеидов применяли арсенаты или цитраты, хотя имеются данные, свидетельствующие о том, что эти ингибиторы не действуют на присутствующие в зобной железе и селезенке ферменты, способные деполимеризовать дезоксирибонуклеиновые кислоты [119]. Кроме того, как будет показано ниже, в 1 *М* растворе NaCl нуклеогистоны и нуклеопротамины диссоциируют так, что выделенные нуклеопротеиды находятся в меньшем соответствии с клеточными структурами, чем в других случаях. Штерн с сотрудниками [120, 121] описали методы выделения нуклеопротеидов из зобной железы без применения концентрированных растворов соли. Белки цитоплазмы удаляются промыванием 0,14 *М* раствором NaCl в присутствии арсената. По одному методу, который является видоизмененным методом Гюискемпа, нуклеопротеид (главным образом дезоксирибонуклеогистон) экстрагируется водой и осаждается 0,14 *М* раствором NaCl. (Этот препарат был назван «генопротеидом Т».) Оргель и Штерн [122] экстрагировали дезоксирибонуклеопротеиды из зобной железы (после удаления веществ цитоплазмы) 20-процентным раствором этилового спирта при —5°. Затем их осаждали при pH 4,6 и переосаждали 0,14 *М* раствором NaCl.

2) НУКЛЕОПРОТЕИДЫ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

Главными составными веществами клеточного ядра являются дезоксирибонуклеиновая кислота, основные белки (в некоторых ядрах сперматозоидов—протамины, а в большинстве других ядер—гистоны) и белковая фракция, не относящаяся к основным белкам, содержащая триптофан. В большинстве ядер имеется также рибонуклеиновая кислота, отсутствующая в ядрах сперматозоидов. Препараты нуклеопротеидов из клеточных ядер, полученные вышеописанными методами, состоят из дезоксирибонуклеиновой кислоты и основных белков в различных количественных соотношениях в зависимости от метода выделения, от величины фракции неосновных белков и от содержания рибонуклеиновой кислоты.

3) ПРОТАМИНЫ

Ограниченное распространение протаминов вызывает удивление [106], и биологическое значение этого явления до сих пор не выяснено. Протамины найдены в ядрах зрелых сперматозоидов некоторых семейств и родов рыб (включая *Salmo* spp. и сельдь), в которых они составляют целиком фракцию основного белка, а в некоторых сперматозоидах—почти весь белок ядер [1, 118]. В ядрах соматических клеток протамины не обнаружены. В организмах тех видов, где они присутствуют, их распространение ограничено ядрами зрелых сперматозоидов. Мишер [1] обнаружил, что в незрелых сперматозоидах лосося содержится иной белок, а Банг [123] выделил из незрелых семенников макрели белковую фракцию, обладающую свойствами гистона, хотя в зрелых сперматозоидах как лосося, так и макрели содержатся протамины [106]. В соматических клетках всех исследованных видов рыб находятся гистоны. Недавно в ядрах сперматозоидов домашней птицы был обнаружен белок, похожий на протамин [124]; возможно также, что протамины находятся в сперматозоидах многих видов животных.

Протамины обычно получают путем экстрагирования головок сперматозоидов или изолированных нуклеопротеидов спермы разбавленными растворами неорганических кислот с последующим осаждением этиловым спиртом. Протамины выделяют также путем диализа нуклеопротаминов в целлофановых мешочках против 1 *М* раствора NaCl [118], при этом протамины проходят через целлофан.

Протамины представляют собой белки сравнительно простой структуры с очень высоким содержанием основных аминокислот, особенно аргинина, и, следовательно, с большим содержанием (25—30%) азота. В салмине (протамине из сперматозоидов лосося) 89—90% всего белкового азота приходится на долю аргинина—единственной основной аминокислоты этого протамина, который содержит только семь аминокислот. Протамины других видов рыб тоже обладают сравнительно простой структурой, но отличаются аминокислотным составом. В некоторых протаминах содержатся основные аминокислоты—гистидин или лизин, или оба вместе, а также аргинин. Поскольку во всех известных протаминах нет триптофана и содержащих серу аминокислот и большинство их не содержат тирозина или фенилаланина, они не дают многих обычных реакций на белок. Это обстоятельство вместе с их другими необычными свойствами объясняет, почему протамины в продолжение нескольких лет после их открытия не считались белками. Те протамины, которые были подвергнуты соответствующим испытаниям, оказались неантигенными, возможно потому, что в них нет ароматических аминокислот. Неполный аминокислотный анализ некоторых протаминов производился химическими методами, а аминокислотный

состав салмина определяли методом хроматографии на колонке и микробиологическими методами (табл. 10; см. также т. I, гл. III).

Протамины являются белками с необычно малыми молекулами. Протамины спермы форели легко проходят через целлофан при диализе. Аминокислотный анализ салмина (вероятно, из *Salmo salar*) дает минимальный молекулярный вес около 8000 (57 аминокислотных остатков), если считать, что частицы представляют собой отдельные молекулы [125]; при определении концевых групп по методу Портера и Сангера была обнаружена одна концевая иминогруппа пролина на 57 аминокислотных остатков [131].

4) ГИСТОНЫ

Косселю удалось выделить гистоны только из немногих животных тканей, и он пришел к выводу, что они, вероятно, имеют ограниченное распространение [106]. Применение более новых методов выделения нуклеопротеидных комплексов из клеточных ядер позволило обнаружить присутствие гистонов в различных животных тканях [116], что дает основание предположить, что гистоны содержатся в большинстве животных клеток, за исключением сперматозоидов, содержащих протамины. Гистоны не были выделены из микроорганизмов, хотя имеются некоторые доказательства их присутствия в *Pneumococcus* [116]. Пока не известно, содержатся ли они в клеточных ядрах растений.

Гистоны обычно получаются путем экстрагирования ядер или выделенных нуклеопротеидов разбавленными кислотами (0,2 н. HCl), а из полученного раствора их можно осадить высаливанием или добавлением щелочи до pH около 10. Поскольку это является одним из немногих удовлетворительных методов отделения их от нуклеиновой кислоты и других белков клеточных ядер, то для их выделения не применяли менее грубых методов.

Гистоны представляют собой основные белки, значения изоэлектрических точек которых лежат в интервале pH между 10 и 11; для гистонов характерны следующие простые свойства: 1) они растворимы в кислотах и нейтральных растворах, но осаждаются аммиаком; в избытке аммиака осадок снова не растворяется; 2) они растворимы в растворе $HgSO_4$ в разбавленной серной кислоте. Если к этому раствору добавить нитрит натрия, то в результате реакции Миллона раствор принимает красную окраску. В противоположность протаминам гистоны при тепловой денатурации становятся нерастворимыми.

Гистоны содержат 17—19% азота. Их аминокислотный состав характеризуется высоким содержанием аргинина, гистидина и лизина, но в них присутствуют также аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Из табл. 10 следует, что состав гистонов совершенно отличен от состава протаминов (см. также т. I, гл. III). В гистонах

Таблица 10

СОСТАВ ПРОТАМИНОВ, ГИСТОНОВ И ОСНОВНЫХ БЕЛКОВ СПЕРМЫ (В ГРАММАХ АЗОТА α-АМИНОКИСЛОТ НА 100 г АЗОТА)

Аминокислота	Протамины				Белок спермы моллюска		Белок спермы иглокожих			Гистоны					
	лосось [125]	канадская форель [126]	клупеин [127]	сперма домашней птицы [124]	*Patella vulgata* [128]	*Patella coerulea* [128]	*Arbacea lixula* [128]	*Brissopsis lyrifera* [128]	*Echinocardium cordatum* [128]	зобная железа теленка I [124]	зобная железа теленка II [124]	зобная железа теленка [130]	печень теленка [124]	печень крысы [129]	эритроциты домашней птицы [124]
Аргинин	22,4	21,74	22,35	19,1	12,3	21,2	6,95	7,15	7,75	5,40	7,07	7,68	6,60	7,45	6,35
Гистидин	—			0,51	0,31	0,0	0,51	0,61	0,43	1,10	1,18	1,33	1,16	1,55	1,17
Лизин	—			0	9,8	3,8	14,3	13,3	14,4	5,00	7,22	5,4	6,23	6,10	6,29
Глутаминовая кислота	—			0,45	—	—	—	—	—	5,87	6,18	2,25	5,44	5,78	5,75
Аспарагиновая кислота	—			0,28	—	—	—	—	—	3,87	3,82	3,3	3,20	4,30	3,49
Аммиак	—			0,17						4,08	4,97	4,8	4,01	5,05	5,13
Глицин	1,81			2,80	4,7	4,0	10,8	13,3	11,7	5,71	6,13	5,2	6,02	6,31	5,79
Аланин	0,57	2,08	1,84	1,22	6,1	2,4	14,8	13,0	13,7	7,10	7,60	6,0	6,65	7,41	7,30
Валин	1,23	3,50	3,67	0,68	2,2	1,6	1,45	2,8	2,3	3,72	2,72	4,9	3,64	4,48	3,94
Лейцин	0,57				1,75	1,6	2,4	3,0	1,36	5,38	5,11	3,05	5,38	6,24	5,81
Изолейцин	—			0,35	0,59	0,26	2,0	2,4	1,95	2,80	2,16	12,0	2,74	3,54	3,68
Фенилаланин	—				—	—	—	—	—	1,53	1,42	1,9	1,63	1,39	1,63
Триптофан	—			0	—	—	—	—	—			0,015		0,0	
Тирозин	—			1,58	—	—	—	—	—	1,31	1,60	1,4	1,66	2,41	1,62
Пролин	2,30	6,11	3,76	1,94	4,8	1,7	6,1	5,0	5,6	2,86	2,51	2,7	2,31	1,91	2,68
Серин	3,94	2,02	1,73	3,89	4,6	5,7	4,3	11,7	4,7	3,24	3,17	3,45	3,05	4,19	4,54
Треонин	—			0,72	2,1	0,94	1,39	2,8	2,3	3,78	3,85	3,1	4,20	4,42	3,39
Цистин	—				—	—	—	—	—	0,26	0,28			0,0	
Метионин	—			0,0	—	—	—	—	—	0,49	0,67		0,47	0,88	0,0
Общее количество азота, %	99,9	100,7	100,4	92,0	96,6	108,6	101,2	111,1	104,6	87,2	98,7	99,5	92,7	104,9	96,2

обнаружены только следы триптофана. Неизвестно, состоят ли изолированные гистоны из одного или нескольких видов молекул, но препараты гистонов, полученные из различных видов животных, обнаруживают близкое сходство по своему аминокислотному составу (см. табл. 10).

Молекулярный вес гистонов из клеточных ядер неизвестен. В противоположность протаминам, гистоны не проходят через целлофан при диализе и обладают явно более высоким молекулярным весом, чем протамины.

5) ДРУГИЕ ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ

Основные белки, находимые в сперме некоторых животных, по своим свойствам занимают среднее положение между протаминами и гистонами [106]. Основные белки, получаемые путем экстрагирования из спермы некоторых моллюсков и иглокожих, содержат большое количество аргинина и лизина и по своему аминокислотному составу сходны с некоторыми протаминами (см. табл. 10). Однако при диализе они не проходят через целлофан. Фракция основных белков, выделенная Мирским и его сотрудниками из спермы домашней птицы, почти по всем свойствам сходна с протаминами, но в противоположность последним содержит глутаминовую и аспарагиновую кислоты.

6) ДРУГИЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

Дезоксирибонуклеиновая кислота и основные белки давно считались главными составными веществами клеточных ядер. По данным Мишера, было вычислено, что 81% (считая на сухое вещество) головок сперматозоидов лосося составляют нуклеиновая кислота и протамины [1], а позднее Мирский и Поллистер показали, что дезоксирибонуклеиновая кислота и протамин, выделенные из клеточных ядер спермы форели, составляют 91% их массы [118]. Однако окончательно еще не было доказано, что в клеточных ядрах, за исключением ядер сперматозоидов рыб, не содержится других белковых компонентов, хотя предпринимались многие попытки доказать это. Аккерман [132] считал, что содержание азота и фосфора в ядрах эритроцитов домашней птицы соответствует содержанию 42% нуклеиновой кислоты и 58% гистона, и пришел к заключению, что их состав действительно таков, хотя ему и не удалось выделить каждый из этих компонентов в теоретически возможном количестве. Одна из проблем ранних работ по количественной характеристике белков клеточных ядер была связана с трудностью полного отделения гистона от нуклеогистонов путем экстрагирования кислотами. Штейдель [133] показал, что таким экстрагированием можно извлечь только часть гистона из смеси нуклеогисто-

нов, искусственно приготовленных путем смешивания гистона и нуклеиновых кислот.

Стедмен и Стедмен [134—136] обнаружили, что после экстрагирования разбавленной кислотой основных белков клеточных ядер оставалось некоторое количество белка, который обладал меньшим содержанием аргинина, чем большинство гистонов (8—9,8%), и давал положительные триптофановую и тирозиновую реакции. Они назвали эту белковую фракцию «хромозомином» и считали, что она составляет значительную часть всего ядра (20—30%, считая на сухое вещество ядер сперматозоидов лосося, и больший процент у других клеточных ядер). Эта белковая фракция медленно растворяется в щелочи и осаждается уксусной кислотой. «Хромозомин» ни разу не был получен свободным от нуклеиновой кислоты и не был охарактеризован более детально. Хотя Стедмен и Стедмен показали, что в клеточных ядрах имеется белковая фракция, содержащая триптофан с меньшим содержанием аргинина, чем у гистонов, однако их определения количеств этой белковой фракции в различных клеточных ядрах по разности нельзя считать надежными, а высказанные соображения о составе ядер сперматозоидов рыб не согласуются с результатами работ других исследователей. Вероятно, «хромозоминовая» фракция включает основные белки, которые не экстрагируются кислотой.

Мирский и Поллистер [116] показали, что в большинстве клеточных ядер содержится негистоновая белковая фракция, содержащая триптофан, которая, несомненно, частично соответствует «хромозомину» Стедмен и Стедмена. Она впервые была найдена в нуклеопротеиде, выделенном по методу Мирского из зобной железы и других тканей. Белки полностью отделяли от нуклеиновой кислоты путем растворения нуклеопротеида в 1 *М* растворе NaCl и встряхивания с хлороформом, в результате чего на границе раздела хлороформ—вода белки образовывали гель, а нуклеиновая кислота оставалась в растворе. Белок, оставшийся после экстрагирования гистонов кислотой, содержал почти весь триптофан исходного нуклеопротеидного препарата и не обладал характерными свойствами гистона.

Эта белковая фракция, названная «остаточным белком», была получена также из изолированных ядер и тех структур, которые Мирский и Рис [137, 138] считали изолированными хромосомами. После удаления из хромосом гистона 1 *М* раствором NaCl при pH 2,9 и дезоксирибонуклеиновой кислоты дезоксирибонуклеазой остаточный белок и очень небольшое количество (около 3%) нуклеиновой кислоты остается нерастворенным в виде спирально свернутых нитей, значительно меньших, чем исходные хромосомы.

Остаточный белок содержит 15,3—16,6% азота и 1,36% триптофана (при выделении из зобной железы теленка) и не растворяется в нейтральных кислых растворах. Подобные белковые фракции,

остающиеся после экстрагирования гистонов из клеточных ядер зобной железы теленка, печени крысы и эритроцитов домашней птицы, содержат аспарагиновую и глутаминовую кислоты, глицин, серин, аланин, тирозин, аргинин, валин, лейцин, фенилаланин, пролин и 0,76—1,2% триптофана [139].

Б. Природа нуклеопротеидов

1) ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ

Нуклеопротеиды, выделенные из ядер сперматозоидов форели, лосося и сельди, почти полностью состоят из дезоксирибонуклеиновой кислоты и протамина. Нуклеопротеид из ядер сперматозоидов форели содержит около 6% фосфора; исходя из этого можно вычислить, что данный нуклеопротеид состоит приблизительно из 64% нуклеиновой кислоты и 36% протамина. Феликс с сотрудниками [140, 141] нашли, что нуклеопротеиды из ядер сперматозоидов сельди и некоторых видов форели содержат почти эквимолярные количества аргинина и фосфора. В протаминах из сперматозоидов этих рыб аргинин является единственной основной аминокислотой, и в нуклеопротамине нуклеиновая кислота и протамин соединены солевыми связями между первичными фосфорильными группами нуклеиновой кислоты и гуанидиновыми группами аргинина. Мишер [1] и позднее Штейдель [142] показали, что при смешивании эквимолярных количеств протамина и нуклеиновой кислоты образуются нейтральные соли, состав которых подобен составу обезжиренных ядер сперматозоидов.

Нуклеопротеиды, полученные из ядер зобной железы по методу Мирского, содержат около 40% дезоксирибонуклеиновой кислоты, 1—2% рибонуклеиновой кислоты, гистоны и неосновной белок [138]. Главная масса рибонуклеиновой кислоты и неосновного белка вместе с незначительной частью дезоксирибонуклеиновой кислоты остается связанной в структурах, похожих по форме на хромосомы («остаточные» хромосомы); их можно удалить центрифугированием, после чего в растворе остается нуклеопротеид, представляющий собой в основном комплекс дезоксирибонуклеиновой кислоты с гистоном. Назовем эти препараты нуклеогистонами, хотя в них может содержаться небольшое количество негистонового белка. Содержание нуклеиновой кислоты в нуклеогистоне изменяется в зависимости от способа получения, но обычно оно составляет около 45—50%, считая на сухое вещество.

Недавно Райли и Арндт [142а] показали, что нуклеопротеиды, очень осторожно выделенные из ядер зобной железы и из ядер сперматозоидов сельди, по своей способности рассеивать рентгеновские лучи ведут себя весьма сходно с синтетическими смесями соответствующего белка с нуклеиновой кислотой. По-видимому, это можно

считать прямым доказательством того, что данные нуклеопротеиды являются лишь молекулярными комплексами, а не действительными соединениями, в которых нуклеиновые кислоты и белки определенным образом ориентированы друг относительно друга.

2) НУКЛЕОПРОТЕИДЫ ЦИТОПЛАЗМЫ

Основная масса рибонуклеиновой кислоты клеток находится в цитоплазме, меньшая ее часть—в ядрах. За исключением найденного в яичном белке комплекса авидин-дезоксирибонуклеиновая кислота, последняя ни разу не была определенно обнаружена вне ядра нормальных клеток, хотя сомнительно, чтобы применявшимися методами можно было это сделать, если она содержится в очень небольших количествах. Кроме того, следует иметь в виду, что при клеточном делении, когда ядерная оболочка распадается, между цитоплазмой и ядром может произойти некоторый обмен их компонентами.

Значительную часть (если не всю) рибонуклеиновой кислоты можно экстрагировать из цитоплазмы многих клеток в виде комплекса нукленновая кислота-белок; бо́льшая часть этого комплекса связана с частицами различных размеров, которые можно осадить в центрифуге. Большинство этих частиц содержит значительные количества компонентов, иных, чем рибонуклеиновая кислота и белок.

Компоненты цитоплазмы большинства клеток можно экстрагировать нейтральным 0,14 *М* раствором NaCl или разбавленным фосфатным буфером. При подкислении до pH около 4,2 белок и рибонуклеиновая кислота осаждаются вместе. Мирский и Поллистер [116] подвергали дальнейшей очистке эту фракцию, полученную из клеток печени, путем растворения в разбавленном растворе $NaHCO_3$ и осаждения при pH 4,2. Количественное отношение азота к фосфору в этой фракции составляло приблизительно 11 : 1. В ней содержалась рибонуклеиновая кислота, но не было дезоксирибонуклеиновой кислоты. Эта фракция сравнима с нуклеопротеидной фракцией, найденной Лиллиенфельдом [109], Гюискемпом [112] и другими, обладающей низким содержанием фосфора и сходной по растворимости.

а) Связь рибонуклеиновой кислоты с частицами цитоплазмы. В экстрактах большинства клеток, полученных при помощи разбавленных растворов NaCl или нейтрального фосфатного буфера, после удаления массы клеточных фрагментов и ядер содержатся частицы различных размеров, которые могут седиментироваться. Химическую природу этих частиц впервые подробно исследовал Клод [143, 144], который дифференциальным центрифугированием разделил их на две фракции: частицы, тождественные с уже известными цитологам митохондриями и секреторными гранулами диаметром 500—2000 *мμ*, и более медленно осаждающиеся частицы

«микросомы» диаметром 50—300 *мμ*. После центрифугирования в течение полутора часов при $18000 \times g$ в надосадочной жидкости содержались частицы, которые можно было отцентрифугировать под действием более мощных центробежных полей. Крупные гранулы соответствуют митохондриям, но при экстрагировании разбавленными солевыми растворами они изменяют свою форму, становясь шаровидными, скучиваются и теряют характерные для них свойства окрашиваться. При экстрагировании 0,8—1,0 *М* растворами сахарозы митохондрии сохраняют свою вытянутую форму и свойства окрашиваться, и их можно отделить в центрифуге в виде довольно гомогенной фракции [145]. Микросомы со средним диаметром около 120 *мμ* не являются единственными меньшими, чем митохондрии, частицами в клеточных экстрактах, ибо, как показали Шантрен [146] и Жене [147, 148], в экстрактах из печени мыши находятся частицы различной величины, которые можно разделить на большое число фракций соответствующим дифференциальным центрифугированием. Все эти фракции содержат рибонуклеиновую кислоту, белок, липид и фосфолипид, но их состав сильно варьирует. Митохондрии, в которых имеются системы окислительных ферментов, отличаются низким содержанием рибонуклеиновой кислоты. В фракциях более мелких частиц количественное отношение рибонуклеиновой кислоты ко всему азоту возрастает до 0,09—1,0 *мг* рибонуклеиновой кислоты на 1 *мг* азота с уменьшением средних размеров частиц. С частицами этих фракций связаны некоторые ферменты, в том числе некоторые фосфатазы. Препараты микросом, получаемые в растворах сахарозы, обнаруживают двойное лучепреломление в потоке, по-видимому, эти частицы имеют удлиненную форму [144]. Пири [149] выделил из тканей листьев табака, томата, сахарной фасоли и некоторых других растений частицы, обладающие некоторым сходством с более мелкими частицами из животных клеток. Препараты, получаемые дифференциальным центрифугированием, в значительной степени состоят из частиц диаметром 20—30 *мμ* и обнаруживают неоднородность при электрофорезе и ультрацентрифугировании. Они содержат белок, рибонуклеиновую кислоту, липид и небольшое количество фосфолипида (13—15% азота, 2—3% фосфора и 10—16% углевода в виде глюкозы).

Частицы, выделенные из цитоплазмы животных клеток, неустойчивы и с течением времени подвергаются автолизу [144]. В дистиллированной воде митохондрии вследствие разрушения их наружной оболочки распадаются на частицы, по размерам и составу подобные микросомам. При экстрагировании более крупных гранул, включая митохондрии, 0,6 *М* раствором KCl в карбонат-бикарбонатном буфере (pH около 9,5) [147] также получаются меньшие частицы, содержащие рибонуклеиновую кислоту. Эти частицы сходны с более мелкими частицами, выделяемыми непосредственно из клеточных экстрактов, тем, что они также очень неодно-

родны по размерам и содержат рибонуклеиновую кислоту, количество которой уменьшается с увеличением размеров комплекса.

Поскольку более мелкие частицы, содержащие рибонуклеиновую кислоту, можно выделить в таких условиях, при которых митохондрии устойчивы, маловероятно, что они появляются в результате распада более крупных частиц. Возможно, рибонуклеиновая кислота находится в клетке в свободном состоянии и соединяется с белком при экстрагировании цитоплазмы. Во многих экстрактах цитоплазмы после их центрифугирования в течение 1 часа при 60 000 $\times g$ рибонуклеиновая кислота находится в жидкости над осадком. При электрофорезе в среде с pH 5,6—8,2 она мигрирует медленнее свободной рибонуклеиновой кислоты и, по-видимому, связана с другими компонентами клетки, вероятно с белком. Однако рибонуклеиновая кислота, добавляемая к таким экстрактам, передвигается с той же скоростью [150]. Жене [151] изолировал фракции, состоящие из частиц различных размеров, из тканей, у которых часть фосфора находилась в виде изотопа P^{32}, и обнаружил, что относительное содержание P и P^{32} в фракциях рибонуклеиновой кислоты, выделенных по методу Шмидта и Таннхаузера, весьма различно в зависимости от величины частиц фракций. Этого не могло быть, если бы нуклеиновая кислота, находящаяся в частицах, извлекалась во время экстрагирования из ассоциатов, содержащих свободную рибонуклеиновую кислоту. При объяснении результатов подобных экспериментов следует иметь в виду, что во многих клеточных экстрактах не весь фосфор в фракции рибонуклеиновой кислоты, выделяемой по методу Шмидта и Таннхаузера, входит в состав рибонуклеотидов [152]. Тем не менее весьма вероятно, что рибонуклеиновая кислота, ассоциированная с липид-белковыми комплексами, связана в клетке как таковая.

Имеется мало сведений о белках, непосредственно соединяющихся в цитоплазме с рибонуклеиновой кислотой, но возможно, что большинство белков цитоплазмы некоторое время бывает связано с ней. В противоположность дезоксирибонуклеиновой кислоте клеточных ядер рибонуклеиновая кислота цитоплазмы не связывается с белками, у которых преобладают основные функции.

б) Соединение нуклеиновой кислоты со специфическими белками. В нескольких случаях из цитоплазмы был экстрагирован специфический белок в соединении с нуклеиновой кислотой.

Применяя различные методы, можно выделить из яичного белка авидин в виде либо растворимого в воде белка, либо нерастворимого в воде нуклеопротеида [30]. Последний содержит 1% фосфора, и, во всяком случае, бóльшая часть находящейся в нем нуклеиновой кислоты является дезоксирибонуклеиновой кислотой. Обе формы обладают одинаковой способностью связывать биотин. Нуклеопротеид диссоциирует в 0,2 *М* растворе K_2HPO_4, после чего белок

и нуклеиновую кислоту можно разделить посредством электрофореза. Изолированный таким образом белок, по-видимому, идентичен с не содержащим нуклеиновой кислоты авидином, который можно выделить непосредственно из яичного белка. Возможно, авидиновый нуклеопротеид является артефактом, появляющимся в процессе выделения. Тем не менее он служит интересным доказательством существования дезоксирибонуклеиновой кислоты вне клеточного ядра.

Амуар [58, 153] показал, что из мышц карпа можно выделить два белка, обладающих свойствами тропомиозина. Один из них—свободный белок—содержит не более 0,2% фосфора, другой же является комплексом рибонуклеиновой кислоты и тропомиозина (нуклеотропомиозин). Содержание рибонуклеиновой кислоты в различных препаратах нуклеотропомиозина колеблется от 15 до 20%; при хранении их в среде с pH 3,5 некоторое количество тропомиозина отщепляется и остающийся нуклеопротеид содержит около 39% рибонуклеиновой кислоты. Как тропомиозин, так и нуклеотропомиозин кристаллизуются. Метод приготовления кристаллических препаратов включает экстрагирование 0,5 *М* раствором фосфата, обладающим достаточно большой ионной силой, необходимой для диссоциации многих нуклеопротеидов; возможно, что ассоциация рибонуклеиновой кислоты с тропомиозином происходит в процессе выделения.

В. Связь нуклеопротеидов со структурой клеточных ядер

В 1927 г. Коссель [106] писал, что «пока еще не известно, образуется ли соединение нуклеиновой кислоты с гистоном в зобной железе». Это утверждение в значительной степени остается справедливым и в настоящее время, так как, хотя дезоксирибонуклеиновую кислоту и гистон можно изолировать в виде нуклеопротеида многими методами, очевидно, что во время экстрагирования, при котором гистоны и нуклеиновая кислота становятся растворимыми, они будут соединяться друг с другом. Доказательство наличия связи между гистоном и дезоксирибонуклеиновой кислотой в клеточных ядрах является косвенным; оно основано на усилении способности хромосом связывать основные красители после экстрагирования гистонов и кислотные красители после удаления дезоксирибонуклеиновой кислоты [154, 155], однако эти факты можно было бы объяснить и иначе. Тем не менее соединение гистона с нуклеиновой кислотой кажется возможным по крайней мере в хромосомах в стадии метафазы, хотя нельзя считать, что это соединение идентично тому, которое происходит в изолированных нуклеогистонах.

Строение ядер изучали как цитохимическими методами, так и путем химического анализа изолированных ядерных структур. Наиболее специфической гистохимической реакцией на дезоксирибо-

нуклеиновую кислоту является реакция Фёльгена, которая обусловлена неустойчивостью глюкозидной связи в пуриновых дезоксирибонуклеозидах и сильно выраженным альдегидным характером дезоксирибозы. При непродолжительной обработке кислотой гидролизуются некоторые глюкозидные связи углевода с пуриновыми основаниями (и, возможно, некоторые неустойчивые полимерные связи, включающие С-1 на остатках дезоксирибозы) и освобождаются альдегидные группы на остатках углевода, которые еще связаны с основной цепочкой нуклеиновой кислоты через фосфатноэфирные связи. Альдегидные группы образуют окрашенный комплекс с пararозанилин-SO_2, и так как они связаны с основной цепочкой нуклеиновой кислоты, то окрашенный продукт с трудом диффундирует, и местонахождение дезоксирибонуклеиновой кислоты определяется *in situ* [156, 157]. Если кислотный гидролиз заходит слишком далеко, то могут подвергнуться гидролизу связи фосфорных эфиров, что вызовет образование диффундирующих окрашенных комплексов, способных абсорбироваться другими клеточными компонентами. Этим можно объяснить некоторые результаты исследований Стедмен и Стедмена [134], которые пришли к заключению, что реакцией Фёльгена невозможно определить местонахождение дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке. Реакцию Фёльгена могут давать и некоторые другие вещества со свободными альдегидными группами. Рибонуклеиновая кислота не дает этой реакции.

К сожалению, не известно специфической химической реакции рибонуклеиновых кислот, которая была бы пригодна в качестве гистохимического теста. Была использована способность нуклеиновых кислот поглощать основные красители. В общем это свойство не специфично, так как им обладают все кислотные вещества в клетке. Если клетки окрашиваются основными красителями — пиронином и метиловым зеленым (окрашивание по методу Унна—Паппенхейма), то цитоплазма, впитывая пиронин, принимает красную окраску, ядро же окрашивается в зеленый цвет. Браше [158] показал, что после обработки рибонуклеазой окрашивание цитоплазмы пиронином сильно ослабевает. Это подтвердилось при использовании рибонуклеазы, лишенной протеолитической активности. На основании этого был сделан вывод, что в соответствующих условиях окрашивания дезоксирибонуклеиновая кислота поглощает метиловый зеленый и некоторые сходные с ним красители, тогда как рибонуклеиновая кислота окрашивается пиронином. На самом же деле изолированные рибо- и дезоксирибонуклеиновые кислоты обе поглощают пиронин, но первая сильнее; в то же время полинуклеотиды с большими молекулами, освобождаемые из дезоксирибонуклеиновой кислоты дезоксирибонуклеазой, окрашиваются пиронином так же, как и рибонуклеиновая кислота [159]. Таким образом, окрашивание не является надежным способом опре-

деления наличия и местоположения нуклеиновых кислот. Кроме того, все эти цитохимические методы применяются на фиксированных препаратах.

Нуклеиновые кислоты и некоторые другие компоненты клетки можно идентифицировать по их ультрафиолетовым спектрам поглощения; используя при этом рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу, можно в некоторых случаях различить оба типа нуклеиновой кислоты. Этот метод широко применяли Касперссон с сотрудниками [29, 160], получившие весьма интересные результаты, хотя количественная сторона их работы получила слишком высокую оценку [161]. Следует отметить, что определение белков, богатых основными аминокислотами, которые Касперссон производил посредством ультрафиолетовой спектрофотометрии, основывается на таких различиях спектров поглощения, которые не обнаруживаются у изолированных гистонов [116], и поэтому не может иметь большой ценности.

Характер структуры клеточных ядер в стадии интерфазы является предметом полемики. Рибонуклеиновая кислота находится в ядрышках [162], тогда как в фиксированных ядрах видны мелкие гранулы (хромоцентры или «гетерохроматиновые» тельца), которые дают положительную реакцию Фёльгена, часто вместе с тонкими нитями—хромонематами. В некоторых ядрах фиксированные хромоцентры соответствуют тельцам, видимым в ядре живой клетки при использовании фазоконтрастной микроскопии [163]. Они также соответствуют видимым в ультрафиолетовом микроскопе участкам, поглощающим свет с длиной волны 260 *мμ*. Однако было отмечено, что продолжительное воздействие ультрафиолетовых лучей необратимо повреждает ядро и что при фотографировании ядер в стадии интерфазы в ультрафиолетовом свете при короткой экспозиции, в течение которой клетка не повреждается, обнаруживается одинаковое поглощение света во всем ядре [164, 165]. Это свидетельствует о довольно равномерном распределении дезоксирибонуклеиновой кислоты в интерфазных ядрах, но не известно, связано это распределение с ее отделением от хромосом или с набуханием последних. Теория Стедмен и Стедмена [134], согласно которой дезоксирибонуклеиновая кислота присутствует в ядерном соке во всех стадиях, включая деление клетки, основывается на неправильном истолковании реакции Фёльгена.

Во время деления клетки, когда хромосомы бывают видимыми, результаты окрашивания по Фёльгену, ультрафиолетовое поглощение и данные определений микроколичеств фосфора согласуются с тем выводом, что вся дезоксирибонуклеиновая кислота ядра находится в хромосомах. Имеются некоторые данные о том, что последние содержат также небольшое количество рибонуклеиновой кислоты [166]. В эухроматиновых участках гигантских хромосом слюнных желез дрозофилы полосы, богатые дезоксирибону-

клеиновой кислотой, чередуются с полосами с малым содержанием этой кислоты.

В нескольких случаях химическому анализу подвергали изолированные «хромосомы», но идентификация их остается сомнительной. Клод и Поттер [167] изолировали «хроматиновые нити», растирая ядра с песком в физиологическом растворе поваренной соли или в дистиллированной воде с последующим центрифугированием. На основании размеров нитей, элементарного состава (в них содержалось 3,8% фосфора) и окрашивания по Фёльгену Клод и Поттер считали их хромосомами или частями хромосом. Мирский и Рис [137] дезинтегрировали ядра или целые клетки в 0,14 *М* растворе NaCl под действием срезающих усилий в дезинтеграторе Уоринга или в коллоидной мельнице. Путем дифференциального центрифугирования они выделили структуры, которые считали изолированными хромосомами. По размерам, форме и характеру окрашивания эти структуры сходны с хромосомами в стадии метафазы. В различных препаратах из одной и той же ткани можно обнаружить до известной степени индивидуальные структуры довольно постоянной величины и формы. Некоторые из них обладали такими структурами, характерными для хромосом, как спутники или ассоциированные ядрышки. Однако основная масса изолированных «хромосом» может представлять собой механические артефакты, так как Лэмб [168] обнаружил, что в результате приложения срезающих усилий при изолировании ядер последние вытягиваются, принимая удлиненную форму, так что в конце концов короткие волокна нуклеопротеида удлиняются.

Независимо от того, являются эти нити искусственными фрагментами ядра или нет, их химическая структура обладает интересными особенностями. После удаления липидов такие нити из клеточных ядер зобной железы теленка содержат 3,7 % фосфора, 15,6% азота, около 37% дезоксирибонуклеиновой кислоты и небольшое количество рибонуклеиновой кислоты. Гистон и дезоксирибонуклеиновую кислоту можно легко удалить обработкой 1 *М* раствором NaCl при pH 5 и дезоксирибонуклеазой, после чего остаются очень небольшие нерастворимые свернутые нити, состоящие почти целиком из белка неосновного характера. Этот явно фибриллярный белок может составлять важную часть структуры хромосом, хотя количество его в различных ядрах сильно колеблется: от 4% в эритроцитах карпа до 39% в печени теленка. Есть данные, показывающие, что этот белок не является компонентом цитоплазмы; с другой стороны, некоторые белковые вещества ядра утрачиваются при изолировании ядер водными растворителями [169].

Г. Биологическая функция нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов

Со времени открытия нуклеиновых кислот косвенные данные указывали на их две важные биологические функции, которые, вероятно, в значительной степени взаимосвязаны. Прежде всего постоянное присутствие дезоксирибонуклеиновой кислоты в клеточных ядрах всех организмов и нуклеиновой кислоты в вирусах указывало на их существенную роль в генетическом механизме. Затем связь нуклеиновых кислот с белками свидетельствовала о их участии в синтезе белков. Пока все рибонуклеиновые и все дезоксирибонуклеиновые кислоты считались в общем химически одинаковыми, было трудно понять, какую роль они могут играть в таких высокоспецифических процессах. При современных знаниях как возможных, так и действительно существующих структурных вариациях молекул нуклеиновых кислот роль этих кислот стала очевидной; одновременно с этим были получены новые данные о специфической роли нуклеиновых кислот в биологических процессах.

1) Связь дезоксирибонуклеиновой кислоты с генетическим механизмом

Одной из характерных особенностей клеточных ядер является постоянство их хромосомного набора. В большинстве соматических клеток число хромосом в 2 раза больше, чем в гаметах. Очень редко в некоторых тканях соматические клетки бывают полиплоидными. В клетках, деление которых прекратилось, уже невозможно различить и сосчитать отдельные хромосомы, но изучение делящихся клеток приводит к выводу, что изменение набора хромосом происходит только во время деления клеток. Подобную же правильность количественного распределения в ядрах обнаруживает и дезоксирибонуклеиновая кислота.

Буавэн, Вандрели Р. и Вандрели С. [170—172] определили среднее содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах клеток некоторых животных тканей и нашли, что в тканях животных одного и того же вида количество дезоксирибонуклеиновой кислоты на одно ядро постоянно и приблизительно в 2 раза больше, чем в сперматозоидах, тогда как у животных разных видов содержание рибонуклеиновой кислоты на одно ядро соматической клетки различно. Независимо от указанных авторов это важное соотношение открыли Мирский и Рис [173, 174a], которые показали, что оно справедливо для разнообразных видов животных (табл. 11), хотя количество дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах яиц еще не было измерено достаточно точно. Эти определения, произведенные путем химического анализа множества подсчитанных клеток, дают лишь среднее содержание нуклеиновой кислоты в большом числе

ядер, но до сих пор еще не удалось измерить достаточно точно содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты в отдельных ядрах, чтобы узнать, насколько оно изменяется между отдельными ядрами. По относительному содержанию дезоксирибонуклеиновой кислоты в отдельных ядрах, определяемому цитохимическими методами,

Таблица 11

СОДЕРЖАНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТОЧНЫХ ЯДРАХ

Животное	Клетка	Количество дезоксирибонуклеиновой кислоты на ядро, $мг \cdot 10^{-6}$	Ссылка на литературу
Домашняя птица	Эритроциты	2,49	174
	Печень	2,66	174
	Почки	2,20	174
	Селезенка	2,54	174
	Сердце	2,45	174
	Поджелудочная железа	2,61	174
	Сперматозоиды	1,26	173
Жаба	Эритроциты	7,33	173
	Сперматозоиды	3,70	173
Карп	Эритроциты	3,49	173
	Сперматозоиды	1,64	173
Бурая форель	Эритроциты	5,79	173
	Сперматозоиды	2,67	173
Amphiuma	Эритроциты	168	174а

дающими весьма приблизительные относительные величины, клетки печени, в которых, как известно, имеет место полиплоидия, можно разделить на три достаточно четко выраженных класса со средним содержанием дезоксирибонуклеиновой кислоты соответственно в 2, 4 и 8 раз больше, чем у гаплоидных ядер спермы [175]. Эти простые соотношения не применимы к клеткам, продолжающим делиться [176].

Таким образом, в пределах одного вида количество дезоксирибонуклеиновой кислоты, связанной с гаплоидным набором хромосом, в неделящихся клетках постоянно. Можно было бы предположить, что при сопоставлении величин, характеризующих содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах клеток животных различных видов, должны были бы обнаружиться некоторые закономерности и, возможно, функциональная зависимость между числом генов в клетке и количеством содержащейся в ней дезоксирибонуклеиновой кислоты. Однако это предположение не оправдалось, хотя, например, у рыб содержание дезоксирибонуклеиновой

кислоты у близкородственных видов сходно, так как в общем количество этой кислоты на одно ядро не связано с положением животного на данной ступени эволюции, но у гомологических типов клеток оно, по-видимому, зависит от размеров клетки. Возможно, как предполагают Мирский и Рис [174а], что содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты зависит от числа нитей в хромосомах.

Если дезоксирибонуклеиновая кислота является частью генетического механизма и составляет по крайней мере некоторую часть самих генов, то кислота, связанная с хромосомным набором каждого организма, должна состоять из большого числа различных специфических типов молекул. В настоящее время нет прямого метода, посредством которого можно было бы это обнаружить, хотя имеется веское доказательство того, что в растительном вирусе, а именно в вирусе желтой мозаики табака, находится несколько типов молекул рибонуклеиновой кислоты. Многие дезоксирибонуклеиновые кислоты были химически охарактеризованы по их пуриновому и пиримидиновому составу, представляющему средний состав возможных различных типов молекул препаратов. Пуриновый и пиримидиновый состав дезоксирибонуклеиновых кислот характерен для тех видов организмов, из которых они были выделены. Между рибонуклеиновыми кислотами, полученными из разных тканей одного и того же организма, не было обнаружено значительных различий, но такие различия наблюдаются между кислотами, выделенными из организмов разных видов (табл. 8). Среди высших животных, за исключением, может быть, человека, эти различия невелики и наиболее значительны в отношении содержания 5-метилцитозина в рибонуклеиновой кислоте. Различия по составу рибонуклеиновых кислот в самых широких пределах обнаружены у бактерий и вирусов. Микроорганизмы, по-видимому, отличаются от высших организмов отсутствием в них заметных количеств 5-метилцитозина. Тем не менее близкородственные штаммы бактерий или вирусов обладают сходным составом дезоксирибонуклеиновых кислот. Микроорганизмы, несомненно, должны отличаться от высших организмов меньшим числом генов, поэтому между различными видами микроорганизмов, вероятно, имеются более значительные различия по генному составу, чем между разными видами высших животных. Если каждый ген связан с молекулой нуклеиновой кислоты специфического состава, а определяемый обычными методами состав нуклеиновой кислоты является средней величиной, то наибольшее различие в составе нуклеиновых кислот будет наблюдаться у простейших организмов.

Таким образом, гаплоидному набору хромосом любого организма соответствует определенное количество дезоксирибонуклеиновой кислоты специфического общего состава. Это можно объяснить, если предположить, что дезоксирибонуклеиновая кислота образует часть того механизма, который обеспечивает постоянство

генетических свойств клеточных ядер, и это совместимо с тем наблюдением, что по крайней мере в некоторых тканях (за исключением делящихся клеток) скорость обмена фосфора дезоксирибонуклеиновой кислоты невелика [177]. В противоположность этому для рибонуклеиновой кислоты ядер и цитоплазмы не установлено такого постоянства как в отношении ее количества [171], так, по-видимому, и в отношении состава [178]. В клетках с активным обменом атомы фосфора рибонуклеиновой кислоты, по-видимому, находятся в состоянии быстрого обмена [177]. Кроме того, в ядрах спермы некоторых рыб, которые должны содержать мужской набор генов, фактически весь белок является протамином; этот простой белок не найден ни в каких других клетках организма, и поэтому в высшей степени маловероятно, что он может быть носителем свойств генов. Дальнейшее доказательство генетической специфичности нуклеиновых кислот представляют вирусы. В случае бактериофага при внедрении в клетку организма-хозяина в нее проникает не вся частица вируса, а только часть ее, в которой содержится вся дезоксирибонуклеиновая кислота вируса (и, возможно, некоторое количество белка), так что именно эта часть должна быть носителем генетической специфичности вируса. Если инфицированная бактерия становится лизогенной, тогда наследственное свойство—в определенных условиях продуцировать данный бактериофаг—передается бактерии. Единственным определенно известным случаем передачи генетической специфичности при помощи свободной нуклеиновой кислоты являются факторы трансформации бактерий [179—183].

2) ФАКТОРЫ ТРАНСФОРМАЦИИ БАКТЕРИЙ

Известно, что в определенных условиях растущие клетки ослабленного неинкапсулированного штамма R *Pneumococcus* типа II могут трансформироваться в вирулентный инкапсулированный штамм S *Pneumococcus* гетерологичного специфического типа (типа III) при добавлении убитых нагреванием бактерий типа III или экстрактов из них. Таким образом, наследственное свойство вырабатывать специфический полисахарид может быть передан бактериям путем специфического переноса материала от штамма бактерий, нормально вырабатывающих этот полисахарид. Следовательно, указанный процесс является передачей генетической специфичности. В 1944 г. Эвери, Мак-Леод и Мак-Карти [179] показали, что такую трансформацию обычно вызывает очищенная дезоксирибонуклеиновая кислота из *Pneumococcus* типа III. Необходимая для трансформации полная система сложна: к специфическому трансформирующему фактору (дезоксирибонуклеиновой кислоте) следует добавлять питательный бульон и сыворотку, обычно содержащую пневмококковые R-антитела. Бульон необходим для роста бактерий, роль же сыво-

ротки точно не выяснена, хотя известно, что R-антитела служат для обеспечения скученного роста бактерий [180].

Очищенный фактор трансформации обладает составом и свойствами дезоксирибонуклеиновой кислоты [181—183], он не содержит серологически обнаруживаемого полисахарида, специфического для данного типа бактерий, и дает отрицательные реакцию Миллона и биуретовую реакцию. Он специфически инактивируется дезоксирибонуклеазой.

Буавэн с сотрудниками [184, 185] описал трансформирующий фактор из бактерий *Escherichia coli* (штамм S_1), который передает другому штамму свойство вырабатывать полисахарид, специфичный для штамма S_1. Этим фактором является препарат неочищенной дезоксирибонуклеиновой кислоты из бактерий; его активность подавляется дезоксирибонуклеазой.

Чрезвычайно трудно окончательно доказать, что трансформирующими факторами действительно являются свободные дезоксирибонуклеиновые кислоты. Минимальное количество препарата *Pneumococcus*, активного в трансформации типа, равно 0,003 *мг*. В нем должно содержаться около $4 \cdot 10^8$ молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты с молекулярным весом 500 000. Таким образом, количество активного начала, связанного с нуклеиновой кислотой, может быть еще меньше. Трансформирующий фактор из *E. coli* не был тщательно очищен и также содержал рибонуклеиновую кислоту. Кроме того, в процессе его приготовления (автолиз бактерий, переваривание пепсином при pH 2 и растворение в $NaHCO_3$), как известно, свойства дезоксирибонуклеиновых кислот изменяются. Инактивация ферментов не обязательно характеризует активный материал. Например, вирус табака инактивируется рибонуклеазой, с которой он образует нерастворимый комплекс, но рибонуклеиновая кислота вируса остается незатронутой.

С другой стороны, очищенный трансформирующий фактор из *Pneumococcus* фактически не содержит белка, не реагирует серологически на специфичный для данного типа полисахарид; при ультрацентрифугировании и электрофорезе его активное начало образует единственный пик на кривой, соответствующей нуклеиновой кислоте. Поэтому наиболее обоснованным является вывод, что биологически активным материалом является дезоксирибонуклеиновая кислота. Это наводит на мысль, что в бактериях находится несколько различных типов молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты, связанных с различными специфическими генетическими процессами. Тэйлор [186] показал, что в препаратах дезоксирибонуклеиновой кислоты из бактерий *Pneumococcus* типа III содержатся по меньшей мере два трансформирующих начала. Недавно Гочкис [187] обнаружил, что сопротивляемость *Pneumococcus* антибиотикам может также передаваться препаратами дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученными из устойчивых штаммов.

Интересной особенностью фактора трансформации из *Pneumococcus* является его инактивация некоторыми самоокисляющимися веществами, такими, как катехин, гидрохинон и аскорбиновая кислота, которая катализируется ионами Cu^{2+} и обращается глутатионом и другими соединениями, содержащими сульфгидрильные группы [188]. Это не сопровождается сколько-нибудь заметными изменениями свойств дезоксирибонуклеиновой кислоты.

3) НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И НУКЛЕОПРОТЕИДЫ В СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

Доказательство участия нуклеиновых кислот в синтезе белков является косвенным, так как ничего не известно о каком-либо механизме синтеза, в котором участвуют нуклеиновые кислоты. Существуют некоторые структурные единицы, удвоение которых в клетке, по-видимому, происходит автономно в том смысле, что структура и биологическая специфичность вновь образованных частиц определяются только структурой и специфичностью идентичных частиц, из которых возникли новые частицы. К таким структурным единицам относятся гены в хромосомах, вирусы и, вероятно, самоудвояющиеся частицы цитоплазмы, обладающие независимой генетической непрерывностью (плазмагены). Хромосомы и вирусы содержат как белок, так и нуклеиновую кислоту. Неизвестен белок, не содержащий нуклеиновой кислоты, который был бы способен к «самоудвоению» этого типа. Правда, такой процесс, как превращение трипсиногена в трипсин под влиянием трипсина формально является процессом самоудвоения, но структурная специфичность молекул трипсина в данном случае предсуществует в трипсиногене. Вирусы не размножаются путем удвоения своих предшественников—крупных молекул в клетке организма-хозяина.

Роль нуклеиновой кислоты в генетической детерминации находится в тесной взаимосвязи с ее ролью в синтезе белков. Во многих случаях достоверно установлено, что активность гена связана с образованием специфического белка или фермента, и возможно, что это верно в отношении всех генетических признаков. Данные, относящиеся к некоторым вирусам, подтверждают, что носителем генетической специфичности, по крайней мере частично, является входящая в их состав нуклеиновая кислота, тогда как многие биологические свойства вируса определяются его белком.

Соответствие между количеством рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме клеток и скоростью синтеза белков цитоплазмы представляет единственное доказательство участия рибонуклеиновой кислоты в синтезе цитоплазматических белков. Этот вывод основывается прежде всего на данных о распределении нуклеиновых кислот в клетках различных типов, полученных Касперссоном [160, 189, 190], применившим ультрафиолетовую микроспектрофотометрию,

и Браше [158, 191], использовавшим окрашивание пиронином—метиловым зеленым совместно с ферментативной деполимеризацией нуклеиновых кислот. Оба этих автора обнаружили, что количество рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме клеток различных типов бывает максимальным в растущих клетках или в клетках, заведомо синтезирующих значительные количества белка, таких, как растущие ооциты или секреторные клетки поджелудочной железы. Колдуэлл, Мэккор и Хиншелвуд [192] нашли, что в клетках *Bacterium lactis aerogenes*, растущих по экспоненциальному закону с различными скоростями, зависящими от условий или от штамма микроорганизма, существует приблизительная пропорциональность между обратной величиной средней продолжительности жизни одного поколения бактерий и отношением количеств рибонуклеиновой кислоты и клеточного азота. Однако для бактерий, не находящихся в фазе экспоненциального роста, и для клеток *Polytomella cocci* [148, 193] нет простой линейной количественной зависимости между содержанием рибонуклеиновой кислоты и средней скоростью синтеза белков. Поскольку рибонуклеиновые кислоты у большинства клеток находятся в частицах различных размеров, которые при определенных условиях роста могут увеличиваться с неодинаковой скоростью, то подобной прямой зависимости для них ожидать нельзя.

Свенсон [194] показал, что спектр действия ультрафиолетового излучения, тормозящего образование адаптивной ферментной системы галактозимазы в дрожжах, очень сходен со спектром поглощения нуклеиновой кислоты. Однако дозы излучения, которые могут оказать тормозящее действие, делают большинство клеток нежизнеспособными, и поэтому результаты вышеупомянутых опытов не представляют прямого доказательства специфического участия нуклеиновой кислоты в образовании галактозимазы.

На основании результатов исследования клеточных компонентов путем измерения поглощения в ультрафиолете Касперссон [160, 190] предложил тщательно разработанные теории образования белков в клетке. Он предположил, что ядра клеток непосредственно участвуют в синтезе белков цитоплазмы и что гетерохроматин (или связанный с ядрышком хроматин) управляет образованием рибонуклеиновых кислот и белков в цитоплазме. Определение роли гетерохроматина в значительной мере основывается на данных Касперссона и Шульца [195], показавших, что у *Drosophila* наличие добавочной Y-хромосомы приводит к значительному увеличению содержания рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме клетки. Непосредственным химическим анализом не было получено доказательства какого-либо различия в содержании рибонуклеиновой кислоты, связанного с добавочной Y-хромосомой [196]. Результаты многих опытов показывают, что ядро клетки не является необходимым для продолжения синтеза белков. Браше и Шантрен [197] нашли, что,

когда одноклеточная водоросль *Acetabularia mediterranea* делится на фрагменты, образование белков (определяемое по включению C^{14} в белок) протекает одинаково как в ядерных, так и в безъядерных фрагментах в течение примерно 2 недель, а в безъядерных частях бывает заметно даже спустя 5 недель.

Было также установлено включение меченых аминокислот в изолированные микросомы и митохондрии [198, 199].

С другой стороны, образование рибонуклеиновой кислоты, по-видимому, зависит от клеточных ядер. В разделившихся пополам клетках *Ameba proteus* количество рибонуклеиновой кислоты в половинках, обладающих ядрами, остается постоянным, тогда как в безъядерных половинках оно непрерывно уменьшается [200]. Измерения количества P^{32}, включаемого в рибонуклеиновую кислоту тканей и клеток зародыша, приводят к выводу, что фосфор рибонуклеиновой кислоты ядер обладает наиболее высокой начальной специфической активностью [201, 202]. Это верно также и в отношении к клеткам, находившимся в состоянии фосфорного голодания.

Эти наблюдения находятся в соответствии с тем мнением, что синтез белков цитоплазмы происходит в ней при участии рибонуклеиновой кислоты и что синтез последней хотя бы частично регулируется ядрами, которые, таким образом, во время синтеза белка могут придавать им генетическую специфичность. После образования белков в нормальной клетке связь между белком и нуклеиновой кислотой нарушается, а в вирусах белок и нуклеиновая кислота остаются связанными и после того, как синтез уже полностью завершен.

II. ВИРУСЫ

1. ВВЕДЕНИЕ

Хотя вирусы, вызывающие заболевание человека и домашних животных, известны в течение многих столетий, их природа до сравнительно недавнего времени оставалась неизвестной. Спустя некоторое время после того, как было установлено, что причиной болезней являются бактерии, русский ботаник Ивановский [203], исследуя мозаику табака, которая была открыта незадолго до того, обнаружил, что ее возбудитель способен проникать через фильтровальную бумагу, а также через фильтровальные свечи, которые задерживают обычные бактерии. Несколько лет спустя Леффлер и Фрош [204] в докладе, представленном Германской имперской комиссии по изучению болезни ног и полости рта у крупного рогатого скота, констатировали, что возбудитель этой болезни не только гораздо мельче любых известных бактерий, но и способен к размножению. Постепенно стали открывать все больше и больше та-

ких «фильтрующихся вирусов», как их назвали, и в настоящее время известно о существовании вирусных заболеваний у многих видов растений, животных и бактерий.

Из этого краткого обзора следует, что термином «вирус» обозначается свойство или ряд свойств, характеризуемых главным образом размерами частиц и их патогенностью. Во многих случаях, особенно для растительных вирусов, отличительные признаки вируса еще более неопределенны. У многих растительных вирусов невозможно определить размеры их частиц, и их относят к вирусам только по общему сходству возбуждаемых ими заболеваний с болезнями, причиной которых заведомо являются вирусы. В крайнем случае условно принято считать заболевание вирусным, если не обнаружено никакого другого очевидного его возбудителя. Поэтому не следует ожидать слишком большого сходства между различными вирусами. Весьма удивительно уже то обстоятельство, что сходство действительно существует и причина его, вероятно, кроется в том, что вирусы должны обладать некоторыми определенными химическими свойствами, обеспечивающими их генетическую непрерывность, а не в том, что вирусы произошли от общего предка.

В 1922 г. Мак-Каллуму и Оппенгеймеру [205] удалось очистить вирус вакцины, частично посредством центрифугирования в средах различной плотности. Частицы вируса вакцины довольно крупные элементарные тельца и легко различимы под обычным микроскопом при освещении на затемненном поле, и, вероятно, именно поэтому работа названных авторов не привлекла к себе большого внимания. Объектом многих ранних исследований по очистке вирусов был вирус мозаики табака, выбор которого был обусловлен его большой устойчивостью и инфекциозностью. В некоторых отношениях эти свойства были только предполагаемыми, так как прежние методы испытания на инфекциозность были чрезвычайно грубы, и, вероятно, многие из полученных тогда положительных результатов в действительности являлись следствием случайного заражения подопытных растений, а не инокуляции вируса. Вследствие этого вирус мозаики табака в ряде случаев выделяли, не зная его природы, до тех пор пока Стэнли [206] не опубликовал работу о получении кристаллического глобулина, обладающего свойствами вируса. Приблизительно в то же время аналогичными исследованиями занимались и другие ученые. Боуден и Пири [207], работавшие в Англии с вирусом X картофеля, заметили, что их частично очищенный материал обладал свойствами белка, а Бест [208] в Австралии обнаружил, что инфекционный компонент вируса мозаики табака осаждается в кислых растворах вместе с веществом, которое он идентифицировал как глобулин.

В то же время Шлезингер [209, 210] в Германии получил в чистом виде один из более крупных бактериофагов *Escherichia coli* и показал, что его препараты в основном состоят из белка, содер-

жащего фосфор, и дают реакции на сахара. Вскоре после того, как Шлезингер эмигрировал в Англию, он показал, что этот бактериофаг, как и еще один, содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту, т. е. содержит нуклеопротеид [211].

Повторяя работу Стэнли, Боуден и Пири показали, что вирус мозаики табака содержит около 0,5% фосфора, который можно выделить из денатурированного белка вируса в виде нуклеиновой кислоты типа рибозы [212]. В течение нескольких последующих лет они выделили ряд растительных вирусов, в том числе вирус карликовой кустистости томата [213]—первый из вирусов, который был получен в виде истинных трехмерных кристаллов («кристаллы» вируса мозаики табака являются тактоидами, или паракристаллами). В дальнейшем было получено в чистом виде несколько других растительных вирусов. Большинство из них было изолировано в кристаллическом состоянии, все они оказались рибонуклеопротеидами.

Тем временем, главным образом в результате развития техники центрифугирования, было получено в чистом виде несколько животных вирусов, в частности вирус вакцины (который, как известно, имеет важное значение в медицине), вирус папилломы серого кролика (возбудитель опухолей у этой породы кролика) и вирус гриппа. После окончания второй мировой войны ожидалось повсеместное распространение эпидемии гриппа, подобно тому как это было в 1918—1919 гг., что и послужило толчком для проведения множества работ с вирусом гриппа; полученный многими группами исследователей материал стал доступным для химических и физических исследований в больших масштабах.

Одной из наиболее значительных работ последнего времени в области исследования животных вирусов является работа Бергольда [214], который обнаружил присутствие вирусных частиц внутри многогранных телец, образующихся при некоторых болезнях у насекомых. Эти вирусы являются исключительными, поскольку они представляют собой единственные животные вирусы, которые, как это точно установлено, содержат дезоксирибонуклеиновую кислоту, но лишены рибонуклеиновой кислоты.

В послевоенные годы многие исследователи сосредоточили свою деятельность на изучении бактериофагов. Эти вирусы составляют единственную в своем роде группу паразитов в том отношении, что они могут образовать множество частиц, одновременно паразитирующих в бактерии-хозяине. Через определенное время (обычно несколько минут) бактерия-хозяин разрывается и освобождает множество дочерних вирусных частиц. Эта система особенно удобна для изучения процессов обмена и для исследований при помощи радиоактивных меченых атомов; вполне вероятно, что в течение ближайших лет количество сведений о размножении бактериофагов будет непрерывно возрастать.

Несколько иной подход к проблеме бактериофагов был у тех исследователей, которые изучали «лизогенные» бактерии, несущие в себе скрытые вирусы. В настоящее время хорошо известно, что во многих организмах возможно присутствие скрытых вирусных инфекций, и кажется несомненным, что в ряде случаев, когда для объяснения различных явлений допускалось существование «плазмагенов», например «убивающего» фактора в плазме *Paramecium*, эти явления правильнее объяснить существованием скрытых патогенов, во многих отношениях сходных с другими вирусами.

2. РАСТИТЕЛЬНЫЕ ВИРУСЫ

А. Общие методы очистки

Как упоминалось выше, те растительные вирусы, которые до настоящего времени были изолированы и подвергнуты анализу, оказались по своему составу рибонуклеопротеидами. Однако эти вирусы являются лишь немногими из более устойчивых растительных вирусов, и было бы преждевременным делать обобщения и утверждать, что все растительные вирусы представляют собой простые рибонуклеопротеидные молекулы. В самом деле, в настоящее время мы располагаем значительным количеством данных о том, что существуют относительно большие и сложные растительные вирусы, по размерам и структуре сравнимые с более крупными животными вирусами. В настоящем обзоре будут рассматриваться только устойчивые вирусы, которые могут существовать в растениях в высокой концентрации.

Получение растительных вирусов в чистом виде осложняется целым рядом факторов, зависящих от структуры высших растений (до сих пор ничего не известно о вирусах, поражающих нецветковые растения, такие, как хвойные, папоротники, хвощи, мхи, грибы и водоросли). Растительные клетки отличаются большими размерами и обладают жесткими стенками, покрытыми изнутри тонким слоем протоплазмы, в которой находятся ядра. Бо́льшую часть клетки занимает вакуоля, наполненная жидкостью. Чтобы извлечь вирус, клетки приходится разрушать; при этом разнообразные компоненты клетки смешиваются и образуют нефизиологическую суспензию, обычно называемую соком. Немедленно начинается окисление, в результате которого образуется некоторое количество сходных с хиноном веществ. Из этой смеси, имеющей в общем кислую реакцию, приходится выделять вирус.

Можно сформулировать несколько общих правил успешного выделения растительных вирусов. Исходные растения должны быть очень молодые, хорошо подкормленные и с буйным ростом. Кроме исключительных случаев, инфицирование, как правило, следует производить за 2—3 недели до начала выделения вирусов. Листья

срезают и затем замораживают в течение 18 час. или более при —10°. Это делает нерастворимой бо́льшую часть веществ, которые иначе могли бы мешать процессу очистки. Затем листья измельчают в мясорубке, и после оттаивания полученной пульпы сок отжимают через ткань. При наличии больших количеств материала для отделения сока применяют гидравлический пресс или корзиночную центрифугу. Вид полученного таким способом сока до некоторой степени зависит от типа и возраста растений, но обычно это мутная жидкость зеленовато-бурого цвета. Следующий этап обработки—первичное осветление сока—является, по-видимому, наиболее важной стадией очистки вируса, так как при этом удаляется много такого материала, который в дальнейшей стадии обработки вызвал бы затруднения.

Для осветления сока обычно применяют три следующих метода.

а) Если сок нагревать до температуры выше 55°, в нем образуется коагулят, и содержащую вирус надосадочную жидкость, получаемую после непродолжительного центрифугирования при малом числе оборотов, можно применять для дальнейшей обработки. Таким способом весьма успешно изолируют термостабильные вирусы, такие, как вирус мозаики табака и X-вирус картофеля; однако некоторые вирусы, например Y-вирус картофеля, от такой обработки разрушаются или увлекаются сгустком.

б) К соку при помешивании добавляют этиловый спирт (из расчета не менее 300 *мл* спирта на 1 *л* сока). Спирт коагулирует большое количество растительного материала. Этот способ эффективен во многих случаях. В одном или двух случаях, например в случае вируса желтой мозаики репы, необходимое для коагуляции количество этилового спирта приближается к максимальной концентрации, какую может вынести вирус, поэтому этот способ следует применять очень осторожно.

в) К соку при размешивании добавляют Na_2HPO_4 (из расчета 20 *г* соли на 1 *л* сока), лучше в виде пересыщенного раствора. В результате образуется коагулят, который можно отделить центрифугированием. В общем этот, хотя и широко применяемый, метод является наименее эффективным из всех трех перечисленных методов, и в некоторых случаях его применение ведет к значительной потере вируса.

Дальнейшую очистку растительного вируса можно произвести одним из двух следующих способов: а) методом высаливания, применяемым при обычном изолировании белков, или б) методом, известным под названием дифференциального центрифугирования. Каждый из этих способов обладает своими преимуществами и недостатками. Высаливание может привести к агрегации или даже инактивации вируса, а центрифугирование нельзя применять для изолирования большого количества чистого вируса, и, кроме того, вирус не отделяется достаточно хорошо от крупных частиц примесей.

Дальнейшую очистку вирусов производят путем диализа, при котором наблюдается замечательный эффект—растительные белки становятся нерастворимыми, повторным высаливанием при помощи ферментов, особенно трипсина, слабо действующего на большинство вирусов, и, наконец, в некоторых случаях путем кристаллизации.

Б. Вирус мозаики табака

Этот вирус является одним из наиболее устойчивых вирусов: при комнатной температуре он сохраняет инфекциозность в течение нескольких лет. Этот вирус поражает очень многие растения, но для получения в чистом виде его обычно выращивают на растениях табака или томата. В табаке концентрация этого вируса обычно достигает 1—2 *г* на 1 *л* сока; в очень молодых растениях эта концентрация может быть значительно больше. После отделения сока некоторое количество вируса можно извлечь из сухого остатка действием таких ферментов, как целлюлаза.

В природе можно найти многие штаммы этого вируса. Кроме того, можно искусственно получать и другие штаммы путем отбора мутантов, которые всегда имеются. В Англии наиболее распространенным штаммом является вирус мозаики томата, который почти повсеместно встречается на растениях томата, выращиваемых в парниках. Этот штамм необычен тем, что он неспособен систематически вызывать инфекцию у табака, и поэтому его следует размножать на растениях томата. Другим необычным штаммом является вирус 3 огурца и его желтый мутант—вирус 4 огурца [215], которые одно время были распространены в Англии, откуда были экспортированы в лаборатории всех стран мира. В качестве естественного возбудителя болезни в настоящее время он встречается чрезвычайно редко. За последние 12 лет был отмечен только один такой случай.

Поскольку существует очень много штаммов вируса мозаики табака, то не удивительно, что исследователи, работающие с этим вирусом, используют не один и тот же материал. Например, один из штаммов—вирус мозаики *Aucuba*, применяемый американскими исследователями, оказывает на растение-хозяина совсем иное действие, чем исходный штамм вируса мозаики *Aucuba* у английских исследователей. Английский вирус мозаики *Aucuba* становится возбудителем системного заболевания у растений табака, американский же вирус, который вызывает болезни у табака, в Европе следовало бы назвать вирусом желтой мозаики табака.

1) ОЧИСТКА

Сок, полученный из больных растений, быстро нагревают до 60°, затем охлаждают и центрифугируют. К надосадочной жидкости добавляют насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (0,5 объема надосадоч-

ной жидкости), при этом вирус осаждается в виде тонких игл, которые при размешивании суспензии придают ей шелковистый блеск. Иглы отделяют центрифугированием, а надосадочную жидкость выбрасывают. Осадок снова растворяют в воде, объем которой составляет около $^1/_5$—$^1/_{10}$ от объема сока, и раствор центрифугируют для удаления механических загрязнений. Затем вирус высаливают и 1 или 2 раза ресуспендируют, как описано выше. После этого раствор можно подвергать диализу против проточной водопроводной воды, а затем центрифугировать для удаления возможного осадка. Раствор можно также обработать трипсином (0,5% в растворе) в течение суток при 37°. После того как вирус будет несколько раз осажден сульфатом аммония, трипсин перейдет в надосадочную жидкость.

Очищенный вирус лучше всего хранить в воде в виде 1-процентного раствора или в виде осадка под слоем раствора сульфата аммония. Ни при каких обстоятельствах его не следует высушивать, так как при этом он становится нерастворимым. В особенности нужно избегать процесса, известного под названием замораживания-сушки, или лиофилизации. Нельзя также замораживать растворы с целью их хранения. Эти замечания относятся в равной мере и к другим растительным вирусам, которые всегда следует хранить либо в растворе, либо под слоем концентрированных растворов солей.

Такой метод очистки позволяет получить вирусы в состоянии значительной степени агрегации, что особенно полезно для химических, а в некоторых отношениях и для физических исследований вирусов, когда важное значение приобретает ориентация частиц вируса, например при кристаллографических исследованиях при помощи рентгеновских лучей.

Другой метод очистки, дающий более однородные и менее агрегированные образцы, состоит в том, что осветленный каким-либо из трех вышеописанных способов сок периодически подвергается чередующемуся медленному и быстрому центрифугированию. Продолжительность циклов и число оборотов, соответствующее каждому циклу, не являются критическими, но центрифугирование в течение 30 мин. при 35 000 об/мин, а затем в течение 10 мин. при 10 000 об/мин при трехкратном повторении такого цикла дает хорошие чистые препараты.

Примечание. Процесс центрифугирования настолько сложен, что оптимальные условия работы имеющихся центрифуг в общем приходится определять эмпирически. Однако при всех прочих равных условиях результаты центрифугирования зависят более от скорости вращения ротора, чем от гравитационного поля. Причина этого заключается в том, что размеры центрифужных трубок находятся в некоторой зависимости от величины ротора.

2) ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Вирус мозаики табака имеет приблизительно следующий элементарный состав: 50,0% углерода, 7,3% водорода, 16,5% азота, 0,4% серы и 0,5% фосфора [212]. Некоторые штаммы, например вирусы 3 и 4 огурца, не содержат серы [216]. При денатурации вируса нагреванием до 100° в нейтральных растворах весь фосфор освобождается в виде рибонуклеиновой кислоты. Изолированные аминокислоты типичных штаммов были исследованы при помощи колориметрических и микробиологических методов, однако было бы преждевременно придавать результатам этих исследований большое значение, так как в ближайшие годы более тонкие хроматографические методы, по-видимому, дадут возможность получить гораздо более надежные данные. Некоторые из опубликованных данных приведены в табл. 12. Аминокислотный состав, характерный для некоторых штаммов, представляет большой интерес. Так, штамм вируса ребристости травы содержит гистидин [217], который не найден в типовом штамме, а штаммы вируса огурца, как отмечено выше, не имеют серы и поэтому не содержат цистина или метионина. Эти различия зависят не от растения—источника инфицированного сока, а только от штамма вируса, взятого для прививки [218].

Следует отметить, что в отличие от гистонов и протаминов, являющихся классическими «нуклеопротеидами», белок вируса мозаики табака не основной, а скорее представляет кислоту. Это, очевидно, является причиной легкого освобождения нуклеиновой кислоты при денатурации белка.

Вирус мозаики табака растворим в водных растворах при pH 5—9. При более низких pH он осаждается, причем действительное значение pH, соответствующее максимальному осаждению, до некоторой степени зависит от концентрации соли в растворе, а также от особенностей данного штамма вируса и находится при pH$\sim$3,5. При pH 9 вирус становится неустойчивым и начинает распадаться на более мелкие фрагменты.

Вирус мозаики табака устойчив по отношению к действию ферментов при таких значениях pH, при которых он не изменяется. Однако папаин и рибонуклеаза все же оказывают на него действие, но при этом лишь образуются нерастворимые комплексы, из которых оба этих компонента можно выделить в неизмененном виде. Вирусный белок устойчив к действию целого ряда реагентов и к тем способам обработки, при которых утрачивается его биологическая активность (действие облучения, обработка H_2O_2, HNO_2 и многие другие). Разрушение этого белка вызывают детергенты, щелочи, крепкие кислоты, мочевина и другие денатурирующие белок вещества.

Таблица 12

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ТРЕХ «ШТАММОВ», ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К ГРУППЕ ВИРУСОВ МОЗАИКИ ТАБАКА [217]

Эти штаммы выбраны для иллюстрации возможных различий между родственными вирусами. Многие штаммы, несмотря на очевидные биологические различия, весьма близки к «типовым» вирусам. Анализы производили микробиологическими методами; точность полученных результатов, согласно сообщениям, до ±10%

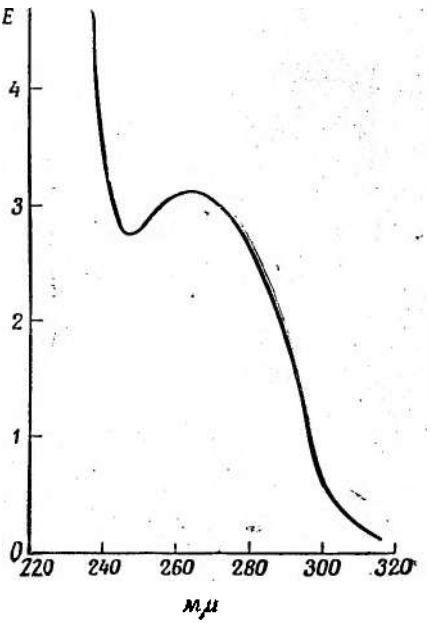
Аминокислота	Число остатков данной аминокислоты, приходящееся на 100 аминокислотных остатков		
	вирус мозаики табака	вирус ребристости травы	вирус 4 огурца
Аланин	7,6	9,7	9,8
Аргинин	6,7	7,8	6,9
Аспарагиновая кислота	12,4	12,8	13,0
Цистеин	0,6	0,6	0,0
Цистин	0,0	0,0	0,0
Глутаминовая кислота	9,3	13,0	5,7
Глицин	3,5	1,8	3,0
Гистидин	0,0	0,0	0,0
Изолейцин	6,2	4,8	4,7
Лейцин	8,7	8,6	8,1
Лизин	1,6	1,3	2,2
Метионин	0,0	1,6	0,0
Фенилаланин	5,4	4,0	7,6
Пролин	5,3	6,1	6,7
Серин	8,8	7,1	12,3
Треонин	10,4	8,7	6,7
Триптофан	1,2	7,5	0,3
Тирозин	2,4	4,5	2,6
Валин	9,9	6,8	10,3

3) НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА

Нуклеиновая кислота составляет около 6% вируса и обладает весьма характерным химическим составом [60]. Она содержит рибозу и четыре основания: аденин, гуанин, цитозин и урацил в соотношении 1,17 : 1,05 : 0,71 : 1,06. Присутствие нуклеиновой кислоты обусловливает поглощение вирусом той части ультрафиолетовых лучей, которая образует пик на кривой поглощения около 263 *мμ* [212] (рис. 2). Поскольку рибонуклеаза не разрушает ее

в неповрежденном вирусе [219], то можно предположить, что первичные гидроксильные группы остатков фосфорной кислоты становятся доступными для этого фермента после денатурации белка.

Выделенная из белка нуклеиновая кислота состоит из значительно бо́льших молекул, чем препарат, который имеется в продаже под названием «дрожжевая нуклеиновая кислота» [212]. Это было отмечено в работе Коэна и Стэнли, установивших, что ее молекулярный вес равен приблизительно 300 000 [102]. Однако в препаратах, исследованных этими авторами, вероятно, содержалось некоторое количество денатурированного белка, чем, возможно, и объясняется эта весьма высокая цифра. Молекулы «деполимеризованной» при хранении нуклеиновой кислоты значительно меньше.



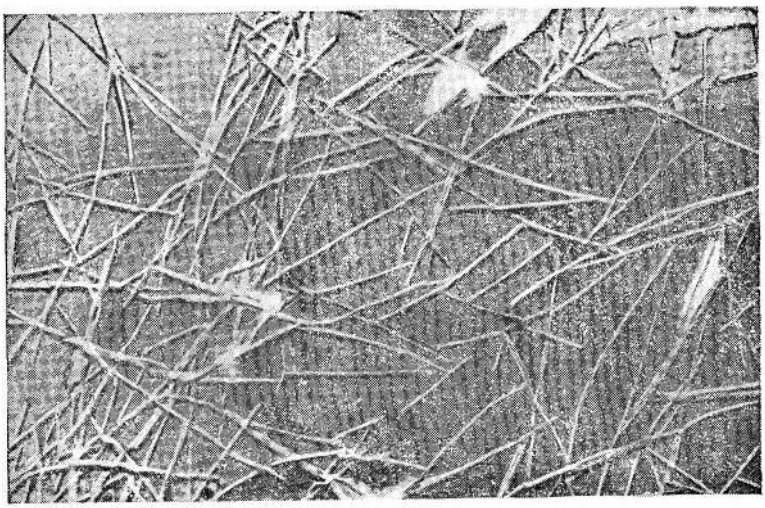
Р и с. 2. Спектр поглощения вируса мозаики томата (штамм вируса мозаики табака).
Концентрация 1 *мг/мл*, толщина слоя 1 *см*.

4) ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА

В препаратах, получаемых методами центрифугирования, этот вирус состоит из жестких палочкообразных частиц, довольно однородных по длине. Длина палочек в среднем равна 300 *мμ*, и в некоторых препаратах содержание таких частиц весьма высоко [220]. При обработке вируса различными веществами, такими, как трипсин, или при осаждении его солями или кислотами палочки значительно удлиняются, достигая 1 *мм* в длину (рис. 3). При повторном суспендировании частиц в воде многие из этих палочек распадаются на более короткие под действием срезающих усилий, возникающих при движении жидкости; в результате получается совокупность разнородных по длине частиц. Недооценка этого рода «полимеризации» и «деполимеризации» была причиной большой путаницы в первоначальных работах с этим вирусом.

Растворы вируса слегка опалесцируют и вследствие рассеяния света имеют желтоватую окраску в проходящем свете. При рассматривании в поляризационном микроскопе покоящаяся жидкость кажется изотропной, а в состоянии движения обнаруживает двой-

ное лучепреломление в потоке [221]. Интенсивность двойного лучепреломления в потоке в значительной степени зависит от предварительной обработки растворов. Если степень агрегации материала велика, как например в случае осаждения его путем высаливания, то действительно можно заметить уменьшение двойного лучепреломления в потоке после непродолжительного перемешивания раствора.



Р и с. 3. Электронный микрофотоснимок вируса мозаики табака. Образец, полученный высаливанием, агрегирован в линейном направлении.

Разбавленные растворы агрегированного вируса и более концентрированные растворы неагрегированного вируса, если их не взбалтывать, разделяются на два слоя [212]. Более плотный, или донный, слой обладает собственным двойным лучепреломлением и не имеет направлений экстинкции, тогда как верхний слой изотропен и обнаруживает двойное лучепреломление в потоке. Можно показать, что при образовании донного слоя небольшие сигарообразные участки жидкости заполняются большим числом палочек. Эти «тактоиды», сходные с «кристаллами» Стэнли, будучи плотнее окружающей жидкости, оседают на дно сосуда. При концентрировании раствора донного слоя путем центрифугирования или испарения образуется гель, который, если его всасывать в трубку или сжимать между плоскими пластинками, становится полностью ориентированным. Этот материал, или «влажный гель», в различных стадиях его высыхания до «сухого геля» исследовали методами рентгеновской кристаллографии [222, 223]. Оказалось, что палочки вируса располагаются в нем в правильном гекса-

гональном порядке, даже если они разделены расстояниями, превышающими их диаметр, равный 15 *мμ*. Эта величина была определена с большой точностью рентгенографическим методом. По рентгенограммам был сделан вывод о действительной форме палочек как отдельных кристаллов гексагональной формы, имеющих сравнительно небольшие структурные субединицы (молекулярный вес приблизительно 60 000). Эта предполагаемая структура палочек вполне согласуется с их способностью легко образовывать линейные агрегаты. Шестиугольное поперечное сечение вирусных частиц подтверждается недавно полученными электронными микрографиями [224].

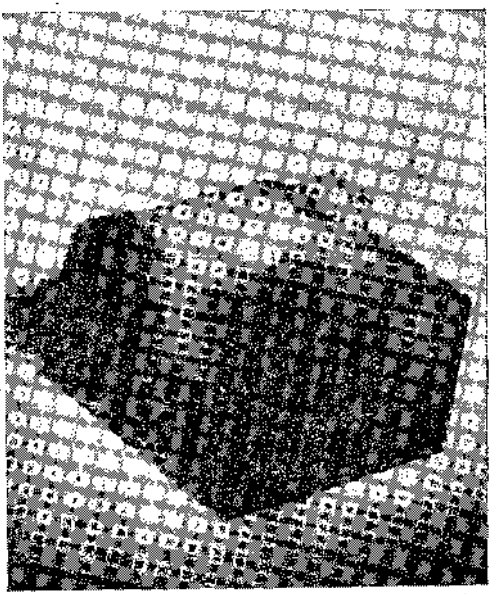


Рис. 4. Кристалл вируса мозаики табака внутри клетки волоска листа табака. Микрофотоснимок при 2652 Å, полученный Вилкинсом.

В растениях, особенно таких, как табак, вирус действительно кристаллизуется в виде гексагональных пластинок (рис. 4). Некоторые из этих пластинок, если их рассматривать под углом, поляризуют свет. Это указывает на то, что они являются многослойными двойниковыми кристаллами, состоящими из слоев толщиной, равной длине отдельной палочки вируса, разделенных тонкими слоями воды [225]. Согласно этим наблюдениям и по данным электронной микроскопии, представляется вероятным, что большинство вирусных частиц, находясь в растении, обладают одинаковой длиной.

При исследовании в ультрацентрифуге у вируса обнаруживается единственная отчетливая граница осаждения, а в некоторых случаях и второй пик, который определяется наличием димера. Константа седиментации сильно зависит от концентрации и при нулевой концентрации равна приблизительно 190 *S* [226]. Парциальный удельный объем равен 0,72. Результаты опытов по диффузии истолковать нелегко, так как кривые отличаются значительной асимметрией [227]. Определения молекулярного веса, произведенные путем измерения седиментации, диффузии, вязкости [228] и рассеяния света [229] и даже путем взвешивания известного числа частиц

[230], находятся в довольно хорошем соответствии друг с другом; можно принять, что вес $N(6{,}023 \cdot 10^{23})$ частиц равен приблизительно $5 \cdot 10^7$ *г*. Известно также, что инфекциозность вируса обусловлена частицами приблизительно такого веса [231].

В. Х-вирус картофеля

Этот вирус обладает значительным сходством с вирусом мозаики табака, и метод его очистки такой же, за одним исключением: обработку этого вируса трипсином проводить не следует или обрабатывать быстро, поскольку он переваривается этим ферментом [232]. Нагревание сока для осветления необходимо производить при температуре не выше 55°, после чего раствор следует сразу охладить. Выход вируса с одного растения-хозяина, в качестве которого чаще всего используют табак, меньше выхода вируса мозаики табака и выражается величиной порядка 100 *мг* на 1 *л* сока. После выделения вирус приобретает способность переходить в нерастворимую форму. По-видимому, это в значительной мере определяется тем, что его частицы являются тонкими гибкими палочками, образующими сплетения. Нерастворимый вирус можно снова перевести в раствор, осторожно обрабатывая его трипсином.

Подобно вирусу мозаики табака, Х-вирус картофеля осаждают сульфатом аммония или путем подкисления раствора. Кипячение денатурирует белок; находящаяся в палочковидных частицах в количестве 6% рибонуклеиновая кислота переходит в раствор. Состав нуклеиновой кислоты этого вируса значительно отличается от состава рибонуклеиновой кислоты вируса мозаики табака.

Аминокислотный состав различных препаратов Х-вируса картофеля не определяли, о чем можно сожалеть, так как данных об иммунологии этого вируса получено очень много [233, 234].

Растворы Х-вируса картофеля обнаруживают двойное лучепреломление и образуют донный слой, но ориентация частиц в этом слое недостаточна для исследований при помощи рентгеновских лучей.

Г. Вирус карликовой кустистости томата

Этот необыкновенный вирус, у которого известен только один штамм, дал возможность достигнуть ряда наиболее существенных успехов в изучении растительных вирусов. Его название неудачно, так как данную болезнь трудно перенести на растения томата и она редко вызывает у них кустистый рост. Значительно более подходящим для него растением-хозяином является *Datura* (*tatula* или *stramonium*) [235], которая к тому же менее подвержена случайным заражениям вирусом мозаики табака.

1) ОЧИСТКА

Сок растений *Datura* или томата лучше всего осветлять этиловым спиртом (300 *мл/л*). Вирус осаждают добавлением насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$ (50% от объема сока). Осаждение повторяют; дальнейшую очистку вируса можно производить добавлением уксусной кислоты до достижения pH раствора, равного 4. Вирус растворим в широкой области значений pH, включая и изоэлектрическую точку (pH 4,6). Возможна также обработка трипсином, но вирус следует держать, насколько это возможно, при низких температурах, так как выше 20° он быстро теряет инфекциозность, не подвергаясь сколько-нибудь заметному химическому или иммунологическому изменению.

Кристаллизацию проводят методом, применявшимся для многих растительных вирусов [236]. Вирус карликовой кустистости осаждается сульфатом аммония в аморфной форме, имеющей отрицательный температурный коэффициент растворимости. При охлаждении суспензии до 0—5° аморфный материал растворяется, после чего добавляют соль до такой концентрации, чтобы получить раствор, насыщенный аморфной формой вируса. При выдерживании раствора в течение нескольких дней при 0—5° вирус кристаллизуется в форме красивых ромбических додекаэдров. Эти кристаллы очень медленно растворяются в воде, поэтому их можно быстро обмыть водой в центрифуге, что является дальнейшей стадией очистки.

Для очистки этого вируса можно также применять дифференциальное центрифугирование [235], но оно не обладает заметными преимуществами по сравнению с методом высаливания. Последний метод, очевидно, предпочтительнее в том случае, когда требуется получить большое количество материала, так как концентрация данного вируса в растениях довольно мала (около 50—100 *мг/л*).

2) ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Содержание углерода, водорода и азота в этом вирусе почти такое же, как и в других белках, но фосфора в нем около 1,4%, и весь он находится в рибонуклеиновой кислоте, обладающей характерным составом [47]. Нуклеиновую кислоту трудно удалить из белка вируса, не подвергая его такой обработке, при которой он может до некоторой степени деградировать [236]. Причина прочности связи нуклеиновой кислоты с белком в настоящее время еще не выяснена, но она, по-видимому, связана с относительно большим содержанием основных аминокислот в белке. До сих пор не опубликовано никаких сообщений об аминокислотном составе этого вируса. Высокое (около 16%) содержание в нем нуклеиновой кислоты обусловливает некоторые необычные физические свойства этого вируса.

Данный вирус денатурируется при всех обычных способах обработки, например при нагревании. Он особенно неустойчив при сушке и замораживании, хотя зараженные им растения можно заморозить перед тем, как производить его изолирование. Щелочь при pH 10 и выше инактивирует вирус так же, как и кислота при pH 1.

3) ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Вирус карликовой кустистости широко исследовали многими физическими методами; это один из наиболее известных гомогенных белков [237].

Вследствие высокого содержания нуклеиновой кислоты вирус обладает характерным и интенсивным спектром поглощения ультрафиолетовых лучей. Его растворы опалесцируют и не обнаруживают двойного лучепреломления в потоке. Данные о рассеянии света показывают, что молекулярный вес этого белка равен приблизительно $9 \cdot 10^6$ [238]. Сравнительно малый парциальный удельный объем вируса, равный 0,738, определяется высоким содержанием в нем нуклеиновой кислоты.

При ультрацентрифугировании данный вирус является полностью гомогенным и имеет константу седиментации, равную 131 *S* [239]. Пользуясь последней величиной и константой диффузии, равной $1{,}2 \cdot 10^{-7}$ *см*^{2}/*сек* [240], рассчитали молекулярный вес вируса, который оказался равным $10{,}6 \cdot 10^6$.

Электронные микрографии вируса показывают, что его частицы в сухом состоянии имеют сферическую форму; их диаметр равен примерно 26 *мμ*. На пленках из формвара этот вирус образует характерные правильные плотные скопления, которые состоят из сотен частиц, ориентированных в двух направлениях. Подобные объекты можно использовать для калибровки электронных микроскопов.

Кристаллы этого вируса подвергали рентгенографическим исследованиям в виде порошков как во влажном, так и в сухом состоянии [222, 223]. В соответствии с тем, что они изотропны и имеют форму додекаэдров, эти кристаллы обладают структурой объемноцентрированных кубов. Полученные рентгенограммы единичных кристаллов подтверждают многие из результатов прежних кристаллографических исследований этого вируса [241]. Во влажном состоянии центры частиц находятся на расстоянии 34,1 *мμ* один от другого, при сушке эти центры сближаются по мере того, как частицы (и кристаллы) сжимаются от высыхания. По данным рентгенокристаллографических измерений размер частицы вируса в сухом состоянии равен 29 *мμ*, молекулярный вес $10{,}6 \cdot 10^6$. Величина влажной частицы вируса, по тем же данным, вполне сравнима с величиной, определяемой по константе диффузии (37 *мμ*). На примере этого

вируса впервые было показано, что белковая молекула не одинакова по величине во влажном и сухом состояниях. Если бы форма молекул не была столь явно сферической (как это видно в электронном микроскопе), то молекулы этого белка считались бы эллипсоидальными, подобно молекулам многих белков, исследованных лишь косвенными методами. По величине f/f_0 было вычислено отношение осей, которое оказалось равным 5,6 : 1. Причина расхождения результатов вычислений с электрономикроскопическими данными заключается в том, что в растворах вирус гидратируется, связывая при этом около 0,7 *г* воды на 1 *г* сухого вируса [242].

Вирус карликовой кустистости был получен и в других кристаллических формах, но последние не были исследованы [243].

Д. Вирус желтой мозаики репы

Вирус желтой мозаики репы, по-видимому, довольно широко распространен в Европе. От других растительных вирусов он отличается во многих отношениях, в частности тем, что, как правило, передается особым жуком. Из всех вирусов он легче всего получается в кристаллическом состоянии [244] и, вероятно, является наилучшим из всех известных источников для получения недеградированной рибонуклеиновой кислоты.

1) ОЧИСТКА

Сок получают из растений репы или китайской капусты по истечении не менее 5 недель после их инфицирования вирусом. К соку при размешивании добавляют 90-процентный раствор этилового спирта (точно 300 *мл/л*). Осадок отделяют центрифугированием и к надосадочной жидкости добавляют насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ (50% от объема жидкости). Спустя несколько часов вирус осаждается в виде мелких октаэдров вместе с многими органическими и неорганическими примесями. Осадок собирают, суспендируют в воде и центрифугируют для удаления нерастворимых примесей. Препарат кристаллизуют, как описывалось выше, добавляя $(NH_4)_2SO_4$ до одной трети насыщения, растворяют, снова кристаллизуют, затем диализуют и центрифугируют для удаления возможного осадка. На этой стадии раствор должен быть бесцветным. Дальнейшую очистку, если это необходимо, можно произвести путем обработки трипсином. Вирус осаждается многими солями в виде октаэдрических кристаллов. Его можно кристаллизовать из 20-процентного этилового спирта на холоду, доводя pH раствора до изоэлектрической точки белка (pH около 3,8). Из спиртового раствора вирус кристаллизуется в виде пучков тонких игл, обладающих двойным лучепреломлением. Из 1 *л* сока получается от 200 *мг* до 1,5 *г* белка.

В связи с тем, что химические свойства препаратов зависят от их физического состояния, последнее необходимо рассмотреть в первую очередь.

2) ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Препараты вируса желтой мозаики репы, полученные, как описано выше, представляют собой растворы, содержащие однородные



Р и с. 5. Электронный микрофотоснимок вируса желтой мозаики репы. В этом препарате имеются частицы обоих типов.

сферические частицы (рис. 5). Электрофоретически они гомогенны и имеют изоэлектрическую точку при pH 3,75. Однако, применяя ультрацентрифугирование, можно обнаружить, что они состоят

из двух разных белков, константы седиментации которых соответственно равны 106 *S* и 49 *S* [245]. Эти два белка можно отделить один от другого путем центрифугирования растворов; насколько известно, других методов отделения не имеется. Относительное количество компонента с низким значением константы седиментации—«верхнего» компонента—не постоянно и обычно составляет около 20—30% от общего веса белка. Оба белка кристаллизуются в идентичных по внешнему виду формах и под электронным микроскопом имеют одинаковый вид. Они обладают весьма сходными или идентичными константами диффузии, т. е. во влажном состоянии представляют собой частицы одинаковых размеров.

Таким образом, различие между «верхним» и «донным» компонентами полностью обусловлено разными плотностями их частиц, а это, в свою очередь, объясняется тем, что «донный» компонент является нуклеопротеидом, содержащим по весу около 35% нуклеиновой кислоты, тогда как «верхний» компонент, очевидно, является таким же белком, но не связанным с нуклеиновой кислотой. Эта идентичность подтверждается при серологическом исследовании обоих белков, которые нельзя различить даже этим чрезвычайно чувствительным методом. Подтверждением идентичности служит также и то обстоятельство, что оба белка образуют смешанные кристаллы, а также то, что кристаллическая структура обоих типов кристаллов, определяемая методом дифракции рентгеновских лучей, во всех отношениях одинакова (элементарная ячейка «донного» компонента несколько меньше ячейки «верхнего» компонента, вероятно потому, что под влиянием значительного электрического заряда нуклеиновой кислоты происходит сжатие белковой оболочки частиц) [246].

Молекулярные веса белков «верхнего» и «донного» компонентов приблизительно равны $3 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^6$, а парциальные удельные объемы—0,74 и 0,67 соответственно. Меньшее значение парциального объема «донного» компонента обусловлено значительным количеством нуклеиновой кислоты, находящейся в этом компоненте и обладающей относительно большой плотностью.

В дальнейшем будет показано, что свойства вирусного нуклеопротеида («донного» компонента) и «верхнего» компонента, который не является инфекциозным, можно объяснить, только допуская, что нуклеиновая кислота первого находится внутри частиц. Нуклеиновая кислота, по-видимому, не является необходимым структурным элементом, потому что «верхний» компонент так же устойчив, как и нуклеопротеид.

Поскольку «донный» компонент нуклеиновой кислоты и его спектр поглощения отличаются от спектра поглощения «верхнего» компонента, то при помощи ультрафиолетовой микрофотографии можно различить кристаллы этих белков. Кроме того, «донные» кристаллы плотнее кристаллов «верхнего» компонента, которые

можно удалить из смеси путем флотации в растворе $Na_2S_2O_3$ с удельным весом 1,32. Важно подчеркнуть здесь, что подобные смеси кристаллов следует составлять искусственно, используя предварительно изолированные «верхний» и «донный» компоненты.

Для обеих форм кристаллов как «верхнего», так и «донного» компонентов, взятых в порошкообразном состоянии, производили измерения дифракции рентгеновских лучей, а в случае октаэдрических кристаллов исследования проводили на единичных кристаллах. Элементарная ячейка последних имеет наибольшие размеры из когда-либо отмеченных у кристаллов, равные 715 Å* у влажных кристаллов «верхнего» компонента [247]. Структура этих кристаллов подобна структуре алмаза; в каждой элементарной ячейке содержится восемь молекул. Кристаллизацию этого вируса можно исследовать при помощи электронного микроскопа. Его кристаллическая решетка типа решетки алмаза необычна тем, что кристалл насквозь пронизан шестигранными отверстиями, которые можно видеть, применяя метод пропускания [248]. Вирус состоит из наиболее мелких частиц, какие только известны среди растительных вирусов; в сухом состоянии диаметр частицы равен примерно 23 *мμ*. Во влажном состоянии его частицы набухают, увеличиваясь до ~31 *мμ* в диаметре. Имеются некоторые данные о том, что частицы обоих белков не вполне сферические по форме, а скорее напоминают тетраэдр [246].

3) ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Как это следует из результатов анализа препаратов, их химический состав непостоянен. В них содержится около 15% азота и около 2—2,5% фосфора, в зависимости от количественного соотношения составляющих двух компонентов. Чистый «донный» компонент содержит 3,43% фосфора, который весь входит в состав рибонуклеиновой кислоты, содержащей исключительно большое относительное количество цитидиловой кислоты [47]. Содержание фосфора в свободной нуклеиновой кислоте равно 9,79%. Обстоятельных определений аминокислотного состава обоих компонентов не производилось, но методом бумажной хроматографии было установлено, что оба белка имеют сходный состав [249].

Эти белки денатурируются этиловым спиртом при относительно низких его концентрациях (34% по объему); при этом нуклеиновая кислота выделяется из «донного» компонента в виде крупных частиц, которые образуют вязкие растворы и волокна, обладающие двойным лучепреломлением. Хотя эта нуклеиновая кислота, по-видимому, является наиболее «нативной» из всех известных рибонуклеиновых кислот, однако ее молекулы относительно не-

* Длина осевого параметра *a* элементарной ячейки.—*Прим. ред.*

велики по сравнению с молекулами высококачественной дезоксирибонуклеиновой кислоты. Как уже упоминалось [75], ее «молекулярный вес», вероятно, не превышает 18 000, и в действительности эта нуклеиновая кислота представляет собой сложную смесь различных видов небольших молекул. Ее нельзя отделить от белка без денатурации последнего.

Антигенные свойства обоих компонентов вируса желтой мозаики репы настолько необычны, что заслуживают особого рассмотрения. «Донный» компонент, подобно многим нуклеопротеидам растительных вирусов, является высоко антигенным, так что однократного впрыскивания 10 *мг* этого белка достаточно, для того чтобы вызвать у кроликов заметное образование антител. Антигенность же «верхнего» компонента не превышает $^1/_{100}$ антигенности «донного» компонента, что можно определить путем примешивания к «верхнему» компоненту незначительного количества высокоактивного «донного» компонента. Однако при испытании антисывороткой, которая вырабатывается против указанного нуклеопротеида, «верхний» компонент реагирует так же быстро и в тех же относительных количествах, что и «донный» компонент при той же молярной концентрации. Таким образом, «верхний» компонент ведет себя как неполный антиген необычного типа. Неизвестно, какую функцию выполняет нуклеиновая кислота в стимулировании образования антител, поскольку сама по себе она совсем не антигенна и не реагирует с антисыворотками против вируса.

Е. Вирус южной мозаики фасоли

Этот вирус встречается в южных штатах США и является возбудителем мозаичной болезни у *Phaseolus vulgaris*. О его распространении в Европе пока ничего не известно, хотя, возможно, он находится среди многих вирусов, поражающих листья фасоли. Главная особенность этого вируса, отличающая его от всех вирусов группы некроза табака, состоит в том, что он поражает растения очень немногих видов.

1) ОЧИСТКА [250]

Единственным источником этого вируса являются листья бобовых растений, которые замораживают перед отделением из них сока. Сок осветляют при помощи Na_2HPO_4, а затем очищают вирус либо высокоскоростным центрифугированием, либо высаливанием сульфатом аммония. Примеси можно также удалять из сока 30-процентным этиловым спиртом, к которому этот вирус устойчив. Его кристаллизацию вызывают, смачивая водой шарики, в виде которых этот вирус осаждается при высокоскоростном центрифугировании, или подвергая продолжительному диализу при pH 5,5. На 1 *л* сока получается около 400 *мг* вируса.

2) СВОЙСТВА

Этот очень интересный вирус исследован еще недостаточно подробно. Он имеет необычайно высокую (pH 5,5) для растительного вируса изоэлектрическую точку. Вирус устойчив при pH от 3 до 11,5; в этой области значений pH он представляет собой электрофоретически однородное вещество. Константа седиментации равна 114 *S*; в сухом виде вирус состоит из частиц сферической формы диаметром около 34 *мμ* [251]. Исследования рассеяния рентгеновских лучей показывают, что частицы в растворе в значительной степени сольватированы [252].

Этот вирус был первым белком, кристаллическую структуру которого исследовали при помощи электронного микроскопа [253]. Интересно отметить, что его явно сферические молекулы, находясь в кристаллической решетке, обладают отношением осей, равным 1,5 : 1. Изменяют ли молекулы свою форму, когда они входят в кристаллическую решетку, точно не установлено.

Химические данные об этом вирусе скудны, и некоторые из них, по-видимому, неверны. Вирус дает обычные цветные реакции на белок, но, как утверждают, не дает реакции Молиша на углевод, что трудно совместить с сообщением, согласно которому в вирусе содержится около 21% нуклеиновой кислоты; последнее было установлено по содержанию в нем фосфора, равному 1,9% [254]. Имеющихся данных недостаточно, чтобы определить, относится ли нуклеиновая кислота этого вируса к типу рибозы или дезоксирибозы.

Ж. Вирусы некроза табака

Впервые вирусы некроза табака были обнаружены в 1935 г. в тепличных растениях, выращенных в Кембридже [255]. Поскольку в условиях опыта эти вирусы образуют на листьях инокулированных растений лишь локальные некротические пятна, сначала не было установлено, что возбудителями этой болезни являются несколько вирусов, так как образующиеся пятна разных типов внешне были похожи, а опыты по перекрестной защите не проводились из-за неспособности этих вирусов образовывать в условиях опыта последовательные заражения. Однако в настоящее время выяснено, что термин «некроз табака» означает болезнь, возбудителями которой являются несколько различных вирусов, более или менее неродственных, но обладающих некоторыми общими свойствами и возбуждающих серьезные заболевания у растений фасоли (*Phaseolus vulgaris*) [256], тюльпанов [257], *Primula obconica* [258] и садовой гвоздики. Теперь известно, что у всех этих растений такие заболевания являются системными. У садовой гвоздики

вирус, похожий на вирус некроза табака, возбуждает мозаичную болезнь, появление которой вначале не связывали с вирусом этого типа, так как сок красной гвоздики сильно противодействует заражению этим вирусом других растений [259]. Явление противодействия растительного сока вирусной инфекции весьма обычно для растительных вирусов и является причиной многих наблюдавшихся аномалий.

В общем, вирусы некроза табака могут заражать растения самых различных видов—как однодольных, так и двудольных. Они паразитируют на корнях растений и, по всей вероятности, попадают в растения из почвы.

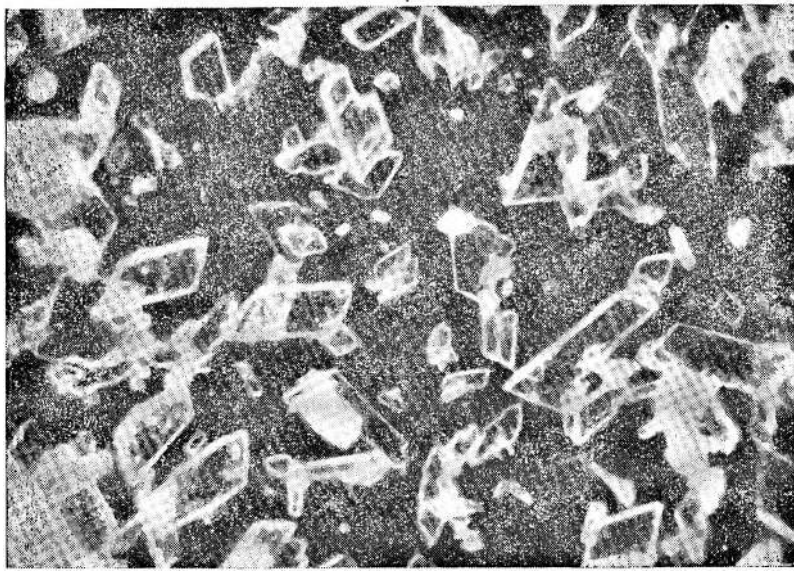
1) ОЧИСТКА И СВОЙСТВА

Когда делались первые попытки изолировать в чистом виде возбудитель «некроза табака», не было известно, что эту болезнь возбуждают несколько различных вирусов. Однако теперь установлено, что возбудителями заболевания являются не менее четырех вирусов. (Этот факт можно установить по реакциям изолятов из различных единичных поврежденных мест на антисыворотку, первоначально приготовленную для смешанных вирусов.) Применявшийся вначале метод очистки во многом сходен с методом очистки вируса карликовой кустистости томата, но при этом осаждение вируса из предварительно осветленного этиловым спиртом (50% по объему) раствора можно было производить концентрированным этиловым спиртом (75% по объему), используя устойчивость вирусов к такого рода растворам [260]. (Такой метод обработки для вирусов типа возбудителей некроза табака в общем является довольно грубым.) Для выделения вирусов были использованы растения табака и *Phaseolus vulgaris*.

Кристаллизацию этих вирусов осуществляли по методу, применявшемуся Боуденом и Пири для вируса карликовой кустистости томата [236]; при этом получались характерные кристаллы в виде ромбических пластинок. Однако кристаллизовалась только часть препарата, и при ультрацентрифугировании материал не был гомогенным. При анализе получены числовые значения для содержания углерода, азота и водорода. В препарате содержалось также 1,4—1,7% фосфора. Белок давал реакции на сахар. Из денатурированного нагреванием белка была выделена нуклеиновая кислота типа рибозы; спектр поглощения вирусом ультрафиолетовых лучей подтвердил предположение, что этот вирус является нуклеопротеидом.

Спустя несколько лет после этого Боуден и Пири исследовали изоляты вирусов некроза табака, полученные из отдельных поврежденных мест. Путем фракционирования сульфатом аммония после предварительного осветления Na_2HPO_4 им удалось кристаллизовать

несколько изолятов [261]. Из них *Tobacco I* и *II* (которые, вероятно, одинаковы) кристаллизуются в виде додекаэдров и в виде бипирамид; *Princeton* образует пластинчатые кристаллы, подобные вышеописаниым; *Tobacco 4* дает гексагональные призмы, а *Rothamsted* при высокоскоростном центрифугировании образует комочки из иглообразных кристаллов. Все эти штаммы, кроме последнего, кристаллизовались по методу, применявшемуся для кристаллизации вируса карликовой кустистости томата, и имели константу седиментации, равную примерно 115 *S*. Константа седиментации штамма *Rothamsted* равна приблизительно 50 *S*.



Р и с. 6. Оптический микрофотоснимок (на темном фоне) одного из штаммов вируса некроза табака.

Различные штаммы имеют сходный химический состав. Все они содержат 1,7—2% фосфора и 7—8,5% углевода, которые входят в состав рибонуклеиновой кислоты.

Штамм *Rothamsted* необычен тем, что скорость растворения его инфекциозного начала из кристаллических комочков отличается от скорости растворения массы нуклеопротеида. Это свидетельствует о том, что данный вирус состоит из двух компонентов [262]. Предполагалось, что константы седиментации этих двух гипотетических компонентов практически одинаковы. Недавно Боуден и Пири обнаружили, что все их препараты состоят из частиц двух типов. Под электронным микроскопом они имеют вид шариков диа-

метром 37 и 17 *мμ* соответственно. Первые, по-видимому, являются носителями инфекциозности, а последние обладают большей антигенной активностью. Возможность, что в таких препаратах имеется смесь двух штаммов вируса, вероятно, исключена, так как иногда возможно повторное изолирование вируса через отдельные локальные повреждения [263]. В настоящее время невозможно определить свойства этих двух компонентов, но это, разумеется, временное затруднение, которое в конце концов должно разрешиться опытным путем.

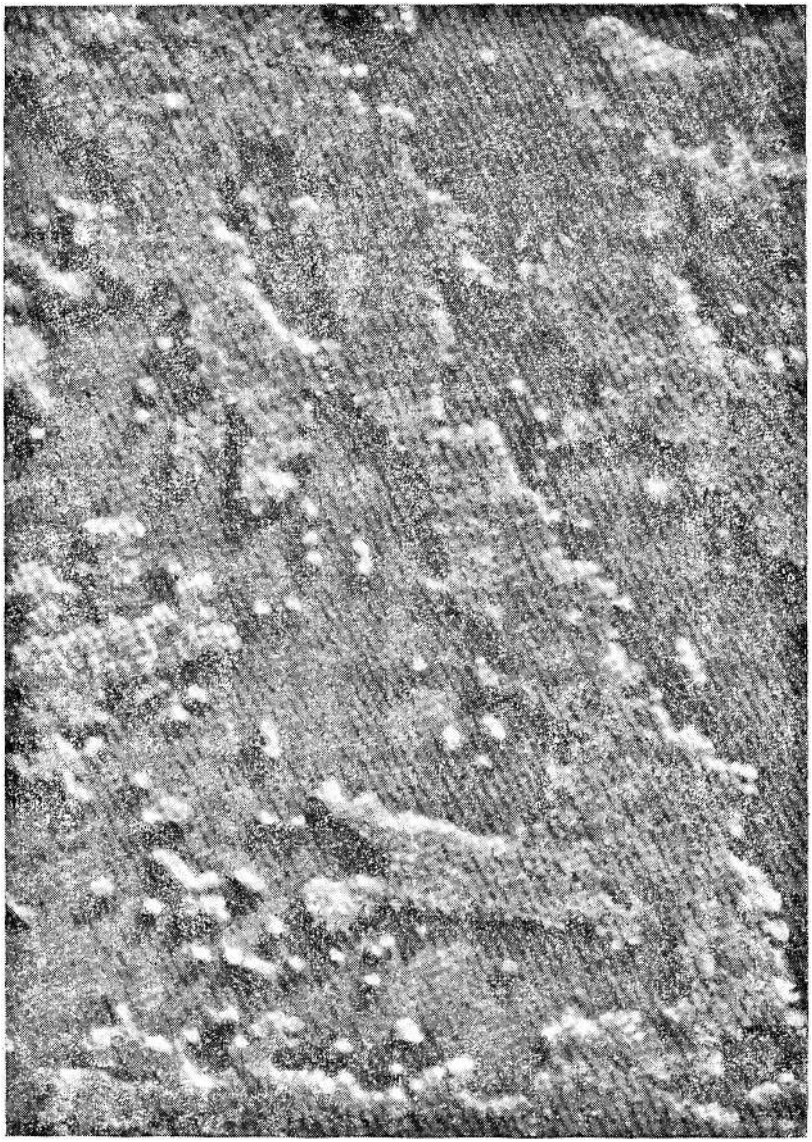
Кристаллы некоторых вирусов некроза табака (рис. 6), имеющие форму пластинок, очень удобны для наблюдений под электронным микроскопом (рис. 7) с применением методики металлических реплик. Для некоторых из этих вирусов оказалось возможным установить при помощи электронного микроскопа полную структуру кристалла [264].

Единичный кристалл неинфекциозного производного вируса некроза табака (штамм *Rothamsted*) [265] был также исследован методом диффракции рентгеновских лучей.

Количество вируса, получаемое из растений, инфицированных некрозом табака, невелико вследствие способности вируса локализоваться вблизи места инокуляции. Оно зависит также от условий культивирования и от штамма вируса. Обычно получается 1—20 *мг* на 1 *л* сока, но можно получить и до 100 *мг* на 1 *л* сока.

3. Вирус кольцеобразной пятнистости табака [266]

Кроме табака, этот вирус возбуждает заболевания у растений многих других видов и довольно широко распространен в разных частях света. В отличие от многих других растительных вирусов, исследованных химическими методами, он находится в растениях в очень низкой концентрации и является неустойчивым. Двух- или трехкратного простого осаждения сульфатом аммония достаточно для того, чтобы вызвать полную потерю вирусом инфекциозности, поэтому очистку его можно производить только центрифугированием. Выделенный вирус состоит из сферических частиц, константа седиментации которых равна 115*S*. Согласно имеющимся сообщениям, содержание нуклеиновой кислоты в нем необычайно высоко и составляет около 40%. Некоторое количество нуклеиновой кислоты можно удалить, не изменяя свойств вируса. Его выход обычно менее 50 *мг* с 1 *кг* листьев. Недавно было высказано сомнение, не идентичен ли этот вирус с химически сходными с ними веществами, обнаруженными Пири [149] в больших количествах в соке здоровых растений, из которого их можно изолировать методом, применявшимся для получения вируса кольцеообразной пятнистости табака.



Р и с. 7. Электронный микрофотоснимок вируса некроза табака (полосчатая мозаика бобов), кристаллы которого получены на сетке.

И. Вирус мозаики люцерны

Вирус мозаики люцерны является одним из немногих передаваемых тлями вирусов, который был изолирован в количествах, достаточных для того, чтобы к нему можно было применить химические методы исследования [267]. Как правило, он размножается в растениях фасоли (*Phaseolus vulgaris*) или табака. С целью экономичного экстрагирования этого вируса из размельченных (размолотых) растений pH измельченной массы перед выжиманием из нее сока доводят до значения, равного 7. Для этого пользуются Na_2HPO_4, который применяют также для осветления сока. Дальнейшую очистку производят высокоскоростным центрифугированием, которому для повышения концентрации вируса может предшествовать осаждение сульфатом аммония.

1) СВОЙСТВА

Вирус мозаики люцерны является нуклеопротеидом типа рибозы. Около 60% содержащегося в вирусе фосфора (1,44%) входит в состав рибонуклеиновой кислоты. Его константа седиментации равна 74 *S*; это одно из наиболее низких значений, известных для растительных вирусов; частицы вируса, по-видимому, имеют сферическую форму [268]. Изоэлектрическая точка этого вируса находится при pH 4,6, а зона устойчивости—в интервале pH 5,5—7,7. Вирус быстро теряет свою активность при комнатной температуре; подобно X-вирусу картофеля, он отличается тем, что переваривается трипсином. Его удельный объем приблизительно равен 0,68.

Выход вируса велик—достигает 400 *мг* на 1 *л* сока, но по сравнению с вирусами мозаики табака и желтой мозаики репы его инфекционность довольно низка.

К. Вирус пятнистости конских бобов

Недавно был изолирован нуклеопротеид из сока растений конских бобов (*Vicia faba*), зараженных какой-то новой болезнью [269]. Хотя инфекционность сока из таких растений низка, выход нуклеопротеида велик и достигает 2 *г* на 1 *л* сока. Этот нуклеопротеид термостоек и не осаждается сульфатом аммония, до тех пор пока раствор последнего не достигнет 75-процентного насыщения, что упрощает очистку нуклеопротеида. Сначала сок осветляют центрифугированием, затем доводят до 50-процентного насыщения сульфатом аммония и после отделения осадка центрифугированием повышают насыщение раствора сульфатом аммония до 80%, что вызывает осаждение. Растения бобов дают большое количество веществ, окрашенных в коричневый цвет, часть которых можно удалить активированным древесным углем.

1) СВОЙСТВА

Нуклеопротеид данного вируса состоит из однородных сферических частиц диаметром около 17 *мμ* и содержит 15,5% азота и 1,6% фосфора. При обработке нуклеопротеида разбавленной щелочью 80% фосфора выделяется в виде рибонуклеиновой кислоты. Отношение нуклеопротеида к вирусу точно не установлено. В здоровых растениях материал описанного типа не содержится, и поэтому инфекциозное начало в вирусе по своим свойствам должно быть сходно с нуклеопротеидом. Его инфекциозность чрезвычайно низка: для инфекции растения-хозяина требуется концентрация 0,01—0,1 *мг/мл*. Возможно, что бо́льшая часть материала не инфекциозна, но в других отношениях похожа на вирус.

Л. Другие растительные вирусы

Следует отметить, что все успешно выделенные вирусы содержались в растительном соке в довольно высоких концентрациях. К сожалению, большинство растительных вирусов, и, несомненно, особенно интересных, находятся в соке в значительно более низких концентрациях, не говоря уже о их потерях при захвате осадками в процессе очистки; вследствие этого возможность производить достаточно точные химические анализы вируса, который содержится в количестве 1 *мг/л* растительного сока, в настоящее время довольно мала. Однако было сделано несколько довольно успешных попыток очистить такие вирусы. Боуден и Пири концентрировали вирус мозаики *Hyoscyamus* и Y-вирус картофеля, которые передаются тлей, и показали, что оба эти вируса имеют свойства, в некоторой степени сходные со свойствами палочковидного вируса мозаики табака и X-вируса картофеля [270].

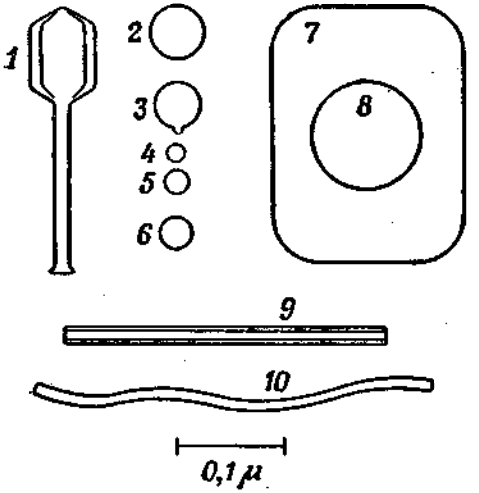


Рис. 8. Сравнительные размеры частиц некоторых вирусов.

1—бактериофаг T_2; *2*—вирус папилломы кролика; *3*—бактериофаг T_3; *4*—вирус некроза табака (полосчатая мозаика бобов); *5*—вирус желтой мозаики репы; *6*—вирус карликовой кустистости томата; *7*—вирус вакцины; *8*—вирус гриппа; *9*—вирус мозаики табака; *10*—X-вирус картофеля.

Хотя большинство химически исследованных растительных вирусов представляют собой рибонуклеопротеиды со сравнительно небольшими молекулами, нет основания предполагать, что все растительные вирусы именно таковы. Недавно Блэк с сотрудниками [271] установил, что вирус желтой карликовости картофеля состоит из сравнительно крупных частиц, имеющих константу седиментации, равную $\sim 1150\,S$, и размеры того же порядка, что и большие частицы животных вирусов. Дальнейшие исследования вирусов такого типа могут привести к значительному изменению наших представлений о природе растительных вирусов в целом (рис. 8).

3. ЖИВОТНЫЕ ВИРУСЫ

Животные вирусы по сравнению с растительными изолировать в чистом виде значительно труднее, так как они находятся в ткани, содержащей вещества, весьма сходные по своим свойствам с вирусами. Были успешно очищены лишь немногие животные вирусы; в большинстве из них содержится материал, являющийся антигенным по отношению к их хозяевам. Исключение представляют поражающие насекомых полиэдровые вирусы, частицы которых находятся в виде включений внутри кристаллов белка. Эти кристаллы, или полиэдровые тельца, чрезвычайно устойчивы по отношению к ферментам и различным другим агентам и могут быть изолированы в виде чистых белых порошков, из которых вирусные частицы можно выделить действием разбавленной щелочи. Техника дальнейшей очистки сводится к отделению от крупных вирусных частиц низкомолекулярных белков.

Наиболее изученными вирусами позвоночных являются вирусы вакцины, гриппа и папилломы кролика.

А. Вирус вакцины

Как уже упоминалось, вирус вакцины, неочищенные суспензии которого повседневно используются для прививок против оспы, в чистом состоянии был получен методом флотации в 1922 г. [205]. Вирус вакцины состоит из больших частиц диаметром в среднем около 250 *мμ*, которые можно видеть под обыкновенным микроскопом либо при освещении на темном фоне, либо после соответствующего окрашивания. Константа седиментации их чрезвычайно велика—около $5000\,S$. Вследствие этого частицы можно осаждать при помощи обыкновенных лабораторных центрифуг [272, 273]. Важным моментом процесса очистки является сбор исходного материала, обычно выращиваемого на коже животного (для этого чаще всего используются кролики), который следует производить так, чтобы к суспензии как можно меньше примешивались фрагменты ткани животного-хозяина, с трудом удаляемые в последующих опе-

рациях. Сбор материала производится путем очень осторожного соскабливания зараженной кожи тупым скальпелем под раствором поваренной соли. Затем суспензию подвергают поочередно медленному и высокоскоростному центрифугированию. С одного кролика можно собрать около 10 *мг* сухих частиц вируса [274].

1) СВОЙСТВА

Частицы этого вируса, соответственно их большим размерам, имеют сложный состав, напоминающий скорее состав бактерий, чем растительных вирусов. Они содержат 15,3% азота, 0,57% фосфора и 33,7% углерода. В состав вируса входит 5,7% жировых веществ, из которых 2,2% находится в форме фосфолипида и 1,4% в виде холестерина. Последний можно экстрагировать эфиром, после чего вирус нисколько не утрачивает своей активности [275].

Из частиц вируса, которые, по имеющимся данным, не дают реакции Биаля на пентозу, была выделена нуклеиновая кислота типа дезоксирибозы. Количество выделенной дезоксирибонуклеиновой кислоты составляло около 5,6% общего веса [276]; судя по ее спектру поглощения, эта кислота или подвергалась изменению в процессе довольно грубого экстрагирования, или содержала какие-то примеси, поглощающие ультрафиолетовые лучи. Доказательства отсутствия в этом вирусе рибонуклеиновой кислоты неубедительны, и можно надеяться, что дальнейшие анализы будут произведены более точными методами.

Кроме вышеупомянутых веществ, в частицах данного вируса было обнаружено 0,05% меди, сконцентрированной в процессе их выделения [277], а также флавинадениндинуклеотид [278] и некоторые ферменты—каталаза, фосфатазы и липазы, которые, вероятно, были адсорбированы на частицах вируса [279].

Частицы вируса, которые при рассмотрении под электронным микроскопом имеют форму неровных кирпичиков, содержат резко ограниченные центральные «ядра» овальной формы [280, 281]. При обработке вируса солями и пепсином из него экстрагируется большое количество материала (значительную часть которого составляет «растворимый антиген» вируса), после чего очень хорошо обнаруживаются «ядра», а сжавшиеся элементарные тельца принимают вид птичьих эритроцитов [281].

При обработке экстрагированных эфиром элементарных телец 0,04 н. раствором NaOH в течение 15 мин. при 55° в раствор переходит так называемый нуклеопротеидный антиген [282]. Это вещество, которое, по-видимому, состоит из «щелочного метапротеина», связанного с видоизмененной дезоксирибонуклеиновой кислотой, составляет около 40—50% веса частиц и содержит 6% дезоксирибонуклеиновой кислоты, а также около 1% фосфора, не входящего в состав нуклеиновой кислоты. Как и следовало ожидать, оно растворимо только в щелочных растворах.

Б. Вирус гриппа

Есть две серологически разные группы вирусов, возбуждающих грипп, названные соответственно вирусами гриппа А и В, которые существуют в виде различных штаммов. Одним из штаммов типа А является вирус гриппа свиньи, возбуждающий эту болезнь у свиней; полагают, что он является производным вируса, вызвавшего эпидемию в 1918—1919 гг. Обе группы вирусов гриппа имеют много сходных признаков, и между частицами той и другой групп существуют лишь небольшие морфологические различия.

1) ОЧИСТКА

Вирус гриппа обычно размножают в оплодотворенных куриных яйцах, причем получается в среднем около 0,5 *мг* чистого вируса на одно яйцо [283]. Таким образом, получение этого вируса в чистом виде является дорогостоящим процессом и использование его для химических исследований стало возможным только благодаря массовому производству вируса для приготовления вакцин.

Вирусы обеих групп состоят из больших частиц, константы седиментации которых равны приблизительно 700 *S* для группы А и 800 *S* для группы В [284]. При этом их числовые значения варьируют для различных препаратов. В каждом отдельном препарате имеются частицы самых различных размеров. Очистку производят высокоскоростным центрифугированием [285], для чего чаще всего применяют центрифуги Шарплеса. При этом способе очистки захватывается некоторое количество крупных невирусных частиц, образующихся из аллантоисной жидкости [286]. Их можно удалить из препарата, адсорбируя вирус на эритроцитах цыпленка, от которых его в дальнейшем отделяют. Даже при таком методе очистки сами вирусные частицы всегда содержат большое количество вещества, антигенно родственного ткани хозяина, независимо от того, откуда взят вирус—из аллантоисной жидкости куриного яйца или из легких мыши [287].

2) СВОЙСТВА

Под электронным микроскопом видно, что вирус гриппа состоит из довольно однородных сферических частиц диаметром около 100 *мμ* [288]; инфекциозность препарата также связана с частицами, величина которых того же самого порядка [289, 290]. Недавно проведенные исследования вируса, растущего в тканях, показали, что его частицы могут иметь также форму волокон [291].

При pH выше 4—5 вирус группы А нерастворим, изоэлектрическая точка его находится около pH 5,3 [292]. Вирус содержит 52% углерода, 7,7% водорода, 10% азота, 1% фосфора и 1% серы.

В нем содержатся некоторое количество жировых веществ [275] и полисахарид (обнаруженный и в вирусе В), который, возможно, происходит из ткани хозяина; в этом случае количество вещества хозяина в вирусных частицах может достигать 60%, а не 20—30%, как это определялось по результатам иммунологических испытаний. Вирус дает реакции как на дезоксирибонуклеиновую, так и на рибонуклеиновую кислоту, неочищенная смесь которых была выделена в небольших количествах из чистого препарата вируса [293]. Аминокислотный состав очищенных вирусов А и В и крупных частиц из нормальной аллантоисной жидкости определяли микробиологическими методами; полагают, что различия между ними в некоторых отношениях значительны [294]. Трудно, однако, определить, насколько ценны данные многих анализов этих вирусов, если (что представляется несомненным) бо́льшая часть анализированного материала была невирусного происхождения.

Интересны данные о механизме агглютинации эритроцитов, проливающие свет на природу вируса гриппа. Последний, как и некоторые другие животные вирусы, адсорбируется на эритроцитах, которые затем агглютинируются и, увлекая вирус с собой, опускаются на дно сосуда, в котором они находятся. Через некоторый период, продолжительность которого зависит от температуры, частицы вируса отделяются от эритроцитов, которые при этом необратимо изменяются и теряют способность адсорбировать тот же вирус. Рецепторы на эритроцитах разрушаются также ферментом, полученным из вибриона холеры. По аналогии с этим Барнет с сотрудниками предположил, что действие вируса тоже является ферментативным. При нагревании до 56° вирус гриппа В сохраняет способность агглютинировать эритроциты, но проявление этой способности уменьшается или предотвращается веществами типа мукополисахаридов. Ингибиторное действие таких веществ можно ослабить инкубацией их в суспензиях активного вируса в неочищенной аллантоисной жидкости; ослабление ингибиторного действия выражается кривой мономолекулярной реакции. На основании этого можно предположить, что аллантоисная жидкость обладает некоторого рода муциназной активностью, но приписывать эту активность вирусным частицам, по-видимому, преждевременно, особенно потому, что частично очищенный вирус менее активен по сравнению с неочищенными суспензиями [295—297].

Если яйца, применяемые для культивирования вируса группы А, инокулировать вместо вируса неочищенным посевным материалом, то получается большое количество неинфекциозного вещества [298]. Это вещество родственно вирусу гриппа и, подобно ему, обладает свойством агглютинировать эритроциты. Однако оно, по-видимому, почти неинфекциозно, и Магнус считал его «неполноценным» вирусом. Константа седиментации «неполноценного» вируса равна $\sim$500 *S* [299]. Интересно сравнить его с неинфекциозным материа-

лом, образующимся при инфекциях растительными вирусами (белковым компонентом вируса желтой мозаики репы) и в культурах бактериофагов, обработанных профлавином.

Хойл [300], обрабатывая эфиром суспензии частично очищенного вируса группы А при 37°, обнаружил, что вирусные частицы распадаются на две фракции, которые он назвал агглютининовой фракцией и растворимой антигенной фракцией. Первая фракция изолируется при помощи эритроцитов, которые агглютинируются ею так же, как и интактным вирусом. Вполне возможно, что эта фракция состоит из фрагментов оболочек частиц вируса. Растворимую антигенную фракцию Хойл считал рибонуклеопротеидом на том довольно шатком основании, что она осаждается ацетатом лантана и что ее титр в реакции связывания комплемента после обработки рибонуклеазой уменьшается почти вдвое. Количество взятого фермента и продолжительность обработки таковы, что любая свободная рибонуклеиновая кислота должна была бы полностью перевариться. Однако следует отметить, что при взаимодействии с растительными вирусами рибонуклеаза не проявляет своей активности, и, кроме того, она способна образовывать нерастворимые комплексы, не имеющие никакого отношения к ее ферментативной деятельности.

В. Вирус папилломы кролика

Этот вирус вызывает образование бородавок у североамериканского серого кролика; эти бородавки оказались единственным практически доступным исходным материалом для приготовления препаратов вируса. Из 1 *г* бородавок можно получить до 1 *мг* вируса, но часто получают меньше. Искусственно образованные бородавки дают мало вирусного материала или не дают его совсем.

Этот вирус выделяют дифференциальным центрифугированием суспензий, получаемых путем растирания бородавок в растворах поваренной соли. Приготовленные таким образом препараты представляют собой опалесцирующие растворы, содержащие вирусные частицы, константа седиментации которых приблизительно равна 278 *S* [301]. Вирус дает только слабую реакцию Молиша, а в некоторых случаях вообще не дает ее; элементарный состав его тот же, что у белка (49,6% углерода, 7,15% водорода, 15% азота, 2,2% серы). В нем содержится также 0,94% фосфора.

Этот вирус содержит приблизительно 1,5% липида и дает положительные реакцию Фёльгена и реакцию с дифениламином. Реакции на рибозу отрицательны. В состав вируса входит 6,5% углевода (в расчете на глюкозу), т. е. количество, которое довольно трудно согласовать с результатами весьма чувствительной реакции Молиша. Спектр поглощения ультрафиолетовых лучей с максимумом при 275 *мμ* заметно отличается от спектра поглощения нуклео-

протеида. Дезоксирибонуклеиновую кислоту (по определению— 7—9%) выделяли из этого вируса в таких условиях, в которых рибонуклеиновая кислота, если бы она имелась, была бы разрушена [302].

Физические свойства этого вируса были изучены очень подробно. Когда он был впервые выделен, его по аналогии с растительными вирусами считали гомогенным нуклеопротеидом постоянного состава, состоящим из частиц определенных размеров. В настоящее время такой взгляд считается ошибочным, хотя отклонения упомянутых свойств вируса не очень велики, а данные, получаемые на любом из его препаратов, совпадают. Из значений $s=278$, $D_{20}=6{,}65\cdot10^{-8}$ *см²/сек* и $\bar{V}=0{,}754$ [303] были вычислены «молекулярный» вес, который оказался равным примерно $47\cdot10^6$, и коэффициент дисимметрии 1,52. Инкремент вязкости раствора высок, относительная вязкость 1-процентного (по весу) раствора 1,062. На основании этих данных был сделан вывод, что частица вируса имеет форму сплющенного эллипсоида с отношением осей от 7 : 1 до 11 : 1. Однако при фотографировании в электронном микроскопе было обнаружено, что частицы вируса имеют сферическую или близкую к ней форму, что довольно трудно согласовать с таким выводом [304]. Однако Маркхэм, Смит и Ли [242] показали, что эти противоречивые данные можно объяснить, если допустить, что частицы во влажном состоянии сольватированы (1,88 *г* воды на 1 *г* сухого вируса); при этом удельный объем частиц в суспензии составляет приблизительно 0,916. Впоследствии было показано, что такое допущение приблизительно верно. Пользуясь различными препаратами вируса, Шарп, Тейлор и Бирд [305] нашли, что кажущаяся плотность вирусных частиц в растворе равна 1,133, что эквивалентно удельному объему 0,885. Это числовое значение, полученное методом флотации в ультрацентрифуге, возможно, завышено. Во всяком случае, работа Шарпа и других показывает, что попытки определить форму частиц по одним лишь гидродинамическим данным несостоятельны. Было также обнаружено, что размеры частиц вируса папилломы кролика различны и что частицы обладают определенной внутренней организацией. Таким образом, полностью исключена возможность того, что этот вирус является молекулярным, подобно вирусу карликовой кустистости томата.

Г. Вирус энцефаломиелита лошади

Этот вирус, культивируемый в эмбрионах кур и выделяемый путем дифференциального центрифугирования, включен в этот раздел потому, что он является одним из немногих животных вирусов, в которых не была найдена дезоксирибонуклеиновая кислота. В нем содержится приблизительно 4,4% рибонуклеиновой

кислоты, т. е. количество, недостаточное для того, чтобы объяснить содержание в нем 2,2% общего фосфора. В то время как на пентозу он дает положительную реакцию Биаля, реакция Фёльгена на дезоксирибонуклеиновую кислоту отрицательна. Вирус отличается сильным поглощением ультрафиолетовых лучей (максимум около 260 *мμ*). В препаратах вируса содержится также 14% холестерина [306, 307].

Д. Полиэдровые и другие вирусы насекомых

Полиэдровые вирусы—возбудители болезней у насекомых—известны уже давно. Наиболее распространенная возбуждаемая ими болезнь—желтуха тутового шелкопряда (*Bombyx mori*). Известны также многие другие вирусы насекомых, и большинство их вызывает болезни личинок *Lepidoptera*. Эти болезни характеризуются присутствием внутриядерных телец-включений, которые вначале считались простейшими паразитами, но теперь известны как кристаллы белка.

В 1943 г. Глейзер и Стэнли [308] сделали несколько важных наблюдений о возбудителе желтухи шелкопряда. Они показали, что гемолимфа инфицированного шелкопряда способна возбуждать эту болезнь даже в том случае, когда она не содержит полиэдровых телец. Они также установили, что внутри полиэдров находится вирус, защищенный от действия внешней среды и устойчивый к дезинфицирующим средствам и пр. В процессе своей работы эти авторы выделили белок, обладавший вирусной активностью, но последняя, очевидно, зависела от какого-то компонента, содержавшегося в их препаратах в незначительных количествах.

Вопрос о природе полиэдровых телец был разрешен работой Бергольда. Он исследовал полиэдровые тельца возбудителей ряда болезней, в том числе болезней тутового шелкопряда, бабочки-монашки (*Lymantria monacha*) и *Porthetria dispar*. Все эти полиэдры растворяются в разбавленной щелочи (0,008 *M* Na_2CO_3), не теряя вирусной активности; вирусные же частицы, содержавшиеся в виде включений в кристаллических полиэдрах, освобождаются и переходят в раствор [214]. В природе подобный процесс происходит в том случае, когда полиэдры, проглоченные гусеницами, распадаются под действием щелочных соков их кишечника с выделением вирусных частиц. Основная масса полиэдров состоит из довольно однородного белка с молекулярным весом около 300 000; этот белок не обнаруживает какого-либо определенного родства с вирусом, содержащимся в полиэдрах в количестве ~5%, и не содержит нуклеиновых кислот.

Сами вирусные частицы имеют форму палочек; их длина варьирует от 300 до 450 *мμ* в зависимости от вида гусениц, из которых получены полиэдры, ширина палочек около 30 *мμ*. В полиэдрах

вирусные частицы включены пучками, окруженными оболочками, и они могут распадаться на составляющие их отдельные частицы или группы частиц. Вследствие этого разные препараты имеют неодинаковые константы седиментации порядка нескольких тысяч единиц Сведберга. Кроме палочкообразных, обнаружены частицы и других форм, которые Бергольд [309] считает различными стадиями развития вируса. По его мнению, эти частицы попадают внутрь полиэдровых телец во время образования кристаллов белка.

Химический состав полиэдровых вирусов очень прост, они состоят только из белка и дезоксирибонуклеиновой кислоты. В последней содержится весь фосфор вируса, количество которого составляет около 1,8% (от веса сухого вируса). Сами полиэдры содержат лишь около 0,13% фосфора. Нуклеиновые кислоты вирусных частиц подвергались анализу [68].

Однако не все полиэдры ведут себя, как описано выше. Смит и Уайкофф [310] показали, что существует не менее двух типов полиэдров, возбуждающих болезни насекомых. В качестве представителя одного из этих типов они назвали вирус ночной бабочки кремовой тигровой расцветки (*Arctia villica*), у которой были обнаружены вирусные частицы сферической формы.

Еще один тип болезни насекомых представляет собой капсулярное заболевание, которое отличается от полиэдровых заболеваний тем, что его возбудители—единичные палочкообразные частицы—находятся внутри небольших капсул, которые присутствуют в крови зараженных животных и никогда не содержатся внутри клеточных ядер. Некоторые из таких вирусов были выделены, и их нуклеиновые кислоты, которые являются также дезоксирибонуклеиновыми, были подвергнуты анализу [311, 312].

4. БАКТЕРИОФАГИ

А. Введение

Бактериофаги были открыты независимо друг от друга Туортом [313] в Англии и канадским исследователем д'Эреллем [314, 315] во Франции. Эти исследователи заметили, что на поверхности бактериальных культур имеются светлые участки, которые образуются вследствие лизиса бактерий, и что материал, перенесенный с этих участков на растущие культуры тех же бактерий, вызывает их дальнейший лизис, сопровождаемый размножением возбудителя инфекции. Инфекциозность этого материала можно уничтожить нагреванием, но она сохраняется в фильтрате после пропускания материала через фильтры, удерживающие бактерии. Агент не размножается в отсутствие бактерии-хозяина, поэтому его отнесли к вирусам, и д'Эрелль назвал его «бактериофагом». (Теперь его часто называют просто «фагом».) Впоследствии было обнаружено,

что многие бактерии либо восприимчивы к бактериофагам, либо являются их носителями. В противоположность ранее высказанному мнению д'Эрелля во взаимоотношении между фагом и бактерией-хозяином в значительной степени проявляется специфичность, так как есть много бактериофагов, из которых каждый действует против бактерий ограниченного числа видов. Такая специфичность является основой определения типов бактерий по их фагам.

Можно различить два основных типа взаимоотношений между бактериофагами и бактериями. Классическим примером первого типа могут служить те явления, по которым бактериофаги были впервые открыты. Внесение фага в восприимчивый к нему штамм бактерий приводит к адсорбции его частиц клетками хозяина. В течение некоторого времени после этого фаг не отделяется от бактерии. Этот период заканчивается лизисом бактерий и освобождением множества частиц фага. Это впервые было обнаружено при исследовании бактериофага, освободившегося в процессе его развития, и при наблюдении под ультрамикроскопом [315] бактерий во время их лизиса, когда можно видеть, как они набухают, принимая сферическую форму, и лопаются, освобождая множество мелких частиц. Второй тип взаимоотношений между фагами и бактериями обнаружен на штаммах лизогенных бактерий—носителей фагов; во время роста этих бактерий фаги выделяются в окружающую их среду. Такие фаги не производят лизиса родительских штаммов бактерий, но их можно обнаружить по способности вызывать лизис родственных им чувствительных к фагу штаммов бактерий. У лизогенных бактерий устанавливается равновесие между внутриклеточной формой фага и компонентами нормальной клетки, которое при некоторых обстоятельствах может быть нарушено таким образом, что поведет к лизису бактерий и образованию фага. Лизогенные штаммы бактерий впервые выделил Борде [316] в 1920 г. а позднее—Лисбонн и Каррэр [317]. Однако эти авторы истолковывали лизогенность не как следствие переноса вируса, ибо Борде [318] и многие другие исследователи в то время не разделяли мнения д'Эрелля о том, что бактериофаги являются паразитирующими на бактериях вирусами, а считали лизогенность явлением бактериальной природы. Здесь нет надобности касаться этого расхождения взглядов, так как оно относится главным образом к вопросам о точном определении понятий. Бактериофаги, каково бы ни было их происхождение, рассматриваются как вирусы, способные вступать с бактериями-хозяевами во взаимоотношения двух рассмотренных выше типов.

За последние 15 лет бактериофаги широко использовались для изучения взаимодействий между вирусом и бактерией-хозяином. Система бактериофаг—бактерия представляет для такого изучения ряд технических преимуществ: сравнительно короткий период пол-

ного цикла развития; легкость, с которой все клетки бактериальной популяции могут быть одновременно инфицированы одной или несколькими вирусными частицами; пригодность бактерий для биохимических и генетических исследований. Большинство исследований было проведено с фагами семи типов и их мутантами, поражающими некоторые штаммы *Escherichia coli*. Три типа фагов раньше были известны под различными названиями, но когда Демерец и Фано [319] добавили к ним четыре вновь открытых типа вирусов, вся группа была обозначена символами 1—7 Т. Все они происходят от отдельных фаговых изолятов и все вызывают лизис *E. coli* штамма В, но не входят в лизогенное взаимоотношение со своим хозяином. Серологические и биологические соотношения между фагами Т указаны в табл. 13, а их морфологические признаки и физические свойства—в табл. 14 и 15. Фаги T_3 и T_7, как и T_2, T_4 и T_6, составляют две группы близкородственных вирусов, тогда как T_1 и T_5 различны. Группы перекрестной резистентности, составленные по их способности инфицировать определенные мутанты бактерий-хозяев, не дают надежных указаний на родство.

Хотя объединенные усилия, направленные на изучение этой небольшой группы фагов, дали возможность получить обширные данные, которые легко привести в соответствие друг с другом, однако уверенность, с которой сделанные выводы можно было бы распространить и на другие фаги и вообще на вирусы, в соответствующей степени уменьшилась. В последнее время исследованиям была подвергнута более обширная группа бактериофагов.

Таблица 13

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ Т, АКТИВНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К *ESCHERICHIA Col* В

Фаг	Группировка по серологической перекрестной реакции [320]	Группировка по перекрестной устойчивости по числу соответствующих штаммов бактерий-хозяев [319]	Продолжительность латентного периода, мин. [320]	Размеры бактерий-хозяев во время распада [320]
T_1	}	}	13	180
T_5	}	}	40	300
T_2	}	}	21	120
T_6	}	}	25,5	200—300
T_4	}	}	23,5	300
T_3	}	}	13	300
T_7	}	}	13	300

Таблица 14

РАЗМЕРЫ И ФОРМЫ БАКТЕРИОФАГОВ, ВИДИМЫХ ПОД ЭЛЕКТРОННЫМ МИКРОСКОПОМ

Фаг	Ссылка на литературу	Размер головки, *мμ*	Размер хвоста, *мμ*	Примечания
T_1	321	50	120×10	
T_5	321	90	170×15	
T_2	321	60×80	100×20	
T_2	329	100×80	111×18	Бульонная культура
T_2	329	113×86	135×20	Синтетическая среда
T_4	321	60×80	100×20	
T_6 *E. coli*	321	60×80	100×20	
T_6	325	60×80		Не затенено
T_6	325	80×100	100×20	Затенено
T_3	321	45	—	
T_7	321	45	—	
T_7	327	51	—	Не затенено
T_7	327	73	—	Затенено
P_2	322	50—60	—	
Staphylococcus	322	100	200	
Salmonella pullorum	323	40—45	—	
Streptomyces griseus	324	50	150×15	
Streptococcus lactis	326	70	150×30	
Bacillus megatherium	328	100	260×40	Затенено (оттиски в первоисточнике)

Б. Изучение инфекционных частиц

Успех исследований бактериофагов в большинстве случаев зависит от возможности подсчета числа центров инфекций. В основу биологических методов изучения бактериофагов положена их способность вызывать лизис бактерий. В литературе можно найти описание методов определения этой способности по времени, в течение которого в одних и тех же условиях происходит лизис данного числа бактерий [337]; однако эти методы теоретически ненадежны и на практике могут дать ошибочные результаты. Примененный д'Эреллем [315] и усовершенствованный другими исследователями [338, 339] метод подсчета инфицированных участков бактериальной культуры дает возможность определить число единиц инфекции непосредственно. Измеренное количество суспензии фага при

Таблица 15

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ

Фаг	Единицы Сведберга	Ссылка на литературу	D_{20}, $см^2/сек \cdot 10^7$	Ссылка на литературу	V, *мл/г*	Ссылка на литературу	Инфекционность, *гN/единица*	Ссылка на литературу
T_2	1000	330			0,66	335	$1{,}3 \cdot 10^{-16}$	329
	700	330						
T_4			0,80	334				
T_6	1050	325	0,45	333			$1 \cdot 10^{-16}$	331
	825	325						
	1009	331						
	794	331						
T_3			1,19	334				
T_7	480	327			0,68	327	$0{,}5 \cdot 10^{-16}$	327
Фаг *Staph.* Нортропа	650	332	0,18	336	0,83	332	$1 \cdot 10^{-16}$	336

соответствующем разбавлении добавляют к суспензии молодой культуры штамма бактерии, чувствительного к фагам; смесь выдерживают непродолжительное время при низкой температуре, чтобы дать возможность адсорбироваться вирусу, и затем, разбавив ее слабым раствором агар-агара, разливают по поверхности агаровой пластинки. После инкубации поверхность, на которой происходит рост бактерий, прерывается зонами просветления (дисками), образовавшимися вследствие лизиса бактерий. В связи с тем, что отношение число фагов/число бактерий в посевном материале очень невелико, вероятность адсорбции бактерией более одной частицы фага ничтожна*, следовательно, каждый инфицированный участок возникает от одного центра инфекции исходной фаговой суспензии, который размножился и вызвал лизис окружающих бактерий**.

* В смеси фагов с бактериями относительное количество бактерий, адсорбирующих по 0, 1, 2 и более вирусных частиц, следует закону распределения Пуассона. Число частиц фага, адсорбированных одной бактериальной клеткой, обычно называют многократностью инфекции.

** Ошибки могут возникнуть при подсчете фагов, медленно адсорбирующихся на частицах бактерии-хозяина, или вследствие инактивации фагов в процессе работы. Поэтому на практике необходимо определять отношение числа центров инфекции к числу зон просветления, известное под названием «коэффициента образования инфицированных участков» [338].

В. Выделение и очистка бактериофагов

Лизаты с высокими титрами бактериофагов (10^{10}—10^{11} частиц на 1 *мл*) можно получить или путем одновременного инфицирования всех клеток растущей бактериальной культуры и инкубации до тех пор, пока не произойдет лизис (единичный цикл размножения), или инфицированием небольшого количества клеток молодой культуры, когда полный лизис будет происходить после многих циклов освобождения и повторной адсорбции фагов. Очистка вируса состоит в отделении его от незатронутых бактерий и остатков бактерий, подвергнувшихся лизису.

Такую очистку впервые произвел Шлезингер [209, 210] в 1933 г.; он удалял бактерии и их остатки фильтрованием, концентрировал фаги ультрафильтрованием и очищал их дифференциальным центрифугированием. Таким путем он концентрировал фаг, активный по отношению к *E. coli*, весьма сходный по своим свойствам с четными фагами Т Демереца и Фано. При анализе препарата в нем было найдено 42% углерода, 6,4% водорода, 13,2% азота и 3,7% фосфора. Препарат содержал белок, небольшое количество жировых веществ и давал реакцию Фёльгена [211]. Сначала Шлезингер не мог объяснить присутствие углевода в полученном им фаге, который, как было обнаружено, по мере дальнейшей очистки давал все более слабую реакцию Молиша. Возможно, это зависело от ошибки в его методике проведения реакции. Путем подсчета вирусных частиц под ультрамикроскопом он определил средний вес частицы равным $4{,}3 \cdot 10^{-16}$ *г*; поскольку плотность фага равна 1,3, диаметр частицы должен составлять 85 *мμ* (в предположении, что она имеет сферическую форму). Это очень хорошо согласуется с результатами последующих измерений при помощи электронного микроскопа. Приготовленные против этого фага антисыворотки практически не содержали антител к клеткам *E. coli*.

В 1938 г. Нортроп [336] выделил инфекциозный материал из лизатов фага *Staphylococcus* путем осаждения 60-процентным раствором $(NH_4)_2SO_4$, после того как муцин и невирусный белок были удалены обработкой ацетатом свинца и трипсином соответственно. Трудно судить, насколько чистым был этот препарат, так как его инфекциозность определяли по времени, в течение которого произошел лизис стандартной бактерии. Материал состоял главным образом из частиц, имеющих константу седиментации 650 *S* [332], и содержал белок и 4,8% фосфора.

С тех пор было изолировано и более полно охарактеризовано несколько различных бактериофагов [327, 329, 331, 340]; установлено, что они почти целиком состоят из нуклеиновой кислоты и белка. В применявшихся методах остатки бактерий удаляли фильтрованием или медленным центрифугированием, в ряде случаев после выдерживания лизата в течение некоторого времени

при 4° для агрегации бактериального материала. Затем вирус из надосадочной жидкости осаждали в высокоскоростной центрифуге, повторно суспендировали в разбавленном растворе поваренной соли или в буферном растворе и еще раз очищали, применяя метод переменного центрифугирования при большом и малом числе оборотов, с некоторой потерей активности материала. Фаг T_6 концентрировали ступенчатым диализом против забуференных растворов этилового спирта при низких температурах (от —1 до —5°), что приводило к полному осаждению вируса в 30-процентном растворе этилового спирта при pH 5,4. Осаждение вируса при pH 4 представляет другой способ его концентрирования [331, 341].

Хотя такими методами получают концентраты фагов довольно постоянной и высокой чистоты, в них часто содержится некоторое количество неактивных вирусных частиц и мелких остатков бактерий, адсорбируемых вирусом. При 37° инактивация многих фагов происходит с заметной скоростью, которую можно снизить до минимальной, если приготовлять лизаты, используя один цикл роста фагов и охлаждая полученный материал тотчас после окончания этого цикла. Таким путем получается максимальный титр фага. В препаратах T_2, T_4 и T_6 серологическим методом был обнаружен невирусный материал бактериального происхождения [342]. Его можно удалить антибактериальными сыворотками с некоторой потерей активности вируса. Можно также вызвать диссоциацию комплексов фагов с бактериальным материалом, изменяя концентрацию соли [343].

Г. Физические свойства

1) ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

При помощи электронного микроскопа были исследованы многие бактериофаги, взятые или из неочищенных лизатов, или из очищенных препаратов. Большинство их обладает сходными и необычными морфологическими признаками. Фаги состоят из сферической или короткой палочкообразной головки и хвоста. Такую форму имеют фаги T_1, T_2, T_4, T_5 и T_6, активные по отношению к *E. coli*, и фаги, действующие на *Streptococcus lactis*, различные виды *Staphylococcus*, *Bacillus megatherium* и *Streptomyces griseus*. Фаги же T_3, T_7 и фаг, активный к *Salmonella pullorum*, согласно описаниям, представляют собой сферические тельца без хвостов, хотя более тщательные исследования показывают, что частицы T_3 и T_7, по-видимому, имеют хвосты. Руска [344] описал бактериофаги, имеющие приблизительно палочкообразную форму. Однако эти бактериофаги были получены из смешанных культур и дальнейшему изучению не подвергались. В табл. 14 приведены данные о размерах частиц нескольких бактериофагов, полученные путем

измерений при помощи электронного микроскопа. Размеры этих частиц в затененных препаратах несколько больше, чем в незатененных, однако имеются сообщения о неправдоподобно больших различиях между ними; например утверждалось, что в незатененных препаратах диаметр T_7 равен 45 *мμ* [321], а в затененных — 73 *мμ* [327].

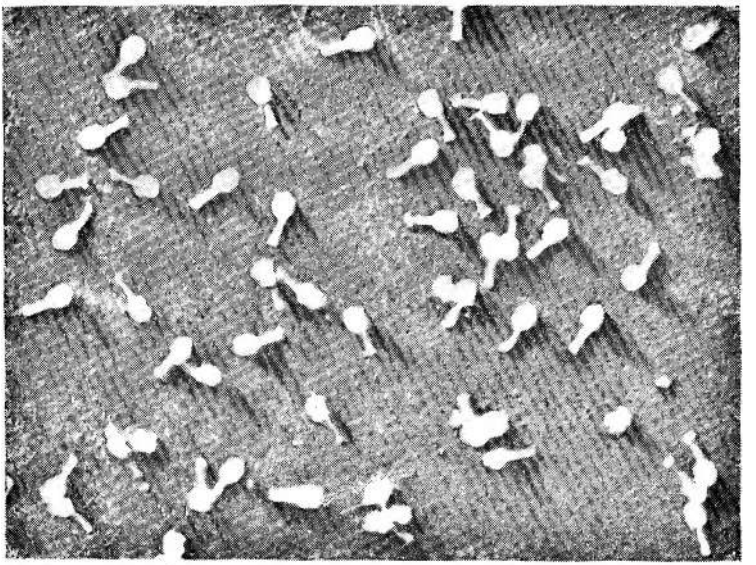
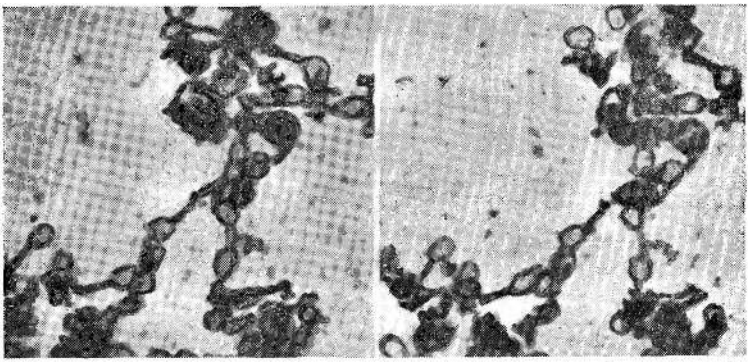


Рис. 9. Электронный микрофотоснимок бактериофага T_2r+ *Escherichia coli* [341].

Наиболее полно изучены близкородственные фаги T_2, T_4, T_6. Под электронным микроскопом их препараты имеют вид однородных частиц с короткими палочкообразными закругленными головками ($\sim 100 \times 80$ *мμ*) и с хвостами примерно 110×18 *мμ* (в затененных препаратах) [321, 329] (рис. 9). Слегка утолщенный кончик хвоста, по-видимому, состоит из коротких фибрилл. Хорошее совпадение между числом инфекциозных единиц и числом частиц фага T_2, сосчитанных под электронным микроскопом [345], как и близкое соответствие между активностями и рядом физических свойств этих частиц, окончательно доказывает тождественность инфекциозной единицы с тельцем, обладающим формой головастика.

При исследовании головки фага T_4 обнаружено, что она не является однородной по структуре, а обладает несколько более сложной морфологией. В незатененных препаратах часто можно наблюдать

частицы с головками, утратившими большую часть рассеивающего электроны вещества, хотя оставшиеся сравнительно пустые структуры имеют те же размеры и форму и к ним по-прежнему прикреплены хвосты (рис. 10). Эти структуры, очевидно, соответствуют внешним оболочкам или кожице головок и, по-видимому, обладают осмотическими свойствами, поскольку головки фагов T_2, T_4 и T_6



Р и с. 10. Стереоскопический электронный микрофотоснимок «теней» бактериофага T_4 *Escherichia coli*.

Частицы фага были подвергнуты резкому изменению осмотического давления быстрым разбавлением концентрированного раствора соли и утратили свою нуклеиновую кислоту, после чего от них остались пустые белковые оболочки такой же формы, как и первоначальные фаговые частицы (по Андерсону [346]).

(но не всех фагов) могут, подобно осмотическим ячейкам, разрываться при резком изменении концентрации раствора соли, в котором они находятся [346, 346а]. В некоторых незатененных препаратах можно видеть, что рассеивающее электроны вещество в головках фагов T_2 локализуется по крайней мере в двух различных областях [329]. Эта особенность структуры в затененных препаратах проявляется в виде неровных контуров на поверхности головки. Руска [344] заметил подобную структуру в своих препаратах фагов *E. coli*. В этом отношении более крупные бактериофаги приближаются по морфологической сложности к некоторым животным вирусам.

2) УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИОФАГОВ

Взвеси большинства бактериофагов сохраняют свою инфекциозность в течение значительного времени при 0—4°, но медленно инактивируются при комнатной температуре и быстро при температуре выше 55—65°, когда их частицы распадаются. Фаги T_2 [330] и T_6 осаждаются при значениях pH ниже 4,2, которое является

их изоэлектрической точкой. При pH выше 10—11 взвеси перестают опалесцировать и становятся вязкими вследствие освобождения содержимого частиц. Взвеси фагов T_2 сохраняют постоянную инфекциозность при pH 5—9, тогда как физической устойчивости их частиц отвечают более широкие пределы значений pH (3,6—10).

Устойчивость бактериофагов сильно зависит от концентрации определенных катионов [347]. При комнатной температуре многие бактериофаги сохраняют почти неизменную инфекциозность в бульоне, но быстро инактивируются в растворах солей натрия в определенных пределах концентрации. Например, взвеси фага T_5 в 0,1—0,2 *M* растворах солей натрия при 37° утрачивают 98% (и более) своей инфекциозности спустя 2 часа, но при высоких концентрациях ионов натрия скорость инактивации уменьшается и в 1,0 *M* растворе NaCl становится ничтожно малой. Низкие концентрации некоторых двухвалентных катионов, например 10^{-3} *M* Ca^{2+} или Mg^{2+}, предотвращают инактивацию фага T_5 ионами натрия. Бактериофаги T_2 и T_6 осаждаются при диализе против дистиллированной воды, но могут быть повторно суспендированы в разбавленных растворах соли без потери инфекциозности.

Фаг T_2 не инактивируется трипсином, химотрипсином, рибонуклеазой и дезоксирибонуклеазой.

3) СЕДИМЕНТАЦИЯ И ДИФФУЗИЯ

Хотя методами центрифугирования были определены размеры большого количества бактериофагов, но лишь немногие фаги исследовались в аналитической ультрацентрифуге. Препараты колифага T_7 [327] и исследованного Нортропом фага *Staphylococcus* [332] осаждались в ультрацентрифуге при наличии одной границы раздела, несмотря на то, что последний фаг содержал также некоторое количество поглощающего ультрафиолетовые лучи материала, который осаждался очень медленно и, по-видимому, представлял собой нуклеиновую кислоту, адсорбированную на поверхности частиц. Однако фаги T_2 и T_6 могут существовать в двух формах, которые имеют разные константы седиментации. При pH между 5,8 и 9,5 фаг T_2 [330] осаждается при наличии одной границы раздела и имеет константу седиментации приблизительно 700 *S*. В присутствии $CaCl_2$ (0,023 *M*) или при pH между 4,6 и 5,8 эта граница раздела заменяется другой, которой соответствует константа седиментации около 1000 *S*. Это изменение обратимо. Подобным же образом фаг T_6 существует в двух формах, константы седиментации которых равны 825 и 1050 *S* [325, 331]. При pH выше 4,9 присутствуют обе эти формы, при pH 4,9—7,5 преобладает форма с константой седиментации 1050 *S*, при более высоких значениях pH или в старых препаратах увеличивается относительное количество

формы с константой седиментации 825 *S*. Седиментация такого типа встречалась только у фагов, частицы которых имеют хвосты. Быстрее осаждающиеся компоненты, возможно, являются димерами, но непосредственно доказать это трудно, так как инфекциозность измеряют в значительно более разбавленных растворах, чем те, которые применяют для изучения седиментации.

Литературные данные о диффузии бактериофагов крайне противоречивы. Большинство противоречивых утверждений возникло вследствие попыток измерить константы диффузии бактериофагов в растворах очень низкой концентрации с применением методов определения биологической активности. Калмансон и Бронфенбреннер [348], применяя метод пористого диска при очень низких концентрациях, пришли к заключению, что константа диффузии фага T_2 равна $1{,}7 \cdot 10^{-7}$ *см*^{2}/*сек* (D_{20}), т. е. соответствует сферическим частицам диаметром 16 *мμ*, и что препараты не гомогенны, так как в них содержались частицы диаметром до 4 *мμ*, которые также были инфекциозными. Это утверждение впоследствии опровергли Гершей, Кимура и Бронфенбреннер [349], которые пришли к выводу, что прежние измерения были ошибочными вследствие циркуляции жидкости через поры диска. О значительном увеличении констант диффузии бактериофагов при малых разбавлениях сообщали также Нортроп [336] и Полсон и Шепард [350]. Последние сделали вывод, что, поскольку их препараты бактериофагов T_3 и T_4 под электронным микроскопом и при других исследованиях не обнаружили никаких признаков неоднородности, бактериофаги обладают специфической подвижностью (даже если измерения производят при 4°).

Тем не менее константы диффузии бактериофагов T_3, T_4 [351] и T_6 [333], измеренные при высоких концентрациях (10^8—10^{10} частиц в 1 *мл*), довольно хорошо соответствуют размерам частиц, определяемым методом электронной микроскопии или другими способами. Вероятно, большие значения констант диффузии, получаемые при низких концентрациях фагов, скорее всего можно приписать техническим трудностям измерения констант диффузии в этих условиях.

Д. Химический состав

Те бактериофаги, которые были изолированы и подвергнуты анализу, почти целиком состояли из белка и дезоксирибонуклеиновой кислоты. Содержание последней в фагах T_2, T_6 и T_7 достигает приблизительно 40—50% их веса в сухом состоянии. Вследствие этого взвеси таких фагов имеют спектр поглощения ультрафиолетовых лучей с отчетливо выраженным максимумом при 260 *мμ* (рис. 11). В состав фага T_2 входит небольшое количество (1—2%) нейтрального жира, который был также найден Шлезингером в его препарате фага *E. coli*.

Однако при анализе препаратов фагов T_2 [335], T_4 [340], T_6 [352] и T_7 [353] обнаружено присутствие в них небольших переменных количеств различных компонентов, отличающихся от белка и дезоксирибонуклеиновой кислоты. В препаратах фага T_6 содержится неорганический и растворимый в спирте фосфор; в фаге T_7 находится содержащий глюкозу углевод, не входящий в состав нуклеиновой кислоты, а в фагах T_2, T_6 и T_7 содержатся переменные количества (1—12% от веса сухого вещества) рибонуклеиновой кислоты, определяемой реакцией с орцинолом в фракциях, выделенных по методу Шмидта и Таннхаузера [353а], или, как в случае с фагом T_7, посредством хроматографии на бумаге рибозы, освобождающейся при гидролизе серной кислотой. Поскольку большинство этих фагов выделяли только дифференциальным центрифугированием, возможно, что они содержали небольшие переменные количества бактериального материала. Это особенно явно обнаруживается в препаратах фага T_7, из которых два содержали 16,6 и 31,1% углевода соответственно. Чистые препараты бактериофагов *E. coli* не содержат антигенов, общих с бактерией-хозяином. Коэн и Арбогаст [342] серологическими методами обнаружили, что рибонуклеиновая кислота в препаратах фагов T_2, T_4 и T_6 связана с бактериальным материалом и отсутствует в фагах, очищенных бактериальной антисывороткой. Посредством гидролиза и хроматографического анализа концентратов фага T_5 на рибонуклеотиды также было установлено отсутствие рибонуклеиновой кислоты [68]. Весь фосфор и вся нуклеиновая кислота этих фагов находятся в виде дезоксирибонуклеиновой кислоты.

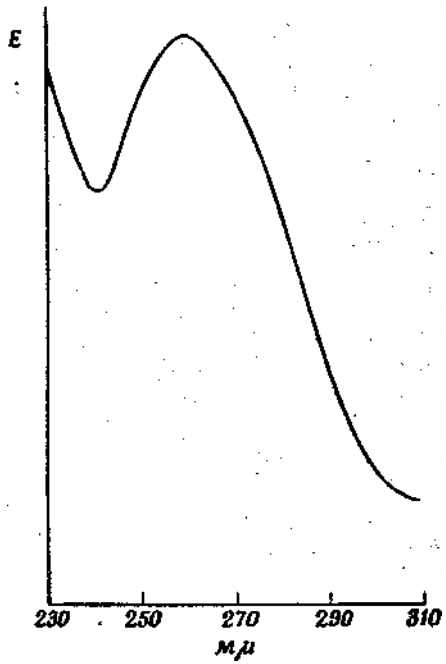


Рис. 11. Кривая спектра поглощения суспензии бактериофага T_2 при pH 7 в 1-процентном растворе NaCl.
При 260 *мμ* в (P) ≃ 10 200. Существенная часть этого поглощения связана с неспецифическим рассеянием света крупными частицами.

Фаг T_2 содержит небольшое количество серы (вероятно, около 0,3% веса сухого вещества). Гершей и Чэйз [354] обнаружили, что при разрушении частиц фага T_2, меченных изотопами P^{32} и S^{35},

путем резкого изменения концентрации окружающего раствора (осмотический шок) весь фосфор и, следовательно, вся дезоксирибонуклеиновая кислота фага переходят в раствор; фосфор не осаждается фаговой антисывороткой и не адсорбируется бактериями. Сера же осаждается фаговой сывороткой и специфически адсорбируется на бактерии-хозяине. По-видимому, весь содержащий серу белок связан с мембраноподобными структурами (вероятно, они представляют собой разрушенные частицы, изображенные на рис. 10), в которых удерживается дезоксирибонуклеиновая кислота и, возможно, некоторое количество не содержащего серы белка. Таким образом, находясь внутри частиц фага, дезоксирибонуклеиновая кислота защищена от действия дезоксирибонуклеазы.

Однако в некоторых препаратах фагов T_2 и T_6, полученных из бактериальных культур, выращенных на синтетической среде, до 30% содержащейся в них дезоксирибонуклеиновой кислоты находится на поверхности частиц фага; эту кислоту можно удалить электрофорезом или действием дезоксирибонуклеазы [352, 355]. Однако удаление этой части дезоксирибонуклеиновой кислоты не сопровождается потерей инфекциозности, и ее нельзя считать существенной для частиц фага.

Дезоксирибонуклеиновые кислоты фагов T_2, T_4 и T_6 замечательны тем, что они не содержат цитозина, вместо которого в них имеется родственное цитозину основание, которое, согласно определениям, является 5-оксиметилцитозином [356]. Это основание отсутствует в дезоксирибонуклеиновой кислоте их хозяев-бактерий *E. coli*, содержащих цитозин, и оно пока не найдено в какой-либо другой нуклеиновой кислоте. 5-Оксиметилцитозин несколько менее устойчив, чем цитозин, и почти полностью разрушается при гидролизе нуклеиновой кислоты 72-процентной хлорной кислотой. Этим объясняются результаты, полученные Маршаком [357], который из подобного рода гидролизатов нуклеиновой кислоты фага T_4 смог получить только аденин, гуанин и тимин. Дезоксирибонуклеиновые кислоты трех четных фагов Т содержат такие же относительные количества оснований.

До сих пор имеется еще мало данных о химическом составе белков бактериофагов. Фаг T_2 [352] и исследованный Шлезингером бактериофаг *E. coli* [210] дают положительные биуретовую реакцию и реакцию Миллона и отрицательную реакцию Гопкинса—Коле, хотя фаг T_2 дает слабую реакцию на триптофан при испытании бензальдегидом по методу Эрлиха. Коэн и Андерсон [340] нашли, что фаг T_2 содержит 1,45% триптофана, 2,77% тирозина и 2,86% аргинина от веса сухого вещества. Несмотря на большое значение опытов, проведенных с бактериофагами, меченными S^{35}, точные данные о содержании в бактериофагах серы и содержащих серу аминокислот, к сожалению, не были опубликованы. Шлезин-

гер обнаружил, что исследованный им колифаг не дает реакций на цистин и цистеин с сульфидом свинца. Посредством хроматографии на бумаге Полсон и Уайкофф [358] показали, что после кислотного гидролиза препаратов фага T_6 в гидролизате содержались метионин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин, глицин, треонин, аланин, валин, фенилаланин, изолейцин, лейцин, пролин, тирозин, аргинин, лизин и гистидин.

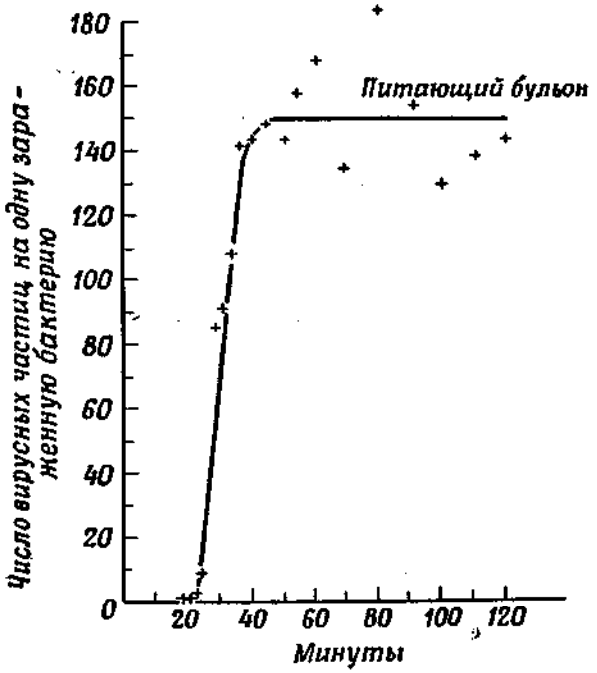
Е. Размножение бактериофагов

Частицы бактериофага определяют по биологическим свойствам, которые связаны с белком и дезоксирибонуклеиновой кислотой, имеющих специфическую химическую конституцию, организованную в характерную физическую структуру. Частица представляет собой минимальную структуру, необходимую для того, чтобы обладать свойством проникать в клетку хозяина и способностью к самовоспроизведению. Поскольку бактериофаг, по-видимому, не обладает собственными ферментами, необходимыми в процессах самовоспроизведения для освобождения энергии, потребной для синтезов, то он должен использовать ферменты своего хозяина. Размножению фагов присущи характерные особенности биологического воспроизведения: образование потомства с идентичными свойствами и случайное возникновение мутантов с распознаваемыми наследственными свойствами. В размножении бактериофагов, как и всяких вирусов, следует выяснить, во-первых, каким образом под действием внедрившейся частицы атомы в клетке хозяина создают характерную для вируса молекулярную организацию, и, во-вторых, раз внедрение произошло, определяется ли основной характер этого синтеза всей фаговой частицей или только ее частью. Для этого удобнее сначала рассмотреть взаимоотношение между вирусом и хозяином нелизогенного типа, а затем обратиться к лизогенным бактериям.

1) ЦИКЛ ЛИЗИСА БАКТЕРИЙ

После адсорбции фага бактерией проходит короткий период времени (латентный период), в течение которого бактериофаг не освобождается. Этот период заканчивается лизисом бактерии и появлением вновь образованных частиц фага. Такой тип цикла лизиса, свойственный большинству бактериофаговых систем (но видоизмененный у лизогенных бактерий), впервые открыл д'Эрелль. Развитие этого цикла можно проследить при помощи метода Эллиса и Дельбрюка [338], применяемого для выделения единичного цикла размножения фага (рис. 12). Для увеличения скорости адсорбции фаг и бактерии смешивают при высоких концентрациях, смесь сильно разбавляют для предотвращения реадсорбции появляющихся

в процессе лизиса частиц фага и периодически определяют число центров инфекции. Последнее равно сумме чисел инфицированных бактерий и неадсорбированных вирусных частиц. У *E. coli* это число постоянно, так как инфицированные клетки не размножаются. За латентным периодом следует резкое увеличение числа центров инфекции вследствие освобождения новых частиц фага,



Р и с. 12. Кривая единичного цикла размножения фага T_2r+ в бульонной среде (по Коэну [389]).

происходящее одновременно с лизисом клеток бактерий. Повышение титра дает среднее число частиц фага, выделившихся при лизисе одной бактерии (средняя литическая величина). Литические величины единичных бактерий сильно варьируют [359] (у фагов Т в пределах от 50 до 1000), но изменения латентного периода значительно меньше, если введены соответствующие поправки на неодновременную адсорбцию частиц фага. Как латентный период, так и литическая величина зависят от факторов, определяющих рост бактерий.

Описаны случаи, когда лизис бактерий и освобождение фагов, по-видимому, происходят неодновременно, что особенно заметно у бактериофагов *Staphylococcus muscae*, исследованных Прайсом [360],

который обнаружил, что, хотя в некоторых условиях появление свободного фага и происходит по ступенчатой кривой, лизис бактерий начинается лишь спустя некоторое (непродолжительное) время после выделения частичек фага. Однако эти наблюдения можно объяснить и иначе, если допустить, что взятые для определения фага и неоднократно разбавляемые в свежей среде образцы препарата подверглись лизису во время работы. До сих пор не получено данных, которые окончательно доказали бы, что фаги могут выделяться из бактерий без одновременного лизиса последних.

2) АДСОРБЦИЯ БАКТЕРИОФАГА НА БАКТЕРИИ-ХОЗЯИНЕ

Первой стадией размножения фага является его объединение с клеткой хозяина. Поглощение бактериофага бактериальной клеткой—сложный процесс, состоящий из нескольких стадий.

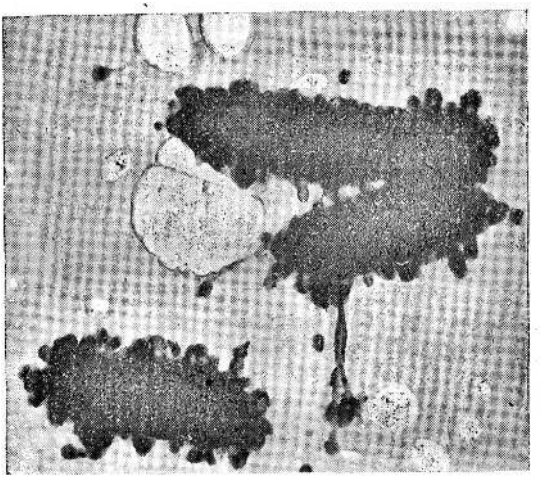


Рис. 13. Электронный микрофотоснимок бактериофага T_4, показывающий, что частицы фага прикрепляются хвостами к поверхности клетки хозяина (по Андерсону [346]).

Вначале прикрепление вирусной частицы к поверхности клетки бактерий бывает обратимым, но обычно за этим скоро следует ряд необратимых изменений, которые можно определить общим термином «инвазия», поэтому в целом обычно наблюдаемый процесс адсорбции необратим. У *E. coli* адсорбция активного фага приводит к гибели бактерий (в том смысле, что клеточное деление бактерии прекращается), к распаду клеточных ядер (или хрома-

тиновых телец) [361], за которым следует размножение фага. На электронных микрофотографиях отчетливо видно, что частицы бактериофага прикрепляются к поверхности клетки бактерии своими хвостами, но никогда полностью не проникают в клетку [362] (рис. 13). Инактивируя фаг различными способами, можно различить несколько стадий его инвазии в клетку бактерии. Сильно облученный ультрафиолетовым светом фаг при адсорбции его на бактериях убивает их, причем происходит распад клеточных ядер [361], хотя при этом фаг не размножается. Адсорбция такого фага также предотвращает размножение попавшего на ту же клетку неродственного фага [363]. Однако фаг, получивший более трех инактивирующих импульсов рентгеновских лучей, даже будучи адсорбированным, утрачивает эти свойства [364]. Такое воздействие частично или полностью инактивирует генетическую часть бактериофага, которая внедряется в клетку хозяина при инвазии. Как будет показано (стр. 167), эта часть бактериофага составляет только долю его частицы и удерживается во внешней «оболочке» бактерии, обеспечивающей механизм для осуществления адсорбции.

а) Кинетика адсорбции. Смесь фага с чувствительными к нему бактериями содержит два типа центров инфекции: свободные частицы фага и бактерии с прикрепившимся к ним фагом. Эти два типа частиц можно отделить друг от друга центрифугированием или антифаговой сывороткой и, измеряя скорость уменьшения количества свободных частиц фага или скорость появления прикрепленных к бактериям частиц фага, можно определить скорость адсорбции фага. За исключением случаев высокой концентрации бактерий (B), адсорбция фага на бактериях протекает по типу бимолекулярной реакции, и соотношение между концентрацией фага (P) и временем (t) выражается уравнением (1), где (B)—концентрация бактерий, (P_0)—начальная концентрация фага (при $t=0$) и K—константа скорости адсорбции. Если (B) достаточно велика по сравнению с (P), которая предполагается постоянной, то после интегрирования уравнения (1) получаем уравнение (2):

$$-\frac{d(P)}{dt} = K(P)(B), \qquad (1)$$

$$\ln\frac{(P_0)}{(P)} = K(B)t. \qquad (2)$$

Частоту столкновений K_c между частицами фага и бактериями можно вычислить по уравнению

$$K_c = 4Dr, \qquad (3)$$

где D—константа диффузии фага и r—эффективный радиус бактерии [365].

Исследуя сходный с T_4 фаг, действующий на *E. coli*, Шлезингер [366, 367] обнаружил, что в оптимальных условиях $K=3\times\times10^{-11}$ *мл/сек.*

Принимая значение константы диффузии для фага T_4 равным $0{,}8 \cdot 10^{-7}$ *см*^{2}/*сек* (по измерениям Полсона [351]) и значение r равным $4 \cdot 10^{-5}$ *см*, получим, что $K_c \simeq 4 \cdot 10^{-11}$ *мл/сек*. Таким образом, эффективность столкновений очень высока. И действительно, Шлезингер, приняв эффективность столкновений, равной 100%, вычислил константу диффузии исследованного им фага; предполагая, что частица фага имеет сферическую форму, он определил ее размеры, которые, как оказалось впоследствии, очень близки к данным электронномикроскопических измерений.

б) Специфичность процесса адсорбции. Адсорбция фага специфична в отношении как поверхностной структуры фага и бактерий, так и кофакторов, необходимых для адсорбции некоторых фагов. Штаммы бактерий, устойчивых к определенному фагу (т. е. штаммы, жизнеспособность которых не изменяется в присутствии фага, не адсорбируют этого фага). Устойчивость к фагу может возникнуть от одной или нескольких мутаций, и от одной мутации может образоваться бактерия, устойчивая к нескольким фагам, к которым прежде она была чувствительна. Хотя имеются данные о том, что у некоторых бактерий наблюдается соответствие между антигенной структурой и их чувствительностью к определенным фагам [368], однако это может быть просто следствием того факта, что в эти оба явления вовлекаются большие участки поверхности бактерии. Механизм проникновения фага в бактерию неизвестен.

Некоторые штаммы фагов T_4 и T_6 не образуют зон просветления, когда они высеиваются с чувствительными к ним бактериями на синтетической среде. Эти фаги неспособны адсорбироваться на бактериях в отсутствие некоторых являющихся кофакторами аминокислот, особенно *l*-триптофана [369—371]. Андерсон [372] показал, что этот эффект связан с обратимой активацией фага кофактором. Кинетику активации можно объяснить, если допустить, что в отдельные участки на поверхности бактериофага вводится по нескольку (5—6) молекул *l*-триптофана [373—375].

в) Влияние ионов на адсорбцию фагов. Скорость адсорбции бактериофага заметно изменяется с концентрацией ионов в среде. Пак с сотрудниками [376, 377] обнаружили, что при низких концентрациях катионов фаги T_1 и T_2 не адсорбируются в заметной степени, но при увеличении концентрации одно- или двухвалентных катионов скорость адсорбции может достигать значений, соответствующих эффективности столкновений примерно 100%. При более высоких концентрациях катионов скорость адсорбции уменьшается. Первоначально адсорбированные на бактерии-хозяине частицы фага при определенных условиях могут десорбироваться вследствие изменения концентрации катионов. В соответствующих растворах солей фаги могут обратимо адсорбироваться также на стеклянных фильтрах, причем фаги тех штаммов T_4, для адсорбции

которых требуется триптофан, такими фильтрами удерживаются только в присутствии триптофана. Пак предполагает, что катионы обратимо связываются со специфическими участками на частицах фага, а возможно, до некоторой степени и с бактерией-хозяином, и что первоначальное прикрепление фага к бактерии обусловлено электростатическими силами; при этом специфичность процесса зависит от характера распределения электрических зарядов на поверхности бактерии и фага, который в свою очередь зависит от распределения на этих поверхностях связывающих ионы групп. Судя по температурному коэффициенту адсорбции, Пак в некоторых опытах выделил и количественно изучил начальную стадию такого рода процесса адсорбции. Подобным механизмом можно объяснить большое число эффективных столкновений, приводящих к адсорбции.

Природа последующих необратимых процессов на поверхности бактерий, которые ведут к инвазии фага, в настоящее время не известна. Если бактерии смешать с большим избытком частиц фага (около 100—200 частиц на 1 бактерию), то и без размножения фага происходит быстрый лизис бактерий [378], вероятно вследствие разрушения их поверхностных оболочек. Андерсон [379] показал, что при быстром размешивании смесей фага с бактериями необратимая адсорбция незначительна или вообще не происходит, хотя сразу после прекращения размешивания она протекает нормально. Это свидетельствует о том, что после прикрепления фага к бактерии требуется значительное время для его инвазии.

Ж. Образование фага внутри бактериальной клетки

Степень влияния инфекции на синтезы компонентов нормальной клетки у разных бактерий не одинакова. Клетки как лизогенных, так и чувствительных штаммов *Bacillus megatherium* [380], *Pseudomonas pyocyanea* и *Staphilococcus pyogenes* вариант *aureus* [381] продолжают делиться и расти в то время, когда в них размножается фаг. Но инфицирование *E. coli* четными фагами Т приводит к более полному изменению синтетических способностей клеток хозяина. Как рост, так и деление клеток прекращаются, а скорость дыхания остается на уровне, установившемся при введении инфекции [340]. Инфицированные клетки *E. coli* [382] в отличие от инфицированных клеток *Pseudomonas pyocyanea* [383] неспособны образовать адаптивные ферменты. Отсюда следует, что инфекция не разрушает существующую организацию дыхательных ферментов, но их дальнейшее продуцирование может прекратиться. После инфицирования количество рибонуклеиновой кислоты не увеличивается, но в значительных количествах образуются белок и дезоксирибонуклеиновая кислота [384], которая в значительной степени специфична для фагов. Опыты с применением изотопов показали, что большие количества фосфора и азота фагов T_2, T_4

и T_6 образуются из веществ, ассимилированных бактериями после инфицирования, и хотя часть фосфора, азота, пуринов и пиримидинов, находившихся в бактерии до инфицирования, передается потомству, имеется убедительное доказательство того, что образование фага не происходит путем передачи неизмененных высокомолекулярных веществ, существовавших внутри бактерии [352, 385, 386].

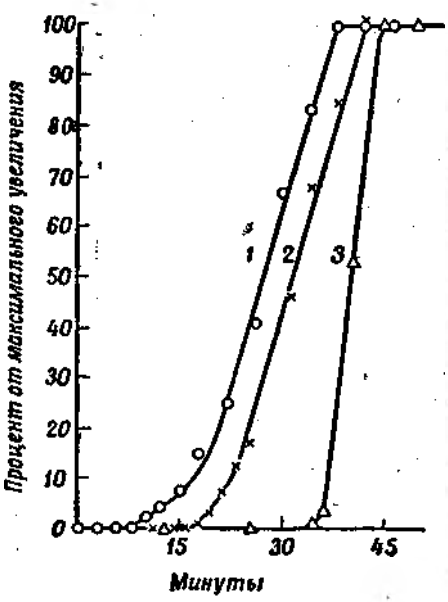


Рис. 14. Синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты и внутриклеточного фага в течение латентного периода. Фаг T_4г на *E·coli* B/r/1 при 30° (по Коэну [389]).
1—дезоксирибонуклеиновая кислота; *2*—внутриклеточный вирус; *3*—внеклеточный вирус.

Хотя белок и дезоксирибонуклеиновая кислота образуются в течение латентного периода, их можно определить непосредственно как компоненты фага только после того, как частицы фага станут зрелыми. Доэрман [387, 388] проследил образование активных частиц фага в течение латентного периода путем разрушения бактериальных клеток тремя способами: а) посредством «лизиса извне»* другим фагом в присутствии такого ингибитора обмена, как цианид; б) посредством лизиса только одним цианидом; в) ультразвуковыми колебаниями. Результаты, полученные этими тремя различными способами, близки, и это дает возможность предположить, что распад бактерий не влияет на состояние интрацеллюлярного фага. Активный фаг не регенерируется почти до середины латентного периода, после чего скорость появления частиц фага возрастает приблизительно линейно со временем, пока не достигнет конечной величины, при которой происходит разрыв бактерий. Форма кривой роста и то обстоятельство, что развитие процесса образования фага внутри клеток бактерий почти не зависит от исходного числа инфекциозных частиц, приводят к выводу о несостоятельности предположения о том, что бактериофаги размножаются делением подобно одноклеточным организмам. Аналогичный вывод был сделан на основании генетических исследований. На рис. 14 пред-

* При добавлении большого избытка фага к бактериям сразу же происходит их лизис без размножения фага.

ставлены кривые зависимости увеличения количества белка, дезоксирибонуклеиновой кислоты и внутриклеточного фага от времени, взятые из работ Коэна [389]. Увеличение количества белка начинается сразу после инфицирования, количество же дезоксирибонуклеиновой кислоты (измеренное по количеству материала, нерастворимого в трихлоруксусной кислоте и дающего реакцию с дифениламином) начинает увеличиваться примерно 9 мин. спустя, приблизительно за 7 мин. до появления активного внутриклеточного фага. Между появлением компонентов фага в химически обнаруживаемой форме и их организацией в активные частицы проходит определенное время, хотя продолжительность этого периода может также зависеть от скорости освобождения активных частиц с участков прикрепления их в клетке.

Доказательство того, что компоненты фага организуются в характерные частицы фага в поздней стадии латентного периода, получено также при изучении действия пигмента профлавина. При низких концентрациях профлавин не предотвращает лизис клеток *E. coli*, инфицированных фагами T_2, T_4, T_5 и T_6, но в его присутствии освобождается немного активных частиц фага [390]. Вместо активных частиц в случае фага T_2 в лизатах обнаружено множество круглых частиц, не имеющих хвоста и подобных по размерам головкам фага T_2. Они содержат мало нуклеиновой кислоты, реагируют с антифаговой сывороткой, но не адсорбируются на бактериях [391]. Подобные частицы найдены на распадающихся инфицированных бактериях, выращенных в отсутствие профлавина, к концу первой половины латентного периода [392]. Позднее они исчезают и их место занимают зрелые частицы фага; таким образом, они, по-видимому, представляют одну из стадий образования частиц фага в тот период, когда нуклеиновая кислота еще не прочно соединена с элементами их структуры. Действие профлавина, которое, как известно, наблюдается в поздней стадии размножения фага, вероятно, обусловлено его (и других красителей) сродством к нуклеиновым кислотам.

В течение первой половины латентного периода из разрушенных клеток бактерий невозможно регенерировать активный фаг. После инвазии фаговая частица утрачивает свою инфекциозность. Это может зависеть от незначительных изменений частицы, от прочности ее прикрепления к определенной части клетки или от полноты ее распада на более мелкие части. Используя меченный изотопом фаг, можно проследить судьбу атомов внедрившейся частицы фага. При таких опытах особое внимание следует уделять нескольким возможным источникам ошибок, в том числе обусловленным степенью чистоты препаратов фага и возможностью реадсорбции части полученного фага остатками бактерий. Этим, вероятно, отчасти объясняются некоторые противоречивые результаты, полученные в подобных опытах.

Все такие опыты показывают, что инфицирующая бактерию частица фага не появляется в своем потомстве без изменений. Вновь образовавшимся частицам передается около половины ее фосфора и аденина [393]; во всяком случае, что касается фосфора, то все полученное от родителя количество его распределяется между отдельными частицами потомства [394], причем наибольшая часть его распределяется между первыми 50 частицами. Если потомство из этих опытов используется для инфицирования бактерий в дальнейшем цикле размножения, то второе поколение опять будет обладать 50% радиоактивности первого поколения. Поэтому передаваемый потомству материал не весь находится в основной генетической единице, сохранившейся при размножении в незатронутом состоянии и включенной в состав каждой фаговой частицы потомства.

Опыты Гершея и Чэйза [354], использовавших фаг T_2, меченный изотопами P^{32} и S^{35}, указывают на то, что дезоксирибонуклеиновая кислота и по крайней мере часть белка бактериофага обладают не зависимыми друг от друга функциями. После инфицирования около 80% серы бактериофага можно удалить из бактерий срезающими усилиями, в виде материала, обладающего свойствами не содержащих нуклеиновой кислоты фаговых оболочек, получающихся при разрыве частиц фага вследствие резкого изменения концентрации соли (стр. 158). Бо́льшая часть фосфора внедрившегося фага остается внутри бактериальной клетки, в которой бактериофаг размножается нормально, давая потомство, содержащее около 30—50% атомов фосфора, полученного от родительской частицы, но менее 1% атомов ее серы. Если допустить, что в меченном таким способом бактериофаге изотоп S^{35} в значительной мере находится в содержащих серу аминокислотах, то можно предположить, что серусодержащий белок действует как оболочка, защищающая дезоксирибонуклеиновую кислоту, до тех пор пока последняя не проникнет в бактерию и не создаст условий для адсорбции, однако сама дезоксирибонуклеиновая кислота не участвует в процессе размножения фага после инвазии его в бактерии. Возможность проникновения в бактерию при ее инвазии некоторого количества белка пока еще нельзя исключить, но результаты опытов дают некоторые основания для интересной гипотезы о том, что генетическая часть бактериофага заключена в его дезоксирибонуклеиновой кислоте.

3. Генетика бактериофагов и размножение вирусов

У большинства вирусов имеются наследственные варианты или штаммы, многие из которых считаются связанными родством через одну или несколько ступеней прямой мутации. У большинства вирусов механическая эффективность инфекции настолько низка,

что для возбуждения единичной инфекции требуется большое количество вирусных частиц. Например, чтобы вызвать единичное поражение на листе *Nicotiana glutinosa*, нужно внести более 10^4 частиц вируса мозаики табака. Вследствие этого генетические отношения между вариантами большинства вирусов определить чрезвычайно трудно. Иное положение с бактериофагами, так как инфекцию единичной клетки можно вызвать по желанию одной или несколькими частицами, и поэтому генетика бактериофагов привлекла к себе значительное внимание. Многие работы имеют прямое отношение к вопросу о состоянии фага внутри клетки и о механизме его размножения.

1) МУТАЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

У бактериофагов Т известны многие мутанты по морфологическим признакам, по свойству вызывать лизис и по способности инфицировать определенное число видов бактерий. Гершей [395] показал, что у фага T_2 эти мутанты могут возникать независимо один от другого и что некоторые из них представляют собою результат истинных обратимых одноступенчатых мутаций.

2) ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У БАКТЕРИОФАГОВ

Некоторые из наиболее интересных сведений о генетике бактериофагов получены путем изучения взаимодействия между частицами фага, которые размножаются одновременно в одной и той же клетке бактерии-хозяина. Если клетка инфицирована двумя фагами, очень сильно различающимися по их известным свойствам, например фагами T_1 и T_2 или T_1 и T_7, то оба фага адсорбируются на бактерии, но в потомстве обнаруживается только один тип [396]. Если же два фага близко родственны, оба могут расти в одной и той же клетке, и после распада последней получается смесь фагов обоих типов. Дельбрюк и Бейли [397] первые показали, что если два родственных фага различаются по двум генетическим признакам, то в потомстве, кроме родительских, встречаются также рекомбинированные типы. Так, например, если использовать мутанты *r* (быстрый лизис) и *h* (число инфицированных видов бактерий), то после одновременного инфицирования фагами T_2 *r. h.* и T_2^{++} (где + означает дикий тип) получаются частицы, среди которых, кроме родительских типов, присутствуют рекомбинанты T_2 *r.* +. и T_2+. *h.* Частоту получения рекомбинантов от различных скрещиваний между фагами T_2 тщательно исследовали Гершей и Ротман [398]. Среднее количество частиц обоих рекомбинантных типов в культуре бывает равным и постоянным по паре рассматриваемых признаков, поэтому результаты можно выразить в виде генетиче-

ских признаков, распределенных линейно по числу (по трем или более) соединенных групп. Однако при распаде индивидуальных клеток количественное соотношение четырех типов потомства от двухфакториального скрещивания значительно варьирует, и между любыми из них почти (или совсем) не имеется соответствия. Эти данные не совпадают с результатами простого кроссинговера (перекреста), известного у высших организмов, и также указывают на то, что обмен генами происходит только в поздней стадии размножения фага. Путем разрушения бактерий в различные отрезки времени латентного периода Доэрман [399, 400] показал, что среди находимых вначале активных частиц фага средние относительные количества рекомбинантов приблизительно такие же, как и в конечном потомстве. Поэтому рекомбинация, по-видимому, происходит или непосредственно перед образованием активных частиц, или одновременно с ним.

3) ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ У БАКТЕРИОФАГОВ

В нескольких случаях были найдены частицы фага с иными свойствами, чем можно было бы ожидать по их генотипу. Примером может служить анормальный тип частицы фага, полученный Новиком и Шилардом [401] при инфицировании штамма В *E. coli* смесями бактериофагов T_2 и T_4. Кроме нормальных частиц фагов T_2 и T_4, в потомстве встречаются частицы третьего типа. Они обладают такой же, как у фага T_4, специфичностью по отношению к хозяину, поскольку они способны размножаться в бактериях штамма В/2 *E. coli*, устойчивого к фагу T_2. Тем не менее все потомство фага, вышедшее из клеток бактерий В/2, состоит из нормальных частиц фага T_2, не способных расти в клетках штамма В/2. Таким образом, анормальные частицы ведут себя генетически как частицы фага T_2, а фенотипически (по адсорбционной специфичности)— как частицы фага T_4. Это является дополнительным доказательством того, что в частице фага существует генетическая часть, способная функционировать независимо от той части, которой определяется ее адсорбционная специфичность.

И. Лизогенные бактерии

В системах бактериофаг—хозяин типа фаг Т—*E. coli* не бывает равновесия между фагом и хозяином и инфицирование приводит к гибели клетки хозяина. Иной тип взаимоотношений наблюдается у бактерий лизогенных штаммов. Последние являются носителями фага, который освобождается от бактерий и переходит в окружающую среду во время своего роста. Хотя такой фаг и адсорбируется бактериями лизогенного штамма, но не действует на них и может быть обнаружен только по его способности вызывать лизис бакте-

рий чувствительных к нему штаммов, родственных лизогенному штамму.

Ношение фага бактериальной культурой (лизогенность) может быть результатом равновесия между бактерией и внешним фагом. В случае чувствительного к фагу штамма, отличающегося, однако, слабой адсорбцией или слишком большим латентным периодом развития в нем фага, или же в случае нормально устойчивого к данному фагу штамма фаг может размножаться в чувствительных к нему клетках, подвергаясь непрерывному ряду мутаций. Тогда система фаг—хозяин не отличалась бы существенно от уже описанных. Однако при истинной лизогенности этого не бывает. В результате исследований, особенно работ Барнета с сотрудниками [402, 403], ден Доорен де Йонга [404] и Львова и Гутмана [405], были установлены следующие характеристики лизогенности.

1) Каждая бактериальная клетка может дать начало лизогенной колонии. У спорулирующих форм фаги находятся в спорах и выдерживают любую обработку, после которой спора остается жизнеспособной.

2) Бактериальная культура остается лизогенной после удаления свободного фага отмыванием или обработкой антифаговой сывороткой. Замечено, что отдельные клетки при размножении через 19 делений не освобождаются от фага и по-прежнему остаются лизогенными.

3) У *Bacillus megatherium* фаг выделяется только после лизиса бактерий, когда из каждой распавшейся бактерии освобождаются около 90 частиц фага. Такой лизис, по-видимому, происходит у всех лизогенных штаммов, и наличие фага в культурах этих штаммов следует приписать лизису небольшой части клеток.

4) Искусственное разрушение бактериальных клеток различными способами, как правило, не приводит к освобождению бактериофагов.

Таким образом, лизогенная бактерия носит в себе нечто передаваемое потомству, что само по себе хотя и не идентично активной частице фага, но способно в определенных условиях дать начало фаговым частицам, и такое превращение приводит к лизису бактериальной клетки. Это «нечто» Львов назвал «пробактериофагом». Пробактериофаг ведет себя как наследственный признак бактерии, но равновесие между ним и остальной частью бактерии неустойчиво и под действием внешних условий может изменяться. Некоторые из этих условий можно регулировать. Равновесие может нарушиться, как это бывает, например, после ряда пассажей лизогенной *B. megatherium*, проводимых на синтетических средах, когда получается культура, утратившая свою лизогенность и ставшая чувствительной к тому фагу, носителем которого она была прежде. В других случаях бактериофаг может развиться в зрелые инфекционные частицы.

1) ЯВЛЕНИЕ ИНДУКЦИИ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ ФАГОВ В ЛИЗОГЕННЫХ БАКТЕРИЯХ

В культурах лизогенных бактерий небольшая и непостоянная часть клеток бактерий подвергается лизису, освобождая фаговые частицы, что, по-видимому, зависит от изменения некоторых факторов в среде, окружающей отдельные клетки. Для *B. megatherium* одним из этих факторов является парциальное давление кислорода. Львов с сотрудниками [380, 406, 407] нашел средства, которыми можно вызвать лизис и образование фага у всех клеток лизогенной культуры. К таким индуцирующим лизис средствам относятся облучение ультрафиолетовыми и рентгеновскими лучами и действие некоторых восстановителей (аскорбиновой кислоты, восстановленного глутатиона, тиогликолевой и тиояблочной кислот), способных в присутствии меди образовывать перекиси. Перекись водорода и некоторые органические перекиси также действуют как индуцирующие агенты. В общем существует тесная связь между способностью агента действовать в качестве мутагена или в качестве возбудителя образования фага в лизогенных бактериях. Каждый из этих агентов индуцирует образование фага только в определенных лизогенных штаммах. Если культуру лизогенного штамма *B. megatherium* 899 (1) [407a] в дрожжево-казеиновой среде облучить соответствующей дозой ультрафиолетовых лучей и оставить для дальнейшей инкубации в течение 50—80 мин. (в зависимости от условий роста), то каждая клетка разделится пополам и подвергнется лизису, освободив не менее 90 частиц фага. Аналогично обработанные бактерии нелизогенного штамма растут нормально, без лизиса. Способность ультрафиолетового облучения и других индуцирующих агентов вызывать образование фагов зависит от нескольких взаимосвязанных факторов: среды, в которой бактерии развивались перед облучением, дозы облучения и среды, в которую помещают бактерии после облучения. Переход от образования пробактериофагов к продуцированию бактериофагов тесно связан с изменениями баланса некоторых катионов, таких, как Cu, Co и Mn [408], которые могут быть непосредственной причиной индукции.

Неинфекциозная форма фага (пробактериофаг) в лизогенных бактериях имеет только поверхностное сходство с фагом в неинфекциозной стадии развития в чувствительных бактериях в течение первой половины латентного периода. Однако пробактериофаг в лизогенных бактериях может размножаться как таковой неограниченное время, не образуя фага. После инфекции фагом культуры чувствительных к нему бактерий большинство их подвергается лизису и лишь немногие остаются живыми. Одни из них представляют собой устойчивые мутанты, неспособные адсорбировать

фаг, другие же в некоторых случаях являются лизогенными бактериями. Факторы, которые определяют, будет ли данная бактерия подвергнута фагом лизису или станет лизогенной, не выяснены.

Львов [409] провел несколько интересных сравнений гибели бактериальной клетки при развитии пробактериофага в фаг и гибели, связанной с ненормальным синтезом без образования инфекциозных частиц. Львов и Симинович [410] описали лизогенный штамм *B. megatherium*, у которого после облучения ультрафиолетовыми лучами бактерии дважды делятся и подвергаются лизису, но в отличие от других лизогенных штаммов *B. megatherium* не выделяют в этих условиях никакого бактериофага. Оказалось, что свойство бактерии подвергаться лизису в этих условиях обусловлено ее фагом. Потеря пробактериофагом способности развиваться в фаг, вероятно, непосредственно связана с утратой бактериальными клетками после облучения способности синтезировать достаточное количество дезоксирибонуклеиновой кислоты [411]. Поведение лизогенных бактерий при облучении ультрафиолетовыми лучами во многом сходно с поведением некоторых штаммов *E. coli* и *Pseudomonas pyocyanea*. При облучении бактерии этих штаммов подвергаются лизису, освобождая вещества, которые считаются белковыми и обладают бактерицидными свойствами по отношению к родственным штаммам того же микроорганизма, но не действуют на родительский штамм [412, 412а]. Эти вещества не инфекциозны.

Явление существования вируса неинфекциозной формы внутри клетки-хозяина в продолжение многих поколений, вероятно, свойственно многим вирусам так же, как и фагам лизогенных бактерий. В настоящее время появляется все больше данных о том, что подобные «латентные» формы вируса могут быть и среди вирусов насекомых и, возможно, среди некоторых растительных вирусов [413].

К. Плазмагены и вирусы

Многие случаи, когда генетические признаки обусловливаются цитоплазматической наследственностью, заставили генетиков допустить возможность существования генов (плазмагенов), размножающихся автономно в цитоплазме, хотя их непрерывное существование и фенотипическое выражение, возможно, зависят от ядер. Вирус, вызывающий появление очевидных симптомов болезни, но не гибель своей бактерии-хозяина, и передаваемый хозяином своему потомству, но не как-либо иначе, очевидно, нельзя отличить от плазмагена. В действительности многие так называемые «плазмагены» оказались вирусами, и некоторые из них трудно передавать искусственным путем. Таким образом, можно с достаточной уверенностью сказать, что большинство данных, приведен-

ных в доказательство теории плазмагенного происхождения вирусов, в настоящее время вызывает сомнения.

В этом разделе обсуждаются наиболее важные случаи инфекций, которые приписывались действию эндогенных цитоплазматических факторов плазмагенной природы, и делаются попытки доказать, что причиной их является действие экзогенных паразитов.

1) РАСТИТЕЛЬНЫЕ ВИРУСЫ, ПРИНИМАВШИЕСЯ РАНЕЕ ЗА ПЛАЗМАГЕНЫ

В 1904 г. Баур [414] обнаружил, что пестроту листьев, которая встречается у отдельных представителей декоративного растения *Abutilon*, можно передать непестрым особям путем прививки. В течение многих лет это явление считалось исключительным, так как хотя агент, вызывающий пятнистость, обладает свойствами вируса, но он, по-видимому, лишен «естественных» путей распространения. (Здесь уместно будет упомянуть, что прививка представляет собой не только искусственный процесс, но и широко распространена в природе; она наблюдается на корнях и стеблях многих растений.) Однако недавно Орландо и Зильбершмидт [415] обнаружили, что в некоторых случаях пестроту листьев *Abutilon* может передавать белая муха, которая не встречается в Европе, где проводил свои работы Баур. Предполагается, что родоначальники исследованных им пестрых растений *Abutilon* были вывезены из Южной Америки, где они произрастают, уже зараженными этой вирусной болезнью.

Другой хорошо известной вирусной болезнью растений, которую приводят в качестве примера действия плазмагена, является скручивание листьев у растений картофеля сорта «король Эдуард VII». Этот сорт картофеля, насколько можно установить, был выведен из семян в конце прошлого столетия и появился на рынке в Англии в 1902 г. [416]. При исследованиях, которые проводились много лет спустя, оказалось, что все растения этого сорта заражены единственной в своем роде болезнью, которую растениям других сортов картофеля (и некоторым растениям из семейства пасленовых) можно передать только путем прививки. У растений одних сортов картофеля этот вирус возбуждает тяжелое заболевание, а у других сортов картофеля и у томата он не вызывает никаких симптомов болезни. По общему утверждению, сорт картофеля «король Эдуард VII» является также бессимптомным носителем названной болезни. Это утверждение совершенно необоснованно, так как неизвестно, видел ли кто-нибудь хотя бы одно здоровое растение этого сорта. Растения этого сорта картофеля обычно не дают цветов, а если и дают, то их пыльца бывает стерильной; однако в лабораторных условиях можно получить семена путем скрещивания с подходящим для этого сортом. Из таких семян

развиваются растения, не содержащие вируса, что едва ли совместимо с теорией плазмагена (через семена передаются очень немногие вирусы) [417]. По Дарлингтону, вирус скрученных листьев отличается от других вирусов тем, что растения картофеля сорта «король Эдуард VII» сами вырабатывают его [418, 419]. Однако недавно было обнаружено, что вирус скручивания листьев можно легко передавать путем инокулирования сока в соответствующих условиях [420]; таким образом, не осталось никаких доказательств, что этот вирус чем-либо отличается от большинства других растительных вирусов и что он возник в исходном растении-сеянце.

Совсем иную категорию вирусных заболеваний представляет пестрота листьев, которая спорадически встречается у растений многих видов (очень часто у клеверов и бобов) и на неопытный взгляд подобна некоторым из вирусных мозаик [421, 422]. Как правило, они не передаются путем прививки, но в некоторых случаях могут быть переданы через семя. В этих случаях сходство с вирусами только внешнее.

2) АНТИБИОТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ПАРАМЕЦИИ

Соннеборн [423] обнаружил, что некоторые (антибиотические) расы *Paramecium aurelia* выделяют вещество, известное под названием парамецина, которое убивает особей других (восприимчивых) рас *P. aurelia* и родственных им видов. В соответствующих условиях убивающие (антибиотические) особи могут конъюгировать с чувствительными, когда антибиотический фактор ведет себя, как если бы он наследовался цитоплазматически [424]; таким образом, только в том случае, если между соединяющимися особями происходит обмен цитоплазмы, чувствительный конъюгат дает начало антибиотическому клону. Цитоплазматический фактор, определяющий антибиотические свойства, известен под названием «каппа»-фактора. Его непрерывное существование в клетке зависит от наличия в ядре доминантного гена К в гомозиготной или гетерозиготной форме. Таким образом, все особи, лишенные «каппа»-частиц, являются чувствительными, но те из них, которые обладают доминантным геном К, при конъюгации с особями антибиотической расы могут дать начало антибиотическим особям, если с цитоплазмой будет передан «каппа»-фактор. Все расы, обладающие только рецессивным аллеломорфом К, являются чувствительными и никогда не становятся антибиотическими.

Скорость размножения «каппа»-фактора не всегда равняется скорости деления особи [425], и при разведении особей антибиотических рас в условиях быстрого деления число «каппа»-частиц на одну клетку уменьшается и может возникнуть лишенное «каппа»-фактора потомство, чувствительное к парамецину. Исходя из этих наблюдений, Прир [426] обнаружил, что в особи достаточно одной

«каппа»-частицы для всего антибиотического потомства, и вычислил, что в «сильной» антибиотической особи содержится не менее 450 «каппа»-частиц. Антибиотические особи можно превратить в чувствительные непродолжительным нагреванием при температуре 38,5°, при которой «каппа»-частицы инактивируются.

Природа «каппа»-частицы была в значительной степени выяснена, когда Прир [427] обнаружил, что в цитоплазме антибиотических рас *Paramecium* содержится множество телец, окрашивающихся по Фёльгену (400—1200 в особи «сильной» расы). Они имеют диаметр 0,2—0,8 μ и обладают различной формой. Доказательства их тождественности с «каппа»-частицами являются убедительными: 1) они отсутствуют в чувствительных особях; 2) при всех условиях число «каппа»-частиц на одну клетку приблизительно совпадает с числом телец, окрашивающихся по Фёльгену; 3) данные по инактивации «каппа»-частиц рентгеновским облучением показывают, что диаметр «каппа»-частицы равен 0,1—0,3 μ [428]. После обработки дезоксирибонуклеазой «каппа»-частицы уже не окрашиваются по Фёльгену, очевидно они содержат дезоксирибонуклеиновую кислоту.

«Каппа»-фактор может быть передан непосредственно [429], если подвергнуть чувствительные клетки генотипа К действию взвеси распавшихся антибиотических клеток; при этом немногие чувствительные клетки остаются живыми и дают начало антибиотическим клонам. Для единичной инфекции в таких условиях требуется около 10^6 «каппа»-частиц. Таким образом, «каппа»-частица ведет себя как вирус, и чувствительность хозяина определяется единичным доминантным геном К.

Парамецин, возможно, идентичен части «каппа»-частицы. Его можно также получить, разрушая антибиотические особи. Он инактивируется дезоксирибонуклеазой (но не в присутствии цитрата); рибонуклеаза на него не действует. Вследствие обратимого образования комплекса он инактивируется пепсином и химотрипсином, а также трипсином. Таким образом, парамецин, по-видимому, содержит белок и дезоксирибонуклеиновую кислоту. Он не диализирует через целлофан [430]. При температуре 7° и значениях pH 5—9,5 он устойчив в течение нескольких дней, но при более высоких температурах быстро инактивируется. Механизм его действия на чувствительные микроорганизмы *Paramecium* не известен; увеличения числа частиц парамецина при этом не обнаружено [431].

3) НАСЛЕДСТВЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ДРОЗОФИЛЫ К УГЛЕКИСЛОМУ ГАЗУ

Другим примером действия плазмагена, который, как впоследствии оказалось, обладает многими свойствами вируса, является наследственная чувствительность дрозофилы к CO_2. Л'Эритье и

Тессье обнаружили, что у всех мушек одной расы *Drosophila melanogaster*, находившихся в течение нескольких секунд в атмосфере чистого углекислого газа, наступал паралич, после чего они погибали [432]. Углекислый газ, по-видимому, действует на грудные двигательные нервы мушки. Однако обычных мушек можно было без вреда держать в атмосфере CO_2 в течение нескольких часов. Чувствительность к углекислому газу не наследуется по законам Менделя, а передается цитоплазматическим фактором, который был назван «геноидом». Наследование может осуществляться через сперматозоид или яйцо, но в то время как самка чувствительной расы при скрещивании с любым самцом дает только чувствительное потомство, скрещивание между самцом чувствительной расы и нормальной (устойчивой) самкой дает в потомстве как чувствительные, так и устойчивые особи. Чувствительных мушек можно исцелить, подвергнув их действию температуры 30—34°. Такое исцеление может быть временным или постоянным в зависимости от генетического происхождения и степени развития мушек; в некоторых случаях обработка мушек нагреванием может дать особи, неспособные передавать этот фактор своему потомству. Механизм исцеления мушек сложен и, по-видимому, зависит от различной степени чувствительности находящихся в разных тканях «геноидов» к повышенной температуре.

Чувствительность к углекислому газу может передаваться нормальным особям даже разных видов дрозофилы либо путем имплантации какого-нибудь органа от чувствительной особи, либо инъекцией гемолимфы или экстрактов из чувствительных мушек. Такая приобретенная чувствительность всегда наследуется самками. Попытки выделить агент из экстрактов от чувствительных мушек пока оказались безуспешными, хотя скорость седиментации при ультрацентрифугировании и данные по ультрафильтрованию наводят на мысль, что активность может быть связана с частицами вирусных размеров [433]. Из данных по инактивации рентгеновскими лучами следует, что диаметр такой частицы равен приблизительно 40 *мμ* [434].

Таким образом, чувствительность к углекислому газу у дрозофилы вызывает инфекциозная частица, которую можно считать вирусом, хотя неизвестен какой-либо другой естественный способ ее передачи, кроме наследственного. Замечательно, что она производит паталогическое действие на своего хозяина только в весьма необычных условиях, а именно в атмосфере CO_2.

ЛИТЕРАТУРА

1. «Die histochemischen und physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher», vol. 2, F.C.W. Vogel, Leipzig, 1897.
2. Miescher F., Hoppe-Seyler's med-chem. Untersuchungen, 4, 441, 1871; см. также [1], стр. 3.

3. Miescher F., Hoppe-Seyler's med-chem. Untersuchungen, **4**, 452, 1871; см. также [1], стр. 14.
4. Miescher F., Hoppe-Seyler's med-chem. Untersuchungen, **4**, 502, 1871; см. также [1], стр. 24.
5. Miescher F., Verhand. naturforsch. Ges. Basel, **6**, 138, 1894; см. также [1], стр. 55.
6. Altmann R., Arch. Anat. Physiol., **1889**, 524.
7. Kossel A., Z. physiol. Chem., **10**, 248, 1886.
8. Kossel A., Arch. Anat. Physiol., **1893**, 157.
9. Kossel A., Arch. Anat. Physiol., **1894**, 194.
10. Kossel A., Neumann A., Ber., **26**, 2753, 1894.
11. Ascoli A., Z. physiol. Chem., **31**, 161, 1900.
12. Osborne T. B., Harris I. F., Z. physiol. Chem., **36**, 85, 1902.
13. Levene P. A., Jacobs W. A., Ber., **42**, 3247, 1909.
14. Levene P. A., London E. S., J. Biol. Chem., **83**, 793, 1929.
15. Steudel H., Z. physiol. Chem., **49**, 406, 1906.
16. Levene P. A., Bass L. W., Nucleic Acids. Chemical Catalog Company, Inc., New York, 1931.
17. См. [16], стр. 263, табл. 18.
18. Makino K., Z. physiol. Chem., **236**, 201, 1935.
19. Signer R., Caspersson T., Hammarsten E., Nature, **141**, 122, 1938.
20. Gulland J. M., Barker G. R., Jordan D. O., Ann. Rev. Biochem., **14**, 175, 1945.
21. Wyatt G. R., Nature, **166**, 237, 1950.
22. Johnson T. B., Coghill R. D., J. Am. Chem. Soc., **47**, 2838, 1925.
23. Jones W., Perkins M. E., J. Biol. Chem., **62**, 291, 1924/1925.
24. Feulgen R., Rossenbeck H., Z. physiol. Chem., **135**, 203, 1924.
25. Feulgen R., Z. physiol. Chem., **92**, 154, 1914.
26. Kiesel A., Belozersky A., Z. physiol. Chem., **229**, 160, 1934.
27. Kiesel A., Schipitzina G., Z. physiol. Chem., **229**, 159, 1934.
28. Feulgen R., Behrens M., Mahdihassan S., Z. physiol. Chem., **246**, 203, 1937.
29. Caspersson T., Skand. Arch. Physiol., **73**, suppl. 8, 1936.
30. Fraenkel-Conrat H. L., Ward W. H., Snell N. S., Ducay E. D., J. Am. Chem. Soc., **72**, 3826, 1950.
31. Jones W., Nucleic Acids, 2nd ed., Longmans, Green & Co., London, 1920.
32. Dekker C. A., Elmore D. T., J. Chem. Soc., **1951**, 2864.
33. Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., **72**, 1466, 1950.
34. Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2811, 1950.
35. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 52.
36. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 552, 1952.
36a. Khym J. X., Doherty D. G., Volkin E., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1262, 1953.
37. Cohn W., Volkin E., Nature, **167**, 483, 1951.
38. Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem., **175**, 315, 1948.
39. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **176**, 703, 1948.
40. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **176**, 715, 1948.
41. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **45**, 294, 1949.
42. Smith J. D., Markham R., Biochem. J., **46**, 509, 1950.
43. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 584, 1951.
44. Holiday E. R., Johnson E. A., Nature, **163**, 216, 1949.
45. Cohn W. E., J. Cellular Comp. Physiol., **38**, Suppl., **1**, 21, 1951.
46. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 558, 1952.
47. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **49**, 401, 1952.
48. Marshak A., Vogel H. J., Federation Proc., **9**, 85, 1950.

49. Boulanger P., Montreuil J., Bull. soc. chim. biol., **33**, 784, 1951.
50. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J., **52**, 594, 1952.
51. Markham R., Smith J. D., Nature, **168**, 406, 1951.
52. Boulanger P., Montreuil J., Bull. soc. chim. biol., **33**, 791, 1951.
53. Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D., J. Biol. Chem., **186**, 51, 1950.
54. Deutsch A., Zuckerman R., Dunn M. S., Anal. Chem., **24**, 1769, 1952.
55. Marshak A., J. Biol. Chem., **189**, 607, 1951.
55a. Marshak A., Vogel H. J., J. Biol. Chem., **189**, 597, 1951.
56. Loring H. S., Fairley J. L., Seagram H. L., J. Biol. Chem., **197**, 823, 1952.
57. Harris R. J. C., Beale R. N., Roe E. M. F., J. Chem. Soc., **1950**, 1397.
58. Hamoir G., Biochem. J., **50**, 140, 1952.
59. Knight C. A., J. Biol. Chem., **197**, 241, 1952.
60. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **46**, 513, 1950.
61. Elmes P. C., Smith J. D., White J. C., Proc. 2nd Intern. Congr. Biochem., **1952**, 8.
62. Gold N. I., Sturgis S. H., J. Biol. Chem., **196**, 143, 1952.
63. Chargaff E., Zamenhof S., Green C., Nature, **165**, 756, 1950.
64. Chargaff E., Vischer E., Doniger R., Green C., Misani F., J. Biol. Chem., **177**, 405, 1949.
65. Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., **33**, 497, 1950.
66. Laland S. G., Overend W. G., Webb M., J. Chem. Soc., **1952**, 3224.
67. Smith J. D., Stoker M., Brit. J. Exptl. Path., **32**, 433, 1951.
68. Smith J. D., Wyatt G. R., Biochem. J., **49**, 144, 1951.
69. Vischer E., Zamenhof S., Chargaff E., J. Biol. Chem., **177**, 429, 1948.
70. Wyatt G. R., Cohen S. S., Nature, **170**, 846, 1952.
71. Brawerman G., Chargaff E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4052, 1951.
72. Jones W., Am J. Physiol., **52**, 203, 1920.
73. Kunitz M., J. Gen. Physiol., **24**, 15, 1940.
74. Bacher J. E., Allen F. W., J. Biol. Chem., **183**, 633, 1950.
75. Markham R., Smith J. D., Biochem J., **52**, 565, 1952.
76. Levene P. A., Harris S. A., J. Biol. Chem., **98**, 9, 1932.
77. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 44.
78. Brown D. M., Haynes L. J., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1950**, 3299.
79. Gulland J. M., J. Chem. Soc., **1938**, 1722.
80. Markham R., Smith J. D., Research (London), **4**, 344, 1951.
80a. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 2040.
80b. Whitfeld P. R., Markham R., Nature, **171**, 1151, 1953.
80c. Heppel L. A., Markham R., Hilmoe R. J., Nature, **171**, 1151, 1953.
81. Cohn W. E., Volkin E., Arch. Biochem. Biophys., **35**, 465, 1952.
82. Volkin E., Khym J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1533, 1951.
83. Levene P. A., Jacobs W. A., J. Biol. Chem., **12**, 411, 1912.
84. Smith J. D., Markham R., Biochim. Biophys. Acta, **8**, 350, 1952.
85. Sinsheimer R. L., Koerner J. F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 283, 1952.
86. Smith J. D., Markham R., Nature, **170**, 120, 1952.

87. Wilkins M. H. F., Gosling R. G., Seeds W. E., Nature, **167**, 759, 1951.
88. White J. C., Elmes P., Nature, **169**, 151, 1952.
89. Butler J. A. V., James W. F., Nature, **167**, 844, 1951.
90. Tennent H. G., Vilbrant C. F., J. Am. Chem. Soc., **65**, 424, 1943.
91. Watanabe I., Iso K., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4836, 1950.
92. Astbury W. T., Symposia Soc. Exptl. Biol., **1**, 66, 1947.
93. Chargaff E., Zamenhof S., J. Biol. Chem., **173**, 327, 1948.
94. Magasanik B., Chargaff E., Biochim. Biophys. Acta, **7**, 396, 1951.
95. Tsuboi K. K., Biochim. Biophys. Acta, **6**, 202, 1950.
96. Levene P. A., Simms H. S., J. Biol. Chem., **70**, 327, 1926.
97. Levene P. A., Simms H. S., J. Biol. Chem., **65**, 519, 1925.
98. Lee W. A., Peacocke A. R., J. Chem. Soc., **1951**, 3361.
99. Gulland J. M., Jordan D. O., Symposia Soc. Exptl. Biol., **1**, 56, 1947.
100. Bacher J. E., Allen F. W., J. Biol. Chem., **184**, 511, 1950.
101. Volkin E., Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1516, 1951.
102. Cohen S. S., Stanley W. M., J. Biol. Chem., **144**, 589, 1942.
103. Conway B. E., Gilbert L., Butler J. A. V., J. Chem. Soc., **1950**, 3421.
104. Например, Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O., Dibben H. E., J. Chem. Soc., **1944**, 30 и многие другие.
105. Astbury W. T., Bell F. O., Nature, 141, 747, 1938.
105a. Wilkin M. H. F., Stokes A. E., Wilson H. R., Nature, **171**, 738, 1953.
105b. Franklin R. E., Gosling R. G., Nature, **171**, 740, 1953.
105c. Chargaff E., Experientia, **6**, 201, 1950.
105d. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, **171**, 737, 1953.
105e. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, **171**, 964, 1953.
105f. Franklin R. E., Gosling R. G., Nature, **172**, 156, 1953.
106. Kossel A., The Protamines and Histones, Longmans, Green and Co., New York, 1928.
107. Kossel A., Z. physiol. Chem., **25**, 165, 1898.
108. Kossel A., Z. physiol. Chem., **8**, 511, 1884.
109. Lilienfeld L., Z. physiol. Chem., **18**, 473, 1894.
110. Halliburton W. D., J. physiol. (London), **13**, 806, 1892.
111. Hammarsten O., Z. physiol. Chem., **19**, 19, 1894.
112. Huiskamp W., Z. physiol. Chem., **32**, 145, 1901.
113. Bang I., Beitr. chem. Physiol. Path., **4**, 115, 1904.
114. Bang I., Beitr. chem. Physiol. Path., **4**, 362, 1904.
115. Greenstein J. P., Jenrette W. V., J. Natl. Cancer Inst., **1**, 91, 1940.
116. Mirsky A. E., Pollister A. W., J. Gen. Physiol., **30**, 117, 1946.
117. Bensley R. R., Anat. Record., **72**, 351, 1938.
118. Mirsky A. E., Pollister A. W., J. Gen. Physiol., **30**, 101, 1946.
119. Mavor M. E., Greco A. E., J. Biol. Chem., **181**, 861, 1949.
120. Stern K. G., Goldstein G., Wagman J., Schryver J., Federation Proc., **6**, 296, 1947.
121. Stern K. G., Goldstein G., Albaum H. G., J. Biol. Chem., **188**, 273, 1951.
122. Orgel G., Stern K. G., Federation Proc., **9**, 211, 1950.
123. Bang I., Z. physiol. Chem., **27**, 463, 1899.
124. Daly M. M., Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., **34**, 439, 1951.
125. Tristram G. R., Nature, **160**, 637, 1947.

126. Felix K., Mager A., Z. physiol. Chem., **249**, 124, 1937.
127. Felix K., Mager A., Z. physiol. Chem., **249**, 111, 1937.
128. Hultin T., Herne R., Arkiv Kemi Mineral. Geol., **26A**, No. 20, 1949.
129. Brunish R., Fairley D., Luck J. M., Nature, **168**, 82, 1951.
130. Hamer D., Nature, **167**, 40, 1951.
131. Tristram G. R., Advances in Protein Chem., **5**, 83, 1949.
132. Ackermann D., Z. physiol. Chem., **43**, 299, 1904.
133. Steudel H., Z. physiol. Chem., **90**, 291, 1914.
134. Stedman E., Stedman E., Nature, **152**, 267, 1943.
135. Stedman E., Stedman E., Nature, **152**, 556, 1943.
136. Stedman E., Stedman E., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **12**, 224, 1947.
137. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., **31**, 1, 1947.
138. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., **31**, 7, 1947.
139. Davidson J. N., Laurie R. A., Biochem. J., **43**, XXIX, 1948.
140. Felix K., Fischer H., Krekels A., Mohr R., Z. physiol. Chem., **287**, 224, 1951.
141. Felix K., Fischer H., Krekels A., Mohr R., Z. physiol. Chem., **289**, 10, 1951.
142. Steudel H., Z. physiol. Chem., **83**, 72, 1913.
142a. Riley D. P., Arndt U. W., Nature, **172**, 295, 1953.
143. Claude A., J. Exptl. Med., **84**, 51, 1946.
144. Claude A., J. Exptl. Med., **84**, 61, 1946.
145. Hogeboom G. H., Schneider W. C., Pallade G. E., J. Biol. Chem., **172**, 619, 1948.
146. Chantrenne H., Biochim. Biophys. Acta. **1**, 437, 1947.
147. Jeener R., Biochim. Biophys. Acta, **2**, 633, 1948.
148. Jeener R., Biochim. Biophys. Acta, **8**, 125, 1952.
149. Pirie N. W., Biochem. J., **47**, 614, 1950.
150. Szafarz D., Biochim. Biophys. Acta, **6**, 562, 1951.
151. Jeener R., Nature, **163**, 837, 1949.
152. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J., **52**, 599, 1952.
153. Hamoir G., Biochem. J., **48**, 146, 1951.
154. Kaufmann B. P., McDonald M. R., Gay H., J. Cellular Comp. Physiol., **38**, Suppl., **1**, 71, 1951.
155. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., **34**, 475, 1951.
156. Li C. F., Stacey M., Nature, **163**, 538, 1949.
157. Overend W. G., Stacey M., Nature, **163**, 538, 1949.
158. Brachet J., Arch. Biol. (Liége), **53**, 207, 1942.
159. Kurnick N. B., J. Gen. Physiol., **33**, 243, 1950.
160. Caspersson T., Cell Growth and Cell Function, W. W. Norton and Co., Inc., New York, 1950.
161. Glick D., Engstrom A., Malmstrom B. G., Science, **114**, 253, 1951.
162. Caspersson T., Schultz J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **26**, 507, 1940.
163. Fell H. B., Hughes A. F., Quart. J. Microscop. Sci., **90**, 355, 1949.
164. Brumberg E. M., Larionow L. T., Nature, **158**, 663, 1946.
165. Ris H., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., **32**, 489, 1948.
166. Brachet J., Compt. rend. soc. biol., **133**, 88, 1940.
167. Claude A., Potter J. S., J. Exptl. Med., **77**, 345, 1943.
168. Lamb W. G. P., Exptl. Cell. Research, **1**, 571, 1950.
169. Allfrey V., Stern H., Mirsky A. E., Saetren H., J. Gen. Physiol., **35**, 529, 1952.
170. Boivin A., Vendrely R., Vendrely C., Compt. rend., **226**, 1061, 1948.

171. Vendrely R., Vendrely C., Experientia, **4**, 436, 1948.
172. Vendrely R., Vendrely C., Experientia, **5**, 327, 1949.
173. Mirsky A. E., Ris H., Nature, **163**, 666, 1949.
174. Davidson J. N., Leslie I., Smellie R. M. S., Thomson R. Y., Biochem. J., **46**, xl, 1950.
174a. Mirsky A. E., Ris H., J. Gen. Physiol., **34**, 451, 1951.
175. Pollister A. W., Swift H., Alfert M., J. Cellular Comp. Physiol., **38**, Suppl., **1**, 101, 1951.
176. Ogur M., Erikson R. O., Rosen G. V., Sax K. B., Holden C., Exptl. Cell. Research, **2**, 73, 1951.
177. Hammarsten E., Hevesey G., Acta Physiol. Scand., **11**,335, 1946.
178. См. ссылку [55].
179. Avery O. T., McLeod C. M., McCarty M., J. Exptl. Med., **79**, 137, 1944.
180. McCarty M., Taylor H. E., Avery O. T., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **11**, 177, 1946.
181. McCarty M., Avery O. T., J. Exptl. Med., **83**, 89, 1946.
182. McCarty M., Avery O. T., J. Exptl. Med., **83**, 97, 1946.
183. Hotchkiss R. D., Colloq. intern. centre natl. recherche sci. (Paris), **8**, 57, 1949.
184. Boivin A., Vendrely R., Lehoult Y., Compt. rend. soc. biol., **139**, 1047, 1945.
185. Boivin A., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **12**, 7, 1947.
186. Taylor H. E., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **16**, 445, 1951.
187. Hotchkiss R. D., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **16**, 457, 1951.
188. McCarty M., J. Exptl. Med., **81**, 501, 1945.
189. Caspersson T., Schultz J., Nature, **143**, 602, 1939.
190. Caspersson T., Symposia Soc. Exptl. Biol., **1**, 127, 1947.
191. Brachet J., Ann. soc. roy. zool. Belge, **81**, 185, 1950.
192. Caldwell P. C., Mackor E. L., Hinshelwood C., J. Chem. Soc., 1950, 3151.
193. Jeener R., Biochim. Biophys. Acta, **8**, 270, 1952.
194. Swenson P. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **36**, 699, 1950.
195. Caspersson T., Schultz J., Nature, **142**, 294, 1938.
196. Callan H. G., Nature, **161**, 440, 1948.
197. Brachet J., Chantrenne H., Nature, **168**, 950, 1951.
198. Hultin T., Exptl. Cell Research, **1**, 376, 1950.
199. Lee N. D., Anderson J. T., Miller R. C., Williams R. H., J. Biol. Chem., **192**, 733, 1951.
200. Liret N., Brachet J., Biochim. Biophys. Acta, **7**, 607, 1951.
201. Jeener R., Szafarz D., Arch. Biochem., **26**, 54, 1950.
202. Barnum C. P., Huseby R. A., Arch. Biochem., **29**, 7, 1950.
203. Ивановский Д., Известия СПБ Имп. академии наук, **35**, 67, 1892; перепечатано на английском языке в Phytopathol. Classics, **7**, 27, 1942 (American Phytopathological Soc., Ithaca, New York).
204. Loeffler, Frosch, Centr. Bakt. Parasitenk., **23**, 371, 1898.
205. MacCallum W. G., Oppenheimer E. H., J. Am. Med. Assoc., **78**, 410, 1922.
206. Stanley W. M., Phytopathology, **26**, 305, 1936.
207. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **17**, 64, 193.
208. Best R. J., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., **14**, 1, 1936.
209. Schlesinger M., Biochem. Z., **264**, 6, 1933.
210. Schlesinger M., Biochem. Z., **273**, 306, 1934.
211. Schlesinger M., Nature, **138**, 508, 1936.

212. Bawden F. C., Pirie N. W., Proc. Roy. Soc. (London), **B123**, 274, 1937.
213. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **19**, 251, 1938.
214. Bergold G., Z. Naturforsch., **2b**, 122, 1947.
215. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **18**, 275, 1937.
216. Knight C. A., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3108, 1949.
217. Knight C. A., J. Biol. Chem., **171**, 297, 1949.
218. Gaw H. Z., Stanley W. M., J. Biol. Chem., **167**, 765, 1947.
219. Loring H. S., J. Gen. Physiol., **25**, 497, 1942.
220. Williams R. C., Steere R. L., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2057, 1951.
221. Bawden F. C., Pirie N. W., Bernal J. D., Fankuchen I., Nature, **138**, 1051, 1936.
222. Bernal J. D., Fankuchen I., J. Gen. Physiol., **25**, 111, 1941.
223. Bernal J. D., Fankuchen I., J. Gen. Physiol., **25**, 147, 1941.
224. Williams R. C., Biochim. Biophys. Acta, **8**, 227, 1952.
225. Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Seeds W. E., Oster G., Nature, **166**, 127, 1950.
226. Lauffer M. A., J. Am. Chem. Soc., **66**, 1195, 1944.
227. Neurath H., Saum A. M., J. Biol. Chem., **126**, 435, 1938.
228. Lauffer M. A., J. Am. Chem. Soc., **66**, 1188, 1944.
229. Oster G., Doty P. M., Zimm B. H., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1193, 1947.
230. Williams R. C., Backus R., Steere R. L., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2062, 1951.
231. Lauffer M. A., J. Biol. Chem., **151**, 627, 1943.
232. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **19**, 66, 1938.
233. Matthews R. E. F., Ann. Applied Biol., **36**, 460, 1949.
234. Spooner E. T. C., Bawden F. C., Brit. J. Exptl. Path., **16**, 218, 1935.
235. Stanley W. M., J. Biol. Chem., **135**, 437, 1940.
236. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **19**, 251, 1938.
237. Lauffer M. A., J. Biol. Chem., **143**, 99, 1942.
238. Oster G., Science, **103**, 306, 1946.
239. Lauffer M. A., Stanley W. M., J. Biol. Chem., **135**, 463, 1940.
240. Neurath H., Cooper G. R., J. Biol. Chem., **135**, 455, 1940.
241. Carlisle C. H., Dornberger K., Acta Cryst., **1**, 194, 1948.
242. Markham R., Smith K. M., Lea D., Parasitology, **34**, 315, 1942.
243. Cohen S. S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **51**, 104, 1942.
244. Markham R., Smith K. M., Parasitology, **39**, 330, 1949.
245. Markham R., Discussion Faraday Soc., No. 11, 221, 1951.
246. Bernal J. D., Carlisle C. H., Nature, **162**, 139, 1948.
247. Bernal J. D., Carlisle C. H., Discussion Faraday Soc., No. 11, 227, 1951.
248. Cosslett V. E., Markham R., Nature, **161**, 250, 1948.
249. Markham R., Matthews R. E. F., Smith K. M., Nature, **162**, 88, 1948.
250. Price W. C., Am. J. Botany, **33**, 45, 1945.
251. Miller G. L., Price W. C., Arch. Biochem., **10**, 467, 1946.
252. Leonard B. R., Andregg J. W., Kaesberg P., Schulman S., Beeman W. W., J. Chem. Phys., **19**, 793, 1951.
253. Price W. C., Wyckoff R. W. G., Nature, **157**, 764, 1946.
254. Miller G. L., Price W. C., Arch. Biochem., **11**, 337, 1946.
255. Smith K. M., Bald J. G., Parasitology, **27**, 231, 1935.
256. Bawden F. C., van der Want J. P. H., Tijdschr. Plantenziekten, **55**, 142, 1949.
257. Kassanis B., Ann. Applied Biol., **36**, 14, 1949.
258. Bawden F. C., Kassanis B., Ann. Applied Biol., **34**, 127, 1947.

259. Noordam D., Thung T. H., van der Want J. P. H., Tijdschr. Plantenziekten, **57**, 1, 1951.
260. Pirie N. W., Smith K. M., Spooner E. T. C., McClement W. D., Parasitologi, **30**, 543, 1938.
261. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **23**, 314, 1942.
262. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **26**, 277, 1945.
263. Bawden F. C., Pirie N. W., J. Gen. Microbiol., **4**, 464, 1950.
264. Markham R., Smith K. M., Wyckoff R. W. G., Nature, **161**, 760, 1948.
265. Crowfoot D., Schmidt G. M. S., Nature, **155**, 504, 1945.
266. Stanley W. M., J. Biol. Chem., **129**, 405, 1939.
267. Ross A. F., Phytopathology, **31**, 394, 1941.
268. Lauffer M. A., Ross A. F., J. Am. Chem. Soc., **62**, 3296, 1940.
269. Bawden F. C., Chaudhuri R. P., Kassanis B., Ann. Applied Biol., **38**, 774, 1951.
270. Bawden F. C., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **20**, 322, 1939.
271. Black L. M., Brakke M. K., Wyckoff R. W. G., Am. J. Botany, **38**, 332, 1951.
272. Ledingham J. C. G., Lancet, **2**, 525, 1931.
273. Craigie J., Brit. J. Exptl. Path., **13**, 259, 1932.
274. Smadel J. E., Rivers T. M., Pickels E. G., J. Exptl. Med., **70**, 379, 1939.
275. Hoagland C. L., Smadel J. E., Rivers T. M., J. Exptl. Med., **71**, 737, 1940.
276. Hoagland C. L., Lavin G. I., Smadel J. E., Rivers T. M., J. Exptl. Med., **72**, 139, 1940.
277. Hoagland C. L., Ward S. M., Smadel J. E., Rivers T. M., J. Exptl. Med., **74**, 69, 1941.
278. Hoagland C. L., Ward S. M., Smadel J. E., Rivers T. M., J. Exptl. Med., **74**, 133, 1941.
279. Hoagland C. L., Ward S. M., Smadel J. E., Rivers T. M., J. Exptl. Med., **76**, 163, 1942.
280. Green R. H., Anderson T. F., Smadel J. E., J. Exptl. Med., **75**, 651, 1942.
281. Dawson I. M., McFarlane A. S., Nature, **161**, 464, 1948.
282. Smadel J. E., Rivers T. M., Hoagland C. L., Arch. Path., **34**, 275, 1942.
283. Stanley W. M., J. Exptl. Med., **81**, 193, 1945.
284. Stanley W. M., Lauffer M. A., J. Phys. Coll. Chem., **51**, 148, 1947.
285. Stanley W. M., J. Exptl. Med., **79**, 255, 1944.
286. Knight C. A., J. Exptl. Med., **80**, 83, 1944.
287. Knight C. A., J. Exptl. Med., **83**, 281, 1946.
288. Lauffer M. A., Stanley W. M., J. Exptl. Med., **80**, 531, 1944.
289. Elford W. J., Andrewes C. H., Tang F. F., Brit. J. Exptl. Path., **17**, 53, 1936.
290. Lauffer M. A., Miller G. L., J. Exptl. Med., **80**, 521, 1944.
291. Mosley V. M., Wyckoff R. W. G., Nature, **157**, 263, 1946.
292. Miller G. L., Lauffer M. A., Stanley W. M., J. Exptl. Med., **80**, 549, 1944.
293. Knight C. A., J. Exptl. Med., **85**, 99, 1947.
294. Knight C. A., J. Exptl. Med., **86**, 125, 1947.
295. Burnet F. M., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., **26**, 389, 1948.
296. Burnet F. M., Lancet, **1**, 7, 1948.
297. Burnet F. M., McCrea J. F., Stone J. D., Brit. J. Exptl. Path., **27**, 228, 1946.

298. Von Magnus P., Acta Path. Microbiol. Scand., **28**, 278, 1951.
299. Von Magnus P., Gard S., Svedmyr A., Proc. 4th Intern. Congr. Microbiol., **1949**, 301.
300. Hoyle L., J. Hyg., **50**, 229, 1952.
301. Beard J. W., Bryan W. R., Wyckoff R. W. G., J. Infectious Diseases, **65**, 43, 1939.
302. Taylor A. R., Beard D., Sharp D. G., Beard J. W., J. Infectious Diseases, **71**, 110, 1942.
303. Neurath H., Cooper G. R., Sharp D. G., Taylor A. R., Beard D., Beard J. W., J. Biol. Chem., **140**, 293, 1941.
304. Sharp D. G., Taylor A. R., Beard D., Beard J. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **50**, 205, 1942.
305. Sharp D. G., Taylor A. R., Beard J. W., J. Biol. Chem., **163**, 289, 1946.
306. Sharp D. G., Taylor A. R., Beard D., Finkelstein H., Beard J. W., Science, **92**, 359, 1940.
307. Taylor A. R., Sharp D. G., Beard D., Finkelstein H., Beard J. W., J. Infectious Diseases, **69**, 224, 1941.
308. Glaser R. W., Stanley W. M., J. Exptl. Med., **77**, 451, 1943.
309. Bergold G., Can. J. Research, **28**, 5, 1950.
310. Smith K. M., Wyckoff R. W. G., Research (London), **4**, 148, 1951.
311. Bergold G., Z. Naturforsch., **3b**, 338, 1948.
312. Wyatt G. R., J. Gen. Physiol., **36**, 201, 1952.
313. Twort F. W., Lancet, **2**, 1241, 1915.
314. D'Herelle F., Compt. rend., **165**, 373, 1917.
315. D'Herelle F., The Bacteriophage (translated by G. H. Smith), Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1922.
316. Bordet J., Ciuca M., Compt. rend. soc. biol., **86**, 1293, 1922.
317. Lisbonne M., Carrère M., Compt. rend. soc. biol., **86**, 569, 1922.
318. Bordet J., Renaux E., Ann. Inst. Pasteur, **42**, 1283, 1928.
319. Demerec M., Fano U., Genetics, **30**, 119, 1945.
320. Delbrück M., Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., **21**, 30, 1946.
321. Anderson T. F., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **11**, 1, 1946.
322. Luria S. E., Delbrück M., Anderson T. F., J. Bact., **46**, 57, 1943.
323. Baylor M. R. B., Severens J.M., Clark G. L., J. Bact., **47**, 277, 1944.
324. Woodruff H. B., Nunheimer T. D., Lee S. B., J. Bact., **54**, 535, 1947.
325. Putnam F. W., J. Biol. Chem., **190**, 61, 1951.
326. Parmelee C. M., Carr P. H., Nelson F. E., J. Bact., **57**, 389, 1949.
327. Kerby G. P., Gowdy R. A., Dillon E. S., Dillon M. L., Csáky T. Z., Sharp D. G., Beard J. W., J. Immunol., **63**, 93, 1949.
328. McLauchlan T. A., Clark E. M., Boswell F. W., Nature, **160**, 755, 1947.
329. Hook A. E., Beard D., Taylor A. R., Sharp D. G., Beard J. W., J. Biol. Chem., **165**, 241, 1946.
330. Sharp D. G., Hook A. E., Taylor A. R., Beard D., Beard J. W., J. Biol. Chem., **165**, 259, 1946.
331. Putnam F. W., Kozloff L. M., Neil J. C., J. Biol. Chem., **179**, 303, 1949.
332. Wyckoff R. W. G., J. Gen. Physiol., **21**, 367, 1938.
333. Putnam F. W., Science, **111**, 481, 1950.

334. Polson A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 67, 294, 1948.
335. Taylor A. R., J. Biol. Chem., 165, 271, 1946.
336. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., 21, 335, 1938.
337. Krueger A. P., J. Gen. Physiol., 13, 557, 1930.
338. Ellis E. L., Delbrück M., J. Gen. Physiol., 22, 365, 1939.
339. Hershey A. D., Kalmanson G., Bronfenbrenner J., J. Immunol., 46, 267, 1943.
340. Cohen S. S., Anderson T. F., J. Exptl. Med., 84, 511, 1946.
341. Herriott R. M., Barlow J. L., J. Gen. Physiol., 36, 17, 1952.
342. Cohen S. S., Arbogast R., J. Exptl. Med., 91, 607, 1950.
343. Maaløe O., Watson J. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 37, 507, 1951.
344. Ruska H., Ergeb. Hyg. Bakt. Immunitätsforsch. Exptl. Therap., 25, 437, 1943.
345. Luria S. E., Williams R. C., Backus R. C., J. Bact., 61, 179, 1951.
346. Anderson T. F., J. Appl. Phys., 21, 70, 1950.
346a. Anderson T. F., Rappaport C., Muscatine N. A., Ann. inst. Pasteur, 84, 5, 1953.
347. Adams M. H., J. Gen. Physiol., 32, 579, 1948.
348. Kalmanson G., Bronfenbrenner J., J. Gen. Physiol., 23, 203, 1939.
349. Hershey A. D., Kimura F., Bronfenbrenner J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 64, 7, 1947.
350. Polson A., Shepard C. C., Biochim. Biophys. Acta, 3, 137, 1949.
351. Polson A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 67, 294, 1948.
352. Kozloff L. M., Putnam F. W., J. Biol. Chem., 182, 229, 1950.
353. Csáky T. Z., Beard D., Dillon E. S., Beard J. W., J. Biol. Chem., 185, 311, 1950.
353a. Schmidt G., Thannhauser S. J., J. Biol. Chem., 161, 83, 1945.
354. Hershey A. D., Chase M., J. Gen. Physiol., 36, 39, 1952.
355. Cohen S. S., J. Biol. Chem., 166, 393, 1946.
356. Wyatt G. R., Cohen S. S., Nature, 170, 1072, 1952.
357. Marshak A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 37, 299, 1951.
358. Polson A., Wyckoff R. W. G., Science, 108, 501, 1938.
359. Delbrück M., J. Bact., 50, 131, 1945.
360. Price W. H., J. Gen. Physiol., 32, 203, 1948.
361. Luria S. E., Human M. L., J. Bact., 59, 551, 1950.
362. Anderson T. F., Am. Naturalist, 86, 91, 1952.
363. Luria S. E., Delbrück M., Arch. Biochem., 1, 207, 1942.
364. Watson J. D., J. Bact., 60, 697, 1950.
365. Smoluchowsky M., Z. physik Chem., 92, 140, 1917.
366. Schlesinger M., Z. Hyg. Infektionskrankh., 114, 136, 1933.
367. Schlesinger M., Z. Hyg. Infektionskrankh., 114, 149, 1933.
368. Burnet F. M., Biol., Revs., Cambridge Phil. Soc., 9, 332, 1934.
369. Anderson T. F., J. Cellular Comp. Physiol., 25, 1, 1945.
370. Anderson T. F., in Kidd J. G., ed., The Pathogenesis and Pathology of Viral Diseases, Columbia Univ. Press, New York, 1950.
371. Delbrück M., J. Bact., 56, 1, 1948.
372. Anderson T. F., J. Bact., 55, 637, 1948.
373. Wollman E. L., Stent G. S., Biochim. Biophys. Acta, 6, 292, 1950.
374. Stent G. S., Wollman E. L., Biochim. Biophys. Acta, 6, 307, 1950.
375. Stent G. S., Wollman E. L., Biochim. Biophys. Acta, 6, 374, 1950.
376. Puck T. T., Garen A., Cline J., J. Exptl. Med., 93, 65, 1951.

377. Garen A., Puck T. T., J. Exptl. Med., 94, 177, 1951.
378. Delbrück M., J. Gen. Physiol., 23, 643, 1940.
379. Anderson T. F., in Miles A. A., Pirie N. W., eds., Nature of the Bacterial Surface, Oxford, England, 1949.
380. Lwoff A., Siminovitch L., Kjelgaard N., Ann. inst. Pasteur, 79, 815, 1950.
381. Jacob F., Compt. rend., 231, 1585, 1950.
382. Monod J., Wollman E., Ann. inst. Pasteur, 73, 937, 1947.
383. Jacob F., Compt. rend., 232, 1780, 1951.
384. Cohen S. S., J. Biol. Chem., 174, 281, 1948.
385. Cohen S. S., J. Biol. Chem., 174, 295, 1948.
386. Kozloff L. M., Putnam F. W., Evans E. A., in Delbrück M., ed., Viruses, California Institute of Technology, Pasadena, 1950.
387. Doermann A. H., Carnegie Inst. Wash. Yearbook, 47, 176, 1948.
388. Doermann A. H., Carnegie Inst. Wash. Yearbook, 48, 170, 1949.
389. Cohen S. S., Bact. Revs., 13, 1, 1949.
390. Foster R. A. C., J. Bact. 56, 795, 1948.
391. Luria S. E., in Fildes P. and van Heyninger W. E. eds., The Nature of Virus Multiplication, Univ. Press, Cambridge, 1953.
392. de Mars R. I., Luria S. E., Fisher H., Levinthal C., Ann. inst. Pasteur, 84, 113, 1953.
393. Watson J. D., Maaløe O., Biochim. Biophys. Acta, 10, 432, 1953.
394. Hershey A. D., Kamen M. D., Kennedy J. W., Gest H., J. Gen. Physiol., 34, 305, 1951.
395. Hershey A. D., Genetics, 31, 620, 1946.
396. Delbrück M., Luria S. E., Arch. Biochem., 1, 111, 1942.
397. Delbrück M., Bailey W. T., Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol., 11, 33, 1946.
398. Hershey A. D., Rotman R., Genetics, 34, 44, 1949.
399. Doermann A. H., Federation Proc., 10, 591, 1950.
400. Doermann A. H., Dissoway C. F. R., Carnegie Inst. Wash. Yearbook, 48, 170, 1949.
401. Novick A., Szilard L., Science, 113, 34, 1951.
402. Burnet F. M., McKie M., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 6, 21, 1929.
403. Burnet F. M., McKie M., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 6, 277, 1929.
404. Den Dooren de Jong L. E., Zentr. Bakt. Parasitenk., 120, 1, 1931.
405. Lwoff A., Gutmann A., Ann. isnt. Pasteur, 78, 711, 1950.
406. Lwoff A., Siminovitch L., Compt. rend., 232, 1146, 1951.
407. Lwoff A., Jacob F., Compt. rend., 234, 2308, 1952.
408. Lwoff A., Compt. rend., 234, 366, 1952.
409. Lwoff A., in Fildes P. and van Heyningen W.E., ed., The Nature of Virus Multiplication, Unov. Press., Cambridge, 1953.
410. Lwoff A., Siminovitch L., Compt. rend., 233, 1397, 1951.
411. Siminovitch L., Compt. rend., 233, 1694, 1951.
412. Jacob F., Siminovitch L., Wollman E., Compt. rend., 233, 1500, 1951.
412a. Jacob F., Siminovitch L., Wollman E., Ann. Inst. Pasteur, 83, 295, 1952.
413. Smith K. M., Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., 27, 347, 1952.
414. Baur E., Ber. deut. botan Ges., 22, 453, 1904; Phytopathol. Classics, 7, 55, 1942 (American Phytopathological Society, Ithaca, New York).
415. Orlando A., Silberschmidt K., Arquiv. inst. biol. (São Paulo), 17, 1, 1946.

416. Salaman R. L. N., Potato Varieties, Cambridge Univ. Press, England, 1926.
417. Carson G. P., Howard H. W., Markham R., Smith K. M., Nature, **154**, 334, 1944.
418. Darlington C. D., Nature, **154**, 164, 1944.
419. Darlington C. D., Nature, **154**, 489, 1944.
420. Bawden F. C., Kassanis B., Nixon H. L., J. Gen. Microbiol., **4**, 210, 1950.
421. Woods M. M., du Buy H. G., Phytopathology, **33**, 637, 1943.
422. Woods M. M., du Buy H. G., J. Natl. Cancer Inst., **11**, 1105, 1951.
423. Sonneborn T. M., Am. Naturalist, **73**, 390, 1939.
424. Sonneborn T. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **29**, 329, 1943.
425. Sonneborn T. M., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **11**, 236, 1946.
426. Preer J. R., Genetics, **33**, 349, 1948.
427. Preer J. R., Genetics, **35**, 344, 1950.
428. Preer J. R., Am. Naturalist, **82**, 35, 1948.
429. Sonneborn T. M., Am. Naturalist, **82**, 26, 1948.
430. Van Wagtendonk W. J., J. Biol. Chem., **173**, 691, 1948.
431. Van Wagtendonk W. J., Zill L. P., J. Biol. Chem., **171**, 595, 1947.
432. l'Héretier Ph., Heredity, **2**, 325, 1948.
433. Hugon de Scoeux F., Rev. can. biol., **11**, 1, 1952.
434. l'Héretier Ph., Plus N., Compt. rend., **231**, 192, 1950.

III

БЕЛКИ СЕМЯН

С. Брохульт и *Э. Сандегрен*

S. Brohult and E. Sandegren, «Seed Proteins»
(vol. II, part A, pp. 487—512)

1. ВВЕДЕНИЕ

Новые растительные особи возникают из спор и семян. Белки спор исследованы очень мало, но значительное число работ посвящено изучению белков семян, особенно семян культурных растений. Эта глава, как следует из ее названия, посвящена только белкам семян.

Исследование белков семян начато в 1745 г. Беккари, который выделил из пшеничной муки клейковину. Заметные успехи в этом направлении были достигнуты такими исследователями, как Браконно, Буссенго, Хартиг, Машке, хотя первые серьезные и систематические исследования белков семян провел Риттхаузен (с 1862 г.), работу которого продолжил в США Осборн (с 1891 г.). Многие глобулины семян легко кристаллизуются и они были одними из первых белков, выделенных таким путем. В 1855 г. Хартиг обнаружил, что в бразильском орехе большое количество запасного белка (эксцельсина) фактически находится в форме кристаллов *in situ*, а спустя три года Машке получил экстрагированный белок в виде ромбоэдров. Обзор этих ранних исследований и соответствующей литературы можно найти в классической монографии Осборна [1]. Сам Осборн кратко охарактеризовал свою работу и исследования Риттхаузена следующим образом:

«Усилия Риттхаузена в значительной мере были направлены к тому, чтобы попытаться установить тождественность белков, получаемых из семян различных видов, и он, по-видимому, руководствовался той идеей, что в природе существует сравнительно небольшое число растительных белков. Автор же настоящей работы (Осборн), сознавая, что тождественность таких сложных химических соединений, как белки, нельзя доказать каким-либо из применявшихся в то время методов, направил свои усилия к тому, чтобы установить характерные различия между белками из разных растений. Таким образом, вскоре стало очевидным, что почти все белки из семян разных видов растений, которые Риттхаузен

считал идентичными, в действительности не одинаковы, и дальнейшее исследование показало, что нет таких двух разных видов семян, между белками которых нельзя было бы обнаружить химических различий, за исключением семян весьма близкородственных растений».

Классическая работа Осборна о растительных белках до сих пор имеет большое значение для исследователей, работающих в этой области. Однако за последние двадцать лет были значительно усовершенствованы методы выделения и особенно методы определения белков; в частности быстро развивались физико-химические методы, такие, как электрофорез и хроматографический анализ. Поэтому в настоящее время имеются гораздо большие возможности изолирования и определения белков семян, чем прежде.

За немногими исключениями, до сих пор исследовались семена высших цветковых (покрытосеменных) растений и только очень немногие семена голосеменных растений. Покрытосеменные растения в ботанике делятся на две главные группы: однодольные и двудольные. У первых семена обладают одним органом накопления запасных питательных веществ—эндоспермом, и зародыш находится около той части, где зерно прикреплено к колосу. У двудольных растений запасные белки накапливаются в семядолях и эндосперме, который окружает весь зародыш. Для многих двудольных (например, Leguminosae) характерно почти полное отсутствие эндосперма, у других же видов их (например, у Solanaceae) он развит очень хорошо.

При экстрагировании белка из семени получается смесь белков, происходящих как из эндосперма, так и из зародыша. Вследствие трудностей отделения последнего от остальной части семени белки зародыша и эндосперма исследовали раздельно лишь в немногих случаях (например, у пшеницы и ячменя). Белки из семян многих двудольных растений можно считать фактически белками зародыша, так как у этих семян эндосперм почти отсутствует.

Здесь невозможно упомянуть о всех опубликованных работах в этой области, поэтому читателям рекомендуется несколько обзоров литературы [1—5, 8, 9], в которых содержится ценная библиография по данному вопросу.

2. ЭКСТРАГИРОВАНИЕ

Одной из главных трудностей при исследовании белков семян является их экстрагирование [8, 9]. Белки находятся в семени вместе с такими соединениями, как крахмал и липиды. В семени имеются также комплексы белков с небелковыми веществами. Идеальный растворитель должен переводить все белки в истинный раствор, где они должны находиться в молекулярно-дисперсном состоянии, не изменяя первоначальной массы и структуры белко-

вого комплекса. Однако эти условия не выполняются при применении одного растворителя, пригодного только для белков. Весь белковый материал семени можно растворить, применяя такие сильно действующие средства, как экстрагирование кислотами или щелочами, но при этом первоначальная структура белков подвергается глубоким изменениям. При экстрагировании обычно используют целый ряд растворителей, подобранных так, чтобы успешно перевести в раствор главные группы белков, наличие которых предполагается в семенах.

При изучении белков семян широко применялись следующие растворители: вода, солевые растворы, 70-процентный этиловый спирт, разбавленная щелочь (или кислота). Осборн [1] классифицировал растительные белки по их отношению к этим четырем видам растворителей. Альбумины растворяются в воде, глобулины—в солевых растворах, проламины—в 70-процентном спирте, глютелины—в щелочи. Современными методами, особенно физико-химическими, установлено, что эти четыре белковые фракции являются смесями многих компонентов, так что их нельзя считать индивидуальными химическими соединениями.

Альбумины и глобулины сначала экстрагируют солевым раствором, а затем разделяют каким-нибудь подходящим способом (например, диализом или высаливанием). Альбуминовая и глобулиновая фракции, взятые вместе, составляют растворимый в солевом растворе белок.

Вышеуказанная классификация белков произвольна. Воспроизводимые результаты получаются только в строго контролируемых условиях, так как количество растворимого в солевом растворе белка зависит от концентрации и природы соли, от температуры и pH.

Кроме вышеупомянутых растворителей, применялось множество других, особенно для экстрагирования проламинов и глютелинов; чаще всего это мочевина, глицерин, детергенты (такие, как додецилсульфат и алкиларилсульфонат) и салицилат натрия [10—12]. Когда применяются детергенты или салицилат натрия, белок, растворяясь, не переходит полностью в молекулярно-дисперсное состояние. Получаемая жидкость является одновременно и «грубой дисперсией» и истинным раствором.

Из семян масличных культур липиды обычно экстрагируются раньше белков. Во избежание денатурации белков экстрагирование липидов, как правило, следует производить при низкой температуре. Для экстрагирования используют органические растворители, такие, как эфир и углеводороды; неполярные углеводороды оказываются наиболее подходящими, если после экстрагирования нужно исследовать белковое вещество [13]. Растворимость белков семян сильно зависит от наличия в них липидов, например растворимость пшеничной клейковины сильно повышается, если ее вымы-

ванию из семян предшествовало экстрагирование липидов [14—16].

На экстрагирование заметно влияет присутствие восстанавливающих веществ [11, 17]. Так, добавление гидросульфита увеличивает на 20% количество белка, которое можно экстрагировать из семян подсолнечника. Это можно объяснить тем, что восстановитель предотвращает образование дисульфидных групп.

3. ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЕМЯН

А. Химический анализ

Прежде одним из самых обычных методов характеристики белков семян было определение их элементарного состава, особенно содержания азота. Опубликовано множество данных, полученных в результате таких определений [17, 18]. Некоторые из них приведены в табл. 16. Однако элементарный анализ очень часто производили на объектах, которые, согласно данным, полученным новейшими методами исследования, представляют собою смеси веществ. Большинство белков семян содержат относительно много азота по сравнению с животными белками. В общем элементарный состав белков различных видов семян настолько мало варьирует, что для его установления необходимы весьма точные анализы, хотя даже и в этом случае элементарный анализ сам по себе нельзя считать достаточным средством для характеристики белков.

Значительную ценность должно представлять знание природы и содержания аминокислот, из которых строится белковая молекула. В определении аминокислотного состава значительные успехи были достигнуты в результате применения хроматографического анализа.

Таблица 16

ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ СОСТАВ (в %) НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН (ПО ОСБОРНУ [1])

Растительные белки	C	H	N	S
Амандин (миндаль) . .	51,30	6,90	18,90	0,43
Эдестин (конопля) . . .	51,36	7,01	18,65	0,88
Эксцельсин (бразильский орех)	52,18	6,92	18,30	1,09
Легумин (горох)	51,72	6,95	18,04	0,39
Глиадин (пшеница) . .	52,72	6,86	17,66	1,03
Гордеин (ячмень) . . .	54,29	6,80	17,21	0,85

(см. т. I, гл. III). В настоящее время можно определять полный аминокислотный состав белков, но, к сожалению, до сих пор было произведено очень мало такого рода анализов на хорошо очищенных белках семян. В ближайшем будущем посредством хроматографического анализа, несомненно, будут получены данные, которые позволят в значительной степени расширить наши знания о белках семян.

Б. Физико-химические методы анализа

За последние три десятилетия были значительно усовершенствованы методы изучения высокомолекулярных соединений. Наиболее важными из этих методов являются электрофорез, седиментационный и диффузионный методы анализа, рентгеновский анализ, определение осмотического давления, рассеяния света и вязкости. Электрофорез и седиментация оказались особенно эффективными методами исследования белков семян, так как эти методы дают ценные сведения о монодисперсности или гетерогенности раствора.

С физико-химической точки зрения белковые фракции семян являются сложными системами даже в тех случаях, когда бо́льшая часть небелковых соединений удалена. Существует отчетливо выраженное различие между глобулиновой и альбуминовой фракциями, с одной стороны, и проламиновой и глютелиновой—с другой. Первые две фракции состоят из монодисперсных белков и полидисперсных соединений, а две последние фракции полностью полидисперсны. Это различие можно отчасти объяснить тем, что применялись разные методы экстрагирования. Глобулины и альбумины экстрагируются пригодными для белков растворителями, тогда как проламины и глютелины экстрагируются такими растворителями, которые могут их дезагрегировать или вызывать другие структурные изменения.

Седиментационный анализ впервые был применен к некоторым глобулинам семян двудольных растений, которые сравнительно легко изолировать и получить в кристаллической форме. Оказалось, что эти белки в ультрацентрифуге ведут себя как гомогенные соединения [19]. Однако гомогенность частиц по весу не обязательно означает химическую гомогенность. Бейли [20] установил, что кристаллический эдестин, гомогенный в отношении седиментации, не следует законам идеальной растворимости.

Седиментационный и электрофоретический методы анализа особенно часто применяли к глобулинам злаковых и бобовых растений [21—24]. У родственных видов растений седиментационное и электрофоретическое поведение белков семян очень сходно; например, авторы нашли, что они обладают в общем одинаковым числом компонентов и одинаковыми (в пределах ошибок опыта) числовыми значениями молекулярных констант.

Пшеничная клейковина (т. е. смесь проламинов и глютелинов) является еще одной системой, обстоятельно исследованной методами седиментации и диффузии. Используя в качестве растворителя раствор салицилата натрия, Мак-Калла и Грален [25] показали, что с понижением растворимости клейковинных фракций увеличивается их средний молекулярный вес.

Седиментационный анализ оказался весьма полезным методом для изучения реакций разложения и соединения. Такие реакции, наблюдаемые особенно у дыхательных белков, были обнаружены также в некоторых глобулиновых системах семян. Так, главный белок арахиса образует обратимо диссоциирующую систему, причем положение равновесия зависит от pH, концентрации и типа присутствующей соли [26, 27] (см. стр. 204). Дезагрегацию белков под действием растворителей изучали также седиментационными и осмотическими методами. Например, Барк [28], применяя осмотический метод, нашел, что молекулярный вес эксцельсина уменьшился с 300 000 в солевых растворах до 36 000 в концентрированных растворах мочевины.

Применение электрофоретического и седиментационного методов анализа эффективно в процессе приготовления препаратов. За увеличением или уменьшением концентрации различных компонентов можно следить, производя последовательные анализы во время приготовления препаратов.

На основе классификации Осборна под терминами «альбумины», «глобулины», «проламины» и «глютелины» подразумеваются не химически индивидуальные сложные соединения, а лишь различные белковые фракции. Каждая фракция состоит из смеси белков, обладающих некоторыми общими свойствами. Границы между фракциями не являются резкими. Например, глобулины в процессе получения могут подвергаться в некоторой степени денатурации, вследствие чего повышается содержание глютелина, или же может оказаться затруднительным удаление солей, что приводит к значительному увеличению содержания «альбумина». Накопление данных, особенно по аминокислотному составу и молекулярным константам белков, позволит разработать другую, более адэкватную их классификацию.

4. ПРИМЕРЫ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН

Для исследования белков семян использовались главным образом семена культурных растений (например, злаковых и масличных культур). Сравнительное изучение белков родственных видов производилось недостаточно. Наиболее важные исследования в этом направлении выполнил Даниельссон с глобулинами семян злаковых и бобовых растений [23, 24].

Таблица 17

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В СЕМЕНАХ ЗЛАКОВ

Наименование культуры	Общий белок, % от веса сухого вещества семян	Белковые фракции, % от общего белка				Ссылка на литературу
		альбумины	глобулины	проламины	глютелины	
Triticum vulgare (обыкновенная пшеница)	10—15	3—5	6—10	40—50	30—40	29—32
Triticum durum (твердая пшеница)	12—18	[а]	[а]	[б]	[в]	30
Secale cereale (рожь)	9—14	5—10	5—10	30—50	30—50	30, 31
Hordeum vulgare (ячмень)	10—16	3—4	10—20	35—45	35—45	30, 31, 33
Avena sativa (овес)	8—14	!	~80	10—15	~5	30, 31, 34, 35
Oryza sativa (рис)	8—10	Следы	2(—8)[г]	(1—5)[г]	85—90	30, 31, 36, 37
Zea mays (кукуруза)	7—13	[д]	5—6	50—55	30—45	30, 31, 38
Sorghum vulgare (сорго)	9—13	[а]	[а]	>60	[б]	39—44
Panicum miliaceum (обыкновенное просо)	7—16	10—11		57	30	40, 45, 46
Setaria italica (итальянское просо)	10—11	13—14		48	37	45, 47

[а] Присутствует в небольших количествах.

[б] Значительное количество.

[в] Главная фракция.

[г] Данные ненадежны.

[д] Не содержится или содержится в очень небольших количествах.

А. Однодольные

1) БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ

Наиболее тщательно исследованы злаковые растения (семейство Gramineae). Некоторые данные о содержании белков и процентном содержании различных белковых фракций в семенах наиболее распространенных злаков представлены в табл. 17. Приведенные в ней числовые значения не вполне сравнимы из-за различия методов, применявшихся для экстрагирования белков из разных злаков; они приблизительно соответствуют тем числовым значениям, которые можно получить, применяя классический метод Осборна. Содержание белков зависит от сорта растений и от условий их возделывания; процентное же содержание различных белковых фракций изменяется с общим содержанием белка [48]. Злаки, за исключением овса, характеризуются очень высоким содержанием в их семенах клейковины, т. е. проламинов и глютелинов. Эти белки считаются запасными белками семян и содержатся в клетках эндосперма. Альбумины и глобулины, вероятно, не являются запасными белками; их роль и локализация в семени не вполне выяснены. Концентрация глобулинов в зародыше и в алейроновых зернах выше, чем в других частях семени [22]. Проламины и глютелины не были найдены в зародыше [49]. Данные об аминокислотном составе различных белковых фракций и всего семени изложены в специальном разделе этой главы (см. стр. 209).

2) ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

а) Злаки. Глобулиновую фракцию семени ячменя тщательно исследовал Квенсель [21] седиментационным и электрофоретическим методами. Он показал, что эта фракция состоит из четырех компонентов, обозначенных в порядке увеличения размеров частиц как α, β, γ и δ. Молекулярные константы этих компонентов приведены в табл. 18 и 19. Фракции, содержащие в качестве главного компонента α-, β- или γ-компонент соответственно, можно получить путем фракционированного осаждения сульфатом аммония. Содержание серы во фракциях, богатых компонентом β, выше, чем в других фракциях [58], и в отличие от компонентов α и γ компонент β деградирует уже при pH 8,5. Такая неустойчивость, возможно, обусловлена разрывом дисульфидных связей [21]. Концентрация компонента δ очень мала. Следует отметить, что глобулиновая фракция лишь частично складывается из этих четырех компонентов.

Другие виды Gramineae исследовали Сэверборн, Даниельссон и Сведберг [22], а также Даниельссон [23—24]. Показано, что компонент γ содержится в семенах восьми, а компонент α—в семенах шести из девяти исследованных видов (см. табл. 18). Компоненты

Таблица 18

ГЛОБУЛИНЫ СЕМЯН РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ GRAMINEAE (ПО ДАНИЕЛЬССОНУ [24])

Виды Gramineae	Компоненты				Константы седиментации s_{20}, единицы Сведберга			
Hordeum vulgare (ячмень)	α	β	γ	δ	2,5	6,2	8,3	12,0
Secale cereale (рожь)	α	—	γ	—	2,6	—	8,2	—
Triticum vulgare (пшеница обыкновенная)	α	—	γ	—	2,5	—	8,2	—
Avena sativa (овес)	α	—	γ	—	2,6	—	8,1	—
Zea mays (кукуруза)	α	—	γ	—	2,6	—	8,5	—
Panicum miliaceum (просо обыкновенное)	—	—	γ	—	—	—	8,5	—
Phleum pratense (тимофеевка)	—	—	γ	—	—	—	8,2	—
Festuca pratensis (овсяница луговая)	—	—	γ	—	—	—	8,3	—
Festuca rubra (овсяница красная)	α	—	—	—	2,4	—	—	—

Таблица 19

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНСТАНТЫ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ ИЗ СЕМЯН ЗЛАКОВ

Белки	Виды злаковых	$s_{20}^{а}$	$D_{20}^{б}$	$M \cdot 10^{-3}$	Изоэлектрическая точка	Ссылка на литературу
Глобулины						
α	*Hordeum vulgare*	2,5	7,4	29	5,00	21, 23, 24
β	» »	6,2	4,9	110	4,90	21, 50
γ	» »	8,3			5,70	21
γ	*Triticum vulgare*	8,2	3,6	210		23, 24
альбумин	*Hordeum vulgare*	4,5	6,5	54	5,75	51, 52
Проламины						
глиадин	*Triticum vulgare*	2,1	6,7	28		53—55
гордеин	*Hordeum vulgare*	2,0	6,5	28		56
зеин	*Zea mays*	1,9	4,0	51		55, 57

[а] s_{20}—константа седиментации (в единицах Сведберга). Для глобулинов s_{20} экстраполирована до нулевой концентрации.

[б] D_{20}—константа диффузии ($\times 10^{-7}$) (в единицах системы CGS).

β и δ были найдены только в ячмене. Примечательно, что числовые значения константы седиментации для компонентов α, а также для компонентов γ одни и те же и не зависят от вида злака.

Экстрагирование и фракционирование глобулинов производили следующим образом [21, 22]. Исходный материал обычно состоял из цельных семян, размолотых до грубозернистой муки; в качестве экстрагирующей жидкости использовали 1 *М* раствор хлористого натрия, pH которого доводили до 7 фосфатным буфером. После экстра-

гирования (в течение ночи при 5°), центрифугирования и фильтрования глобулины осаждали последовательным добавлением твердого сульфата аммония до концентраций, составляющих следующие доли от концентрации насыщенного раствора: 15/100, 4/10 и 7/10. В случае ячменя эти фракции имели следующие характеристики.

«Фракцию 15/100» составлял главным образом компонент β с небольшим количеством компонента α. Осадок растворяли, и глобулины вторично осаждали, доводя концентрацию сульфата аммония до 7,5/100 насыщения.

«Фракция 4/10» состояла из веществ, не вполне определяемых седиментационным методом.

«Фракцию 7/10» составляли компоненты α, γ и δ. Дальнейшая очистка достигалась разбавлением осадка в буфере и осаждением глобулинов диализом против дистиллированной воды. Эту процедуру можно повторить несколько раз.

В случае пшеницы можно изучать белки из различных частей семени, поскольку в производственном процессе помола зародыши отделяются почти в чистом состоянии. Сэверборн с сотрудниками [22] исследовал глобулиновую фракцию зародыша, эндосперма (муки) и отрубей (содержащих богатые белком алейроновые зерна). Они показали, что в зародыше содержится только компонент γ, в отрубях—компоненты α и γ (последний в сравнительно высокой концентрации), а в эндосперме—главным образом компонент α. Аналогичные результаты были получены в случае ячменя [23]. Семя делили на зародышевую и остаточную фракции, причем обе содержали часть отрубей. Компонент β был найден только в остаточной фракции, компонент γ—только в зародыше.

Компоненты α и γ изолировал Даниельссон [23, 24]. Первый компонент был выделен из семян ячменя после удаления зародыша, второй—из зародыша пшеницы. Молекулярные константы этих компонентов приведены в табл. 19.

Проламины при седиментации оказались полидисперсными [53, 54, 56, 57]. Средний молекулярный вес некоторых проламинов указан в табл. 19. Проламины пшеницы, ячменя и кукурузы подвергали электрофоретическому анализу как в ацетатных буферах, так и в спиртовых растворах [56, 59—64]. Было установлено, что эти растворы содержат несколько электрофоретически хорошо определяемых компонентов, но в отличие от глобулинов выделение проламинов фракционированным осаждением не было достигнуто.

Предположение, что клейковина состоит из двух разных белков проламина и глютелина, кажется все более и более несостоятельным. Многие исследователи предпочитают рассматривать клейковину просто как комплекс химически родственных белков, который можно разделить на множество прогрессивно отличающихся друг от друга фракций. Некоторые опыты, на которых основана эта гипотеза, рассматриваются ниже.

По Мак-Калла и Роузу [12], количество диспергированной пшеничной клейковины в растворах салицилата натрия пропорционально концентрации салицилата натрия вплоть до 8%; при этой концентрации диспергирование становится практически полным. Кривые зависимости между количеством диспергированной клейковины и концентрацией салицилата натрия не имеют разрыва, указывающего на наличие двух разных белков. При исследовании фракций клейковины, полученных осаждением сульфатом магния, было найдено, что количество азота в осажденной клейковине пропорционально концентрации сульфата магния; при этом также не наблюдалось разрыва кривых. Эти результаты, полученные методами фракционированного осаждения, подтвердили Спенсер и Мак-Калла [65], которые применяли методы фракционного растворения.

Мак-Калла и Грален [25] изучали клейковину в растворах салицилата натрия методами седиментации и диффузии. Седиментационным анализом было установлено, что лишь часть (не более 84% в 12-процентных растворах салицилата натрия) клейковины находится в молекулярно-дисперсном состоянии. Осаждением сульфатом магния был приготовлен ряд фракций, и обнаружилось, что с понижением растворимости фракций клейковины средний молекулярный вес их возрастает. Все исследованные фракции были полидисперсными, а средний молекулярный вес варьировал от $43 \cdot 10^3$ до $1{,}75 \cdot 10^6$. Наиболее растворимая фракция содержала проламин пшеницы—глиадин. Свойства фракций изменялись постепенно как между последовательными фракциями, так и в пределах каждой фракции.

Результаты вышеупомянутых опытов с клейковиной лучше всего объясняются при помощи гипотезы, согласно которой клейковина представляет собой систему белков, свойства которой постепенно и закономерно изменяются с изменением ее растворимости.

Другие исследователи объясняют результаты своих опытов, придерживаясь мнения о различии между проламинами и глютелинами. Бишоп [17] сопоставил большое число результатов анализа глиадина [66—69] и показал, что они подтверждают существование химически хорошо определяемого глиадина с содержанием 26,6% амидного азота и 4,5% аргинина. Кроме того, с повышением концентрации соли и с понижением температуры количество переходящего в солевой раствор белка увеличивается за счет глютениновой фракции, тогда как количество проламиновой фракции фактически остается постоянным [70, 71].

В связи с этим следует упомянуть о некоторых опытах, имеющих скорее физиологический характер, которые показывают, что проламиновая и глютениновая фракции в семени выполняют разные функции. Так, Бишоп [48] определил процентное содержание различных белковых фракций в семенах одной и той же разновидности ячменя, различающихся по содержанию общего белка. Оказалось, что

процентное содержание гордеина в семени возрастает с увеличением содержания общего белка за счет белка, растворимого в солевом растворе, тогда как количество глютелина остается постоянным. Юрион с сотрудниками [72] заметили, что при хранении в условиях нормальной температуры и влажности в течение двух периодов года в семенах злаков происходит обратимое увеличение количества переходящего в солевой раствор белка, соответствующее уменьшению количества проламина в один период года и глютелина — в другой.

Таким образом, из этих исследований становится очевидным, что проламиновая и глютелиновая фракции, подобно глобулинам и альбуминам, являются гетерогенными системами. По результатам опытов трудно решить, состоят ли фракции из ограниченного или неограниченного числа компонентов с постепенно и закономерно изменяющимися свойствами. Электрофоретические исследования проламинов указывают на наличие ограниченного числа компонентов, тогда как при упомянутом выше изучении клейковины в растворах салицилата натрия не было обнаружено существование отчетливо различимых белков. С физиологической точки зрения все еще допускается различие между проламиновой и глютелиновой фракциями.

б) Глобулин кокосового ореха. Путем седиментационного анализа было показано, что растворы глобулина кокосового ореха — кокозина — состоят из двух компонентов: главного с константой седиментации $\sim$ 12 S (молекулярный вес $\sim$300 000) и второстепенного компонента, содержание которого не постоянно и соответствует, вероятно, половине количества главного компонента [73]. В щелочных растворах концентрация второго компонента повышается. Подобные реакции разложения наблюдались и у других белков семян, особенно у глобулина арахиса (см. стр. 204).

Б. Двудольные

1) БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ

Содержание белков в семенах некоторых двудольных указано в табл. 20, в которой приведены также некоторые данные о различных белковых фракциях, экстрагированных с применением классических методов. Главной и наиболее характерной является глобулиновая фракция. Из семян двудольных получено в кристаллическом состоянии несколько глобулинов (например, эдестин, эксцельсин и амандин). В некоторых случаях приведенные в табл. 20 числовые данные для альбуминовой фракции несколько завышены, что можно объяснить содержанием в этой фракции примеси низкомолекулярных соединений азота. Еще одной характерной особенностью семян двудольных растений является полное или почти полное отсутствие в них

Таблица 20

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В СЕМЕНАХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ДВУДОЛЬНЫХ

Растение	Общий белок, % от веса сухого вещества семян	Белковые фракции, % от общего белка				Ссылка на литературу
		альбумины	глобулины	проламины	глютелины	
Corylus avellana (лесной орех)	40—50	а	б	а	в	31
Chenopodium quinoa (марь)	9	23	29	9	39	74
Fagopyrum sativum (гречиха)	6—8	д	~90	а	д	75—77
Ricinus communis (клещевина)	~20	~10	~90	а	а	78
Tamarindus indica (тамаринд)	15	56		7	37	79
Lupinus luteus (люпин)	~40	1	78	а	16	80
Arachis hypogaea (земляной орех)	42	а	97	а	а	81
Glycine hispida (соя)	30—50	д	85—95	а	а	82, 83
Phaseolus lunatus (фасоль серповидная)	21	8	65	а	а	84
Phaseolus angularis (фасоль угловатая)	21	д	80	а	а	85
Lathyrus sativus (чина посевная)	27	(25)[г]	47	5	23	86
Caloncoba welwitschii (вельвичия)	17	(34)[г]	10	7	49	87
Linum usitatissimum (лен)	~30	а	б	а	в	88, 90
Gossypium herbaceum (хлопчатник)	~20	а	90	а	10	91, 92
Nicotiana sp. (табак)	33	24	26	а	50	93
Solanum lycopersicum (томат)	37	а	б	а	а	94
Plantago psyllium (подорожник)	17	(6)[г]	10	1	83	95
Sesamum indicum (кунжут)	~20	~4	80—85	а	д	96
Cucurbita pepo (тыква)	12	а	92	а	д	97
Cucumis melo (дыня)	34	а	83	а	17	98
Helianthus annuus (подсолнечник)	30—35	а	б	а	а	99, 100

[а] Отсутствует или содержится в очень небольшом количестве.

[б] Главная фракция.

[в] Значительное количество.

[г] Данные неточны (содержатся низкомолекулярные соединения).

[д] Содержится в небольшом количестве.

проламиновой фракции. В семенах некоторых видов отсутствует (или очень незначительна) глютелиновая фракция. У других видов она достигает 50% общего белка.

Таблица 21

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ БЕЛКА ИЗ СОЕВЫХ БОБОВ

Растворитель [a]	Количество экстрагированного белка, % (по Смиту и Сэрклю [102, 103])			
	pH 1,5	pH 4,2	pH 7,3	pH 11,4
Вода	85	9	88	96
0,01 *M* NaCl	80	11	82	95
0,1 *M* NaCl	76	14	52	92
0,5 *M* NaCl	68	44	76	92
0,25 *M* $CaCl_2$	65	69	65	68

[a] Величину pH изменяли добавлением кислоты (HCl) или основания [NaOH или $Ca(OH)_2$].

Числовые данные для глютелина, приведенные в табл. 20, могли быть слишком высокими, если бы глобулины не экстрагировались в самых благоприятных условиях. Экстрагированное количество глобулинов зависит от pH, концентрации и от природы присутствующей соли; оно минимально в кислой области (pH 4—5), где находятся изоэлектрические точки глобулинов. В качестве примера можно привести результаты экстрагирования белков из обезжиренной соевой муки [101—104]. Из табл. 21 видно, что при низких концентрациях соли количество диспергированного белка сильно зависит от pH. При повышении концентрации соли влияние pH становится менее заметным.

Глобулины двудольных относятся к немногим белкам, которые можно экстрагировать горячими солевыми растворами [1—7, 105]. При охлаждении профильтрованных экстрактов часто образуются кристаллические препараты высокой степени частоты. Например, глобулин конопляного семени—эдестин получают экстрагированием при 50—55° в течение 1 часа 5-процентным раствором хлористого натрия [105]. При медленном охлаждении до комнатной температуры и затем до 5° образуются микрокристаллы эдестина. Путем чрезвычайно медленного выпаривания растворов белков в растворах сульфата аммония Бейли [105] удалось получить крупные кристаллы эдестина, эксцельсина и глобулина из семян клещевины. Крупные кристаллы хорошо получаются также путем медленного диализа или медленного охлаждения белковых растворов. Кристаллизационная вода в крупных кристаллах эдестина и эксцельсина составляет около 40% веса кристаллов. Эта величина совпадает с данными, полученными путем рентгеновского анализа [106].

2) ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

По сравнению с другими белками семян, например глобулинами злаков, глобулины двудольных изолировать довольно легко. Кроме того, они принадлежат к той группе белков семян, которая наиболее широко исследована физико-химическими методами. Ниже рассматриваются некоторые результаты этих исследований, особенно представляющих более общий интерес.

а) **Молекулярные характеристики.** Молекулярные константы некоторых глобулинов даны в табл. 22. Глобулиновая фракция состоит из одного или двух главных компонентов. Когда присутствуют оба компонента, молекулярный вес компонента, находяще-

Таблица 22

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОНСТАНТЫ ГЛОБУЛИНОВ НЕКОТОРЫХ ДВУДОЛЬНЫХ

Глобулин	Виды двудольных	$s^{а}_{20}$	$D^{б}_{20}$	$M \cdot 10^{-3}$	Ссылка на литературу
Легумин	*Pisum sativum* (огородный горох)	12,6[в]	3,49	330	23, 24
Вицилин	То же	8,1[в]	4,26	186	23, 24
Арахин	*Arachis hypogaea* (арахис)	14,6[в]	3,86	330	26, 107
Арахин (полная диссоциация)	То же	9,0[в]	4,20	180	26, 107
Конарахин	» »	8,7[в]		190	123
Глицинин	*Glycine soja* (соя)	13,1	—	—	23, 24
		8,0	—	—	23, 24
Эдестин	*Cannabis sativa* (конопля)	12,8[в]	3,93	310	19, 108
		12,8	3,18	381	109
Амандин	*Prunus persica* (персик)	12,5[в]	3,45	346	109—111
Эксцельсин	*Bertholletia excelsa* (бразильский орех)	13,3[в]	4,26	295	110—112
Глобулин семени свеклы	*Beta vulgaris* (свекла)	13,9	5,3	(~250)	113
Помелин	*Citrus aurantiaca* (апельсин)	11,4	—	(~300)	114
Гипокастанин	*Aesculus hippocastanum* (конский каштан)	12,9	(2,9)	(430)	115

[а] s_{20}—константа седиментации (в единицах Сведберга).

[б] D_{20}—константа диффузии (в единицах системы CGS) ($\times 10^{-7}$)

[в] Данные экстраполированы до нулевой концентрации.

гося в меньшем количестве, составляет приблизительно половину молекулярного веса основного компонента.

Альбумины менее изучены по сравнению с глобулинами. Однако были определены константы седиментации альбуминов гороха [110] и арахиса [107]. Их молекулярные веса меньше, чем у глобулинов, и лежат в пределах от 30 000 до 100 000.

б) Системы глобулинов в семенах бобовых растений. За последние годы были тщательно изучены глобулины гороха, арахиса, соевых бобов; интересно сравнить полученные при этом результаты.

1) Горох (Pisum sativum). Из семян гороха Осборн и Кэмпбелл [117, 118] выделили два глобулина—легумин и вицилин, которые различаются по растворимости и содержанию серы. Путем изоэлектрического осаждения легумина Даниельссону [119] удалось получить препараты легумина и вицилина, которые оказались гомогенными как при седиментации, так и при электрофорезе (см. табл. 22). В дальнейшем было показано, что оба этих глобулина обладают одинаковым содержанием тирозина, но различаются по содержанию триптофана, который в легумине составляет 1,24%, а в вицилине—0,27%. Некоторые исследователи [120] считали глобулины гороха смесью различных компонентов, но Даниельссон показал, что легумин и вицилин являются вполне определенными белками.

В дальнейшем Даниельссон [23] изучил 34 различных вида бобовых. Седиментационным анализом было обнаружено, что в их семенах содержатся два главных глобулина: один с константой седиментации $s_{20}=11—14\ S$, другой с $s_{20}=7—8{,}5\ S$. Из результатов вышеуказанных опытов следует, что оба этих глобулина из семян различных видов имеют такие же (или почти такие же) молекулярные веса, как легумин и вицилин. Однако из последующего будет видно, что другие физические свойства глобулинов семян бобовых значительно различаются в зависимости от вида этих растений.

2) Арахис (Arachis hypogaea). С белками арахиса были проведены обширные исследования [121—125]. Глобулины арахиса можно разделить на две фракции—арахин и конарахин. Арахин осаждается из его экстракта в 10-процентном растворе хлористого натрия при 40-процентном насыщении последнего сульфатом аммония или путем насыщения солевого экстракта углекислым газом. Конарахин получают из фильтрата от осаждения арахина путем диализа против воды или посредством полного насыщения сульфатом аммония.

Джонсон с сотрудниками [26, 27] подтвердил, что арахин образует обратимо диссоциирующую систему. Диссоциация на молекулы половинного молекулярного веса зависит от pH, концентрации и природы присутствующей соли. Изменение реакции среды от pH 9 до pH 5 (область изоэлектрического состояния) увеличивает

ассоциацию, а понижение концентрации соли увеличивает диссоциацию. Почти полная ассоциация наблюдается при высокой концентрации сульфатных ионов, и даже в небольшом количестве эти ионы, по-видимому, препятствуют диссоциации. В арахисе арахин находится главным образом в ассоциированной форме.

Подобные обратимо диссоциирующие системы особенно типичны для дыхательных белков [111, 126, 127]. Как и в случае арахина, их устойчивость максимальна вблизи изоэлектрической точки и сульфатные ионы содействуют ассоциации. У дыхательных белков диссоциация, как правило, увеличивается с повышением концентрации соли, однако в некоторых случаях (как и у арахина) наблюдается и уменьшение диссоциации [128] по мере увеличения концентрации соли.

Джонсон и Нейсмит [129] недавно исследовали конарахиновую фракцию. Посредством седиментационного анализа было показано, что эта фракция состоит из шести или семи компонентов с константами седиментации s_{20} от 2 до 50 S, что соответствует молекулярным весам от $2 \cdot 10^4$ до $2 \cdot 10^6$. Эти компоненты, за исключением компонента, обладающего наименьшим молекулярным весом 20 000, образуют систему ассоциация $\rightleftarrows$ диссоциация. Состоянию диссоциации (8,7 S, молекулярный вес $\sim$ 190 000) благоприятствуют большая ионная сила раствора и высокое значение pH. При исследовании растворов смеси арахина и конарахина методом седиментационного анализа было обнаружено, что обе эти системы глобулинов существуют самостоятельно и различаются между собой. Интересно отметить, что добавление электролитов способствует ассоциации арахина, но вызывает диссоциацию конарахина.

Арахин в ассоциированной форме подобен легумину, а конарахин в диссоциированной форме похож на вицилин, если принимать во внимание только их молекулярные константы. Однако легумин и вицилин не образуют систем, способных к диссоциации.

Белковая фракция альбуминового типа, остающаяся после удаления арахина и конарахина из экстракта арахиса, состоит из компонентов с s_{20}, равными 6,2 S и 4,8 S [125]. В этой альбуминовой фракции содержится 2,9% серы—чрезвычайно большое количество для растительного белка [123].

3) Соя (Glycin soja). Результаты седиментационного анализа показывают, что в соевых бобах содержатся два главных глобулина со значениями s_{20} 13,1 S и 8,0 S соответственно [23]. Бриггс и Манн [130, 131] установили присутствие в водных экстрактах не менее семи электрофоретически различных белков. Далее было обнаружено, что глобулин, называемый «глицинином», получаемый по методу Осборна и Кэмпбелла [132], электрофоретически неоднороден. Эта глобулиновая фракция составляет 75% общего белка; бо́льшая часть ее (45% общего белка) является электрофоретически однородным белком, который осаждается при ох-

лаждении водного экстракта; осаждение ускоряется добавлением небольшого количества хлорида кальция.

Сравнительные исследования белков сои методами электрофореза и седиментации не проводились. Тем не менее представляется вероятным, что осаждаемый охлаждением экстракта глобулин сои подобен легумину гороха, который тоже осаждается на холоду.

Судя по результатам электрофоретических исследований, глобулины сои, подобно глобулину гороха, представляют собой отдельные белковые компоненты и не образуют обратимо диссоциирующей системы, как это наблюдается у глобулинов арахиса.

в) Устойчивость глобулинов. Денатурация белков в кислотах и основаниях в общем случае вызывает распад молекулы на меньшие компоненты. Для каждого белка существует область значений pH, в которой он устойчив; вне этой области могут происходить необратимые денатурационные изменения белка.

Для глобулинов семян пределы щелочности соответствуют интервалу pH 9,5—10,5, а пределы кислотности—интервалу pH между 4 и 5.

Исследования Осборна [1] денатурации глобулинов семян кислотами представляют важный вклад в знания о процессе денатурации. Получаемые под действием разбавленных кислот нерастворимые в солевых растворах производные глобулинов Осборн назвал протеанами, уделив особое внимание эдестану—протеану эдестина. Бейли [20] следующим образом резюмирует наблюдения Осборна с принятой в настоящее время точки зрения. Кислая соль эдестина является предшественником эдестана; количество образующегося в данный промежуток времени эдестана зависит от кислотности раствора, и превращение происходит с измеримой скоростью. Бэйли [20] детально исследовал денатурацию эдестина кислотой в растворах, не содержащих соли. Он обнаружил, что скорость образования эдестана возрастает с повышением концентрации белка и температуры; она сравнительно мала при pH 5 и слишком велика, чтобы ее можно было измерить при pH ниже 4. При ультрацентрифугировании в не содержащих соли растворах, имеющих pH 4,5, эдестан оказался монодисперсным; его константа седиментации s_{20} равна $2{,}6S$.

При растворении эдестана, образовавшегося при pH 4,5, в кислых растворах (pH 2) наблюдается дальнейший его распад [133]. Бо́льшая часть (около 90%) осаждается при добавлении хлорида калия до концентрации 0,35 M, а меньшая остается в растворе даже при концентрации соли 2 M. По растворимости и поглощению ультрафиолетовых лучей исходный эдестан и образующаяся при pH2 менее растворимая фракция, по-видимому, представляют собой два весьма сходных соединения. Судя по поглощению света, в образующейся при pH 2 более растворимой фракции содержится меньше ароматических аминокислот, чем в исходном эдестане и в менее

растворимой фракции. При электрофорезе более растворимая фракция обнаруживает гомогенность.

Глобулины семян деполимеризуются мочевиной в пределах значений pH, соответствующих их устойчивости [28]. В 6,6 *М* растворах мочевины вблизи изоэлектрической точки средние молекулярные веса амандина и эксцельсина, определяемые по осмотическому давлению, оказались равными 30 000 и 36 000 соответственно. В растворах белков, содержащих мочевину, было обнаружено присутствие сульфгидрильных групп, но эти группы не были найдены при растворении белков в водных буферных растворах.

Кислоты, основания и мочевина вызывают глубокие и необратимые изменения глобулинов; такие процессы денатурации следует отличать от реакций обратимой диссоциации, например у арахина, которые происходят в области значений pH, где белки устойчивы.

5. БЕЛКИ СЕМЯН В ПЕРИОД СОЗРЕВАНИЯ И ПРОРАСТАНИЯ

Проблемы белкового обмена в созревающих и прорастающих семенах в основном те же, что и вопросы обмена и перемещения белков в растениях вообще [134—136]. Здесь будут рассмотрены некоторые особенно интересные результаты исследований белкового обмена в семенах. Белковый состав семян определяли главным образом классическими методами фракционирования, основанными на растворимости белков (см. стр. 189). Однако недавно был проведен ряд исследований, в которых наблюдали изменения содержания физически хорошо определяемых белков в период созревания и прорастания семян [116].

А. Созревание

Низкомолекулярные соединения азота, главным образом аминокислоты, переносятся из синтезирующих частей растения в созревающее семя, где происходит построение из них различных белков, имеющих то или иное назначение. Часть белков отлагается в качестве запасных, а остальная часть, попадающая главным образом в зародыш, содержит множество ферментов, имеющих значение для процесса прорастания.

1) ЗЛАКИ

Бишоп [48] изучал образование белков в развивающихся семенах ячменя и сделал следующие наблюдения.

1) Три главные белковые фракции (растворимый в солевых растворах белок, гордеин и глютелин) имеются даже в самых молодых семенах.

2) Во время созревания семян процентное содержание гордеина возрастает с увеличением содержания общего белка, тогда как

относительное количество фракции, растворимой в солевых растворах, уменьшается.

3) В продолжение всего процесса созревания семян относительное количество глютенина остается практически постоянным.

В образцах развивающихся семян ячменя, взятых в разные периоды созревания и хранения, содержание гордеина до и после хранения оказалось практически одинаковым. Количество растворимой в солевых растворах фракции уменьшалось в той степени, в какой увеличивалось количество нерастворимой фракции; постоянные числовые значения были получены только спустя несколько месяцев. По достижении равновесия относительные количества белковых фракций в развивающихся семенах оказались такими же, как и в созревших семенах при том же содержании общего азота.

Мак-Калла [137] установил порядок распределения белков в развивающихся семенах пшеницы. Во время их созревания постоянно присутствовали следующие фракции: соединения, содержащие небелковый азот; белок, растворимый в воде; белок, растворимый в растворах KJ, и белок, не растворимый в растворах KJ. Результаты, полученные для ячменя и пшеницы, сравнивать трудно, так как исследованные фракции в обоих случаях были различны. Если предположить, что растворимая в растворах KJ фракция состоит в основном из проламинов, а не растворимые в растворах KJ фракции—из глютелинов, то полученные результаты до некоторой степени сходны. Относительно общего процесса образования белков в семенах пшеницы Мак-Калла пришел к следующим выводам: 1) переместившийся из вегетативных частей растения небелковый азот конденсируется, проходя стадию лабильного растворимого в воде белка в эндосперме или белках клейковины; 2) образующиеся в самой ранней стадии фракции клейковины становятся наиболее нерастворимой частью белка (не растворимые в растворах KJ фракции, или «глютелин»); 3) образующиеся в конце созревания фракции являются наиболее растворимыми (растворимые в растворах KJ фракции, или «проламин»).

2) ГОРОХ

Даниельссон [138] исследовал семена гороха в разных стадиях созревания при помощи седиментационного анализа. В начальной стадии созревания семян содержание глобулиновой фракции быстро увеличивается; оба глобулина—вицилин и легумин—синтезируются с разной скоростью. По мере созревания семян процентное содержание вицилина уменьшается, а количество легумина увеличивается. Содержание низкомолекулярных соединений азота уменьшается с той же скоростью, с какой увеличивается содержание глобулиновой фракции. Относительное количество альбуминовой фракции увеличивается медленно и с постоянной скоростью.

В самом начале созревания семян на кривых седиментации были обнаружены довольно плохо определяемые высокомолекулярные соединения. Если незрелым семенам дать высохнуть при комнатной температуре, то на кривых седиментации обнаруживаются хорошо определяемые глобулины—вицилин и глобулин.

Б. Хранение

Концентрация белков в зрелых семенах изменяется и во время их хранения. Было замечено [72], что у семян злаков в два периода года наблюдается обратимое увеличение количества растворимого в солевых растворах белка. Это увеличение соответствует уменьшению количества проламина во время прорастания семян и уменьшению глютелина в период цветения растений.

Обратимые изменения белков могут оказывать влияние на процесс прорастания, так как хорошо известно, что продолжительное хранение (в определенных пределах времени) семян ячменя повышает их всхожесть.

В. Прорастание

Во время прорастания запасные белки распадаются на аминокислоты, которые затем перемещаются в растущие части молодого растения. Некоторые ферменты находятся в активном состоянии в зрелых семенах во время их хранения. Другие же синтезируются и активируются в период прорастания.

1) ЯЧМЕНЬ

Наши знания процесса прорастания семян в основном ограничиваются сведениями, относящимися к ячменю, так как его превращение в солод—весьма важный производственный процесс. Превращение в солод—это искусственное прорастание семян, происходящее в темноте, без питания извне, при температуре между 10 и 25°, когда ферменты действуют сравнительно медленно.

Бишоп [139] показал, что в начале превращения семян в солод глютелиновая и гордеиновая фракции распадаются почти с одинаковой скоростью на растворимые в солевых растворах продукты. В дальнейшем скорость распада гордеина сильно уменьшается, а количество глютелина может даже несколько возрастать, вероятно, вследствие его ресинтеза в зародыше.

Некоторые авторы наблюдали во время прорастания семян увеличение количества растворимой в солевых растворах белковой фракции. Но даже если общее количество растворимых в солевых растворах белков является практически постоянным, то состав различных белковых фракций изменяется в период прорастания семян. Сэверборн с сотрудниками [22] исследовал распад различных

глобулинов ячменя во время превращения семян в солод (см. стр. 196) и нашел, что особенно интенсивно распадается γ-глобулин, в меньшей степени—α-глобулин, а β-глобулин остается неизмененным. Интересно отметить, что γ-глобулин локализуется в зародыше.

Бизерт и Скрибан [61, 62] и Скрибан [63] недавно исследовали гидролиз белков ячменя во время превращения его в солод. Электрофоретическим анализом было показано, что некоторые компоненты гордеиновой фракции в период прорастания семян распадаются легче других и что скорость гидролиза достигает максимума на пятый день превращения ячменя в солод. Применявшимися методами невозможно было обнаружить соединения, промежуточные между белками и аминокислотами.

2) ГОРОХ

Недавно Даниельссон [116] исследовал белки семян гороха во время их прорастания. В первый период прорастания оба глобулина—вицилин и легумин—распадаются очень медленно, но через 5—6 суток скорость их распада значительно возрастает, а через 15 суток глобулины распадаются полностью. Распад обоих этих глобулинов происходит одновременно и бывает наиболее интенсивным, когда у молодого растения появляются первые листья. Главные глобулины семян двудольных растений, по-видимому, играют ту же роль, что и проламины и глютелины злаков, т. е. являются запасными белками. Альбуминовая фракция гороха распадается медленно с постоянной скоростью.

6. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ

Полный аминокислотный состав хорошо определяемых белков семян был определен только в немногих случаях. Такой анализ производили для цельных семян с целью определения питательной ценности семян различных видов растений.

Данные об аминокислотном составе белков семян некоторых видов растений приведены в табл. 23. Между белками семян однодольных и двудольных растений наблюдаются некоторые характерные различия, например, в белках семян однодольных содержится больше пролина и меньше аргинина, чем в белках семян двудольных растений. Для проламинов характерны высокое содержание амидов и полное или почти полное отсутствие в них триптофана. Количество аммиака в проламинах, по-видимому, эквивалентно содержанию в них аспарагиновой и глутаминовой кислот, что указывает на отсутствие в этих белках свободных карбоксильных групп. Чрезвычайно высоким содержанием цистина и (или) цистеина отличается β-глобулин ячменя. Далее, интересно отметить, что состав глобу-

Таблица 23

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫХ СЕМЯН (В ГРАММАХ АМИНОКИСЛОТЫ НА 100 г БЕЛКА)

Аминокислота	Глиадин	Зеин	β-Глобулин (ячменя)	Эдестин		Глобулин (семян тыквы)	Арахин	Легумин	Вицилин	Альбумин (гороха)
Общий азот	17,7	16,2		18,55			18,3	17,9	17,5	15,1
Глицин	1	0,0	4,2	5,1			3,7			
Аланин	2,0	11,5	6,5	5,5			5			
Серин	4,8	7,8	4,3	6,3			5,3			
Треонин	2,1	3,0	5,9	3,8	3,1	2,6	2,6			
Валин	2,6	3,0	9,5	6,3	6,6	6,5	4,5			
Лейцин	6,7	24,0	11,0	7,7	7,4	8,0	7,8			
Изолейцин	(5,1)	7,4	3,2	4,4	6,2	5,1	7,6			
Метионин	1,6	2,3	3,2	2,2	2,2	2,3	0,7			
Цистин и (или) цистеин	2,5	1,0	9,4	1,2	1,3	1,1	1,5			
Пролин	13,2	10,5	13,3	4			7			
Фенилаланин	6,3	6,5	4,7	5,8	5,5	7,2	6,3			
Триптофан	0	0	3,8	1,5	1,2	1,7	1,0	1,3	0,4	2,3
Тирозин	3,3	5,3	8,5	4,5	4,3	4,4	5,5	4,2	4,2	5,5
Гистидин	2,3	1,7	1,7	3,9	2,5	2,2	2,2	3,0	2,4	3,2
Аргинин	2,7	1,8	2,7	5,0	16,7	16,2	14,0	13,1	11,5	5,1
Лизин	1,2	0	2,1	2,7	2,4	2,8	4,6	3,5	4,6	10,3
Аспарагиновая кислота	3,6	5,7	8,8	11,9			(16,0)	16,3	15,7	14,5
Глутаминовая кислота	4,7	27,0	17,8	20,6			23,8	30,1	22,7	16,3
Аммиак	6,2	3,0	2,5					2,3	2,2	1,6
Метод определения[а]	Хим. [7], [17]	Хим. [7]	Крахмал [50]	Хим. [7]	Микробиол. [140], [141]	Микробиол. [140], 141]	Хим. [7]	Комб. [142]	Комб. [142]	Комб. [142]

[а] Хим.—чисто химические методы, крахмал—хроматография на крахмальных колонках, микробиол.—микробиологические определения, комб.—комбинация химических и физико-химических методов.

линов, полученных из семян различных видов двудольных, почти одинаков. Содержание лизина и триптофана в альбумине гороха выше, чем в его глобулинах.

Содержание незаменимых аминокислот в белках семян нескольких наиболее распространенных культур дано в табл. 24 [140]. В последнем столбце таблицы для сравнения указаны рекомендуемые для человека (весом 72 *кг*) [143] суточные нормы каждой аминокислоты. Питательная ценность различных семян (как источника белков) определяется путем сравнения данных, приведенных в табл. 24, с данными о содержании белков в различных семенах (см. табл. 17 и 20). Аргинин и гистидин не считаются незаменимыми аминокислотами для здоровых взрослых людей, но для некоторых животных они незаменимы.

Таблица 24

СОДЕРЖАНИЕ НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКАХ РАЗЛИЧНЫХ СЕМЯН (В ГРАММАХ НА 100 г БЕЛКА)

Аминокислота	Пшеница		Рисовое зерно	Кукуруза		Горох	Соя	Рекомендуемая суточная норма для человека
	мука	цельное зерно		цельное зерно	зеин			
Лейцин	7,0	7,0	8,2	15,0	23,7	7,0	8,0	2,2
Фенилаланин	5,5	5,1	5,0	5,0	6,4	5,0	5,3	2,2
Метионин	2	2,5	3	3,1	2,3	1—3	1,7	2,2
Лизин	1,9	2,7	3,2	2,3	0	6,5	6,8	1,6
Валин	4,1	4,3	6,2	5,3	3,0	5,5	5,3	1,6
Изолейцин	4,2	4,0	5,2	6,4	7,3	5,5	6,0	1,4
Треонин	2,7	3,3	3,8	3,7	3,0	3,9	3,9	1,0
Триптофан	0,8	1,2	1,3	0,6	0	0,8	1,4	0,5
Аргинин	3,9	4,3	7,2	4,8	1,8	7,0	7,3	
Гистидин	2,2	2,1	1,7	2,5	1,7	2,2	2,9	

ЛИТЕРАТУРА

1. Осборн Т. Б., Растительные белки, М., 1935.
2. Onslow M. W., The Principles of Plant Biochemistry, University Press, Cambridge, 1931.
3. Handbuch der Pflanzenanalyse IV/1. Spezielle Analyse III. Julius Springer, Vienna, 1933.
4. Chibnall A. C., Protein Metabolism in the Plant, Yale University Press, New Haven, Conn., 1939.
5. Snell E. E., Advances in Protein Chem., **2**, 85, 1945.
6. Stewart F. C., Street H. E., Ann. Rev. Biochem., **16**, 471, 1947.
7. Блок Р., Боллинг Д., Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов, ИЛ, М., 1949.
8. Vickery H. B., Physiol. Revs., **25**, 347, 1945.
9. McCalla A. G., Ann. Rev. Biochem., **18**, 615, 1949.
10. Cook W. H., Can. J. Res., **5**, 389, 1931.
11. Foster J. F., Yang J. T., Yui N. H., Cereal Chem., **27**, 477, 1950.

12. McCalla A. G., Rose R. C., Can J. Res., **12**, 346, 1935.
13. Belter P. A., Smith A. K., J. Am. Oil Chem. Soc., **29**, 170, 1952.
14. Sinclair A. T., McCalla A. G., Can. J. Res., **15**, 187, 1938.
15. McCaig J. D., McCalla A. G., Can. J. Res., **19**, 163, 1941.
16. McCalla A. G., Gralén N., Can. J. Res., **23**, 219, 1945.
17. Bishop L. R., Thesis, Birmingham University, 1939.
18. Onslow M. W., The Principles of Plant Biochemistry, University Press, Cambridge, 1931, p. 173.
19. Svedberg T., Stamm A. J., J. Am. Chem. Soc., **51**, 2170, 1929.
20. Bailey K., Biochem. J., **36**, 140, 1942.
21. Quensel O., Untersuchungen über die Gerstenglobuline, Thesis, Uppsala University, 1942.
22. Säverborn S., Danielsson C. E., Svedberg T., Svensk Kem. Tid., **56**, 75, 1944.
23. Danielsson C. E., Biochem. J., **44**, 387, 1949.
24. Danielsson C. E., Svensk Kem. Tid., **64**, 43, 1952.
25. McCalla A. G., Cralén N., Can. J. Res., **20**, 130, 1942.
26. JohnsonP., Shooter E. M., Biochem. Biophys. Acta, **5**, 361, 1950.
27. Johnson P., Shooter E. M., Rideal E. K., Biochem. Biophys. Acta, **5**, 376, 1950.
28. Burk N. F., J. Biol. Chem., **120**, 63, 1937.
29. Bailey C. H., The Chemistry of Wheat Flour, The Chemical Catalog Company, Inc., New York, 1925.
30. Kent-Jones D. W., Amos A. J., Modern Cereal Chemistry, 4th ed., Northern Publ. Co., Liverpool, 1947.
31. Osborne T. B., Ergeb. Physiol., **10**, 47, 1910.
32. Osborne T. B., Voorhees C. G., J. Am. Chem. Soc., **16**, 524, 1893.
33. Bishop L. R., J. Inst. Brewing, **34**, 101, 1928.
34. Csonka F. A., J. Biol. Chem., **75**, 189, 1927.
35. Lüers H., Siegert M., Biochem. Z., **144**, 467, 1924.
36. Hoffman W. F., J. Biol. Chem., **66**, 501, 1925.
37. Osborne T. B., Van Slyke D. D., Leavenworth C. S., Vinograd M., J. Biol. Chem., **22**, 259, 1915.
38. Kühnau J., Z. Lebensm.-Untersuch. Forsch., **90**, 435, 1950.
39. Fournier P., Digaud A., Bull. soc. sci. hyg. aliment., **36**, 33, 1948; C. A., **42**, 7890, 1948.
40. Gerpe M. C., Tabarés L. G., Anales fis. y quím. (Madrid), **43**, 1033, 1947.
41. Johns C. O., Brewster J. F., J. Biol. Chem., **28**, 59, 1917.
42. Katagiri H., Mugibayasi N., J. Agr. Chem. Soc. Japan, **14**, 1237, 1938; C. A., **33**, 6456, 1939.
43. Miège E., Rev. intern. botan. appl. et agr. trop., **31**, 137, 1951; C.A., **46**, 1174, 1952.
44. Visco S., Arch. farmacol. sper., **31**, 173, 1921; C. A., **16**, 430, 1922.
45. Teng-Yi Lo, J. Chinese Chem. Soc., **8**, 170, 1941.
46. Wilson J. W., S. Dacota Agr. Expt. Sta. Bull., **316**, 1, 1938.
47. Берулава И. Т., Гигиена и санитария, № 4, **42**, 1950; C.A., **44**, 8009, 1950.
48. Bishop L. R., J. Inst. Brewing, **36**, 336, 1930.
49. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., **22**, 379, 1900.
50. Jensen R., Acta Chem. Scand., **6**, 771, 1952.
51. Danielsson C. E., Nature, **162**, 525, 1948.
52. Danielsson C. E., Sandegren E., Acta Chem. Scand., **1**, 917, 1947.
53. Krejci L., Svedberg T., J. Am. Chem. Soc., **57**, 946, 1935.

54. Lamm O., Polson A., Biochem. J., 30, 528, 1936.
55. Foster J. F., French D., J. Am. Chem. Soc., 67, 687, 1945.
56. Quensel O., Svedberg T., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 22, 441, 1938.
57. Watson C. C., Arrhenius S., Williams J. W., Nature, 137, 322, 1936.
58. Sandegren E., Suominen H. S., Ekström D., Acta Chem. Scand., 3, 1027, 1949.
59. Schwert G. W., Putnam F. W., Briggs D. R., Arch. Biochem., 4, 371, 1944.
60. Laws W. D., France W. G., Cereal Chem., 25, 231, 1948.
61. Biserte G., Scriban R., Bull. soc. chim. biol., 32, 959, 1950.
62. Biserte G., Scriban R., Bull. soc. chim. biol., 33, 114, 1951.
63. Scriban R., Les Protides de l'orge du malt et du moût, Thesis, Lille University, 1951.
64. Scallet B. L., J. Am. Chem. Soc., 69, 1602, 1947.
65. Spencer E. Y., McCalla A. G., Can. J. Res., 16, 483, 1938.
66. Hoffman W. E., Gortner R. A., Colloid Symposium Monographs, Reinhold Publishing Corp., New York, 1925, No. 2, p. 209.
67. Haugaard G., Johnson A. H., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 18, № 2, 1930.
68. Cross R. J., Swain R. E., Ind. Eng. Chem., 16, 49, 1924.
69. Larmour R. K., Sallans H. R., Can. J. Res., 6, 38, 1932.
70. Urion E., Lejeune G., Golovtchenko T. V., Bull. soc. chim. biol., 26, 303, 1944.
71. Lejune M. G., Compt. rend., 234, 1800, 1952.
72. Urion E., Lejune G., Fronsacq-Collin M., Bull. soc. chim. biol., 33, 120, 1951.
73. Sjögren B., Spychalski R., J. Am. Chem. Soc., 52, 4400, 1930; ср. Svedberg T., Pedersen K. O., The Ultracentrifuge, Oxford University Press, Oxford, 1940.
74. Wenzel C. C., Rev. facultad farm. y bioquim., Univ. nacl. mayor San Marcos (Lima, Peru), 7, 40, 1946; C. A., 41, 2175, 1947.
75. Johns C. O., Chernoff L. H., J. Biol. Chem., 34, 439, 1918.
76. Kiesel A., Z. physiol. Chem., 118, 301, 1922.
77. Sawamura S., Sasaki R., J. Sci. Agr. Soc. (Japan), 258, 261, 1924; C. A., 19, 666, 1925.
78. Osborne T. B., Mendel L. B., Harris I. F., Am. J. Physiol. 14, 259, 1905.
79. Savur G. R., Sreenivasan A., J. Biol. Chem., 172, 501, 1948.
80. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., 19, 456, 1897.
81. Fontaine Th. D., Irving G. W., Warner R. C., Arch. Biochem., 8, 239, 1945.
82. Bailey L. H., Capen R. G., Le Clerc J. A., Cereal Chem., 12 441, 1935.
83. Briggs D. R., Mann R. L., Cereal Chem., 27, 243, 1950.
84. Jones D. B., Gersdorff C. E. F., Johns C. O., Finks A. J., J. Biol. Chem., 53, 231, 1922.
85. Jones D. B., Finks A. J., Gersdorff C. E. F., J. Biol. Chem., 51, 103, 1922.
86. Santos Ruiz A., Serrano J. P., Rev. real. acad. cienc. exact., fis. y nat. (Madrid), 39, 41, 1945; C. A., 45, 3041, 1951.
87. Santos Ruiz A., Merino A. S., Anales fis. y quím. (Madrid), 42, 1147, 1946.
88. Osborne T. B., Am. Chem. J., 14, 629, 1892.

89. Smith A. K., Johnsen V. L., Beckel A. C., Ind. Eng. Chem., 38, 353, 1946.
90. Vassel B., Nesbitt L. L., J. Biol. Chem., 159, 571, 1945.
91. Fontaine Th. D., in Bailey A. E., ed., Cottonseed and Cottonseed Products, Interscience Publishers, New York, 1948.
92. Jones D. B., Csonka F. A., J. Biol. Chem., 64, 673, 1925.
93. Ильин Г. С., Всесоюзный Институт табачной и махорочной промышленности им. А. И. Микояна, № 109, 89, 1934; С. А., 28, 6453, 1934.
94. Johns C. O., Gersdorff C. E. F., J. Biol. Chem., 51, 439, 1922.
95. Santos Ruiz A., Sanz Muños M., Anales fís. y. quím. (Madrid), 43, 476, 1947.
96. Jones D. B., Gersdorff C. E. F., J. Biol. Chem., 75, 213 (1927).
97. Castañeda-Agulló M., Salázar V. P., Anales escuela nacl. cienc. biol. (Mex.), 5, 65, 1948.
98. Jones D. B., Gersdorff C. E. F., J. Biol. Chem., 56, 79, 1923.
99. Barker C., Hilditch T. P., J. Sci. Food. Agr., No, 4, 118, 1950.
100. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., 19, 487, 1887.
101. Smith A. K., Circle S. J., Brother G. H., J. Am. Chem. Soc., 60, 1316, 1938.
102. Smith A. K., Circle S. J., Ind. Eng. Chem., 30, 1414, 1938.
103. Smith A. K., Circle S. J., Ind. Eng. Chem., 31, 1284, 1939.
104. Smiley W. G., Smith A. K., Cereal Chem., 23, 288, 1946.
105. Bailey K., Trans. Faraday Soc., 38, 186, 1942.
106. Hall C. E., J. Biol. Chem., 185, 45, 1950.
107. Johnson P., Trans. Faraday Soc., 42, 28, 1946.
108. Polson A. G., quoted by Svedberg T., Nature, 139, 1051, 1937.
109. Bevilacqua E. M., Bevilaqua E. B., Bender M. M., Williams J. W., Ann. N. Y. Acad. Sci., 46, 309, 1945.
110. Svedberg T., Sjögren B., J. Am. Chem. Soc., 52, 279, 1930.
111. Svedberg T., Pedersen K. O., The Ultracentrifuge, Oxford University Press, Oxford, 1940.
112. Polson A. G., Kolloid-Z., 47, 87, 149, 1939.
113. Danielsson C. E., Ingelman B., Svensk Kem. Tid., 59, 162, 1947.
114. Krejci L., Svedberg T., J. Am. Chem. Soc., 56, 1706, 1934.
115. Säverborn S., Danielsson C. E., Svensk Kem. Tid., 55, 155, 1943.
116. Danielsson C. E., Acta Chem. Scand., 5, 541, 1951.
117. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., 20, 348, 1898.
118. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., 20, 410, 1898.
119. Danielsson C. E., Acta Chem. Scand., 4, 762, 1950.
120. Wetter L. R., McCalla A. G., Can. J. Res., 27, 96, 1949.
121. Jones D. B., Horn M. J., J. Agr. Res., 40, 672, 1930.
122. Johnson P., Dissertation Cambridge, 1941.
123. Irving G. W., Fontaine T. D., Warner R. C., Arch. Biochem., 7, 475, 1945.
124. Fontaine T. D., Irving G. W., Warner R. C., Arch. Biochem., 8, 239, 1945.
125. Johnson P., Trans. Faraday Soc., 42, 28, 1946.
126. Eriksson I. B., Quensel O., Svedberg T., Biol. Bull., 71, 498, 1936.
127. Brohult S., Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis [4], 12, No. 4, 1940.
128. Brohult S., J. Phys. Coll. Chem., 51, 206, 1947.

129. Johnson P., Naismith W. E. F., Disc. Faraday Soc., **13**, 98, 1953.
130. Briggs D. R., Mann R. L., Cereal Chem., **27**, 243, 1950.
131. Briggs D. R., Mann R. L., Cereal Chem., **27**, 258, 1950.
132. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., **20**, 419, 1898.
133. Lontie R., Panier A., Bull. soc. chim. biol., **33**, 532, 1951.
134. Chibnall A. C., Protein Metabolism in the Plant, Yale University Press, New Haven, Conn., 1939.
135. Lugg J. W. H., Advances in Protein Chem., **5**, 229, 1949.
136. Street H. E., Advances in Enzymol., **9**, 391, 1949.
137. McCalla A. G., Can. J. Res., **16**, 263, 1938.
138. Danielsson C. E., Acta Chem. Scand., **6**, 149, 1952
139. Bishop L. R., J. Inst. Brewing, **35**, 323, 1929.
140. Smith E. L., Greene R. D., J. Biol. Chem., **167**, 833, 1947.
141. Smith E. L., Greene R. D., J. Biol. Chem., **172**, 111, 1948.
142. Danielsson C. E., Lis H., Acta Chem. Scand., **6**, 139, 1952.
143. Rose W. C., Proc. Am. Phil. Soc., **91**, 112, 1947.

БЕЛКИ И БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН В РАСТЕНИЯХ

Ф. Стьюард и *Дж. Томпсон*

F. C. Steward and J. F. Thompson, «Proteins and Protein Metabolism in Plants» (vol. II, part A, pp. 513—594)

1. ВВЕДЕНИЕ. НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ПОНЯТИЯ

А. Общая экономия азота в организме растения

Особенностью процессов питания, характерной для большинства растений в отличие от животных, является способность растений синтезировать белок из неорганических соединений азота. Протеин, как показывает само его название, введение которого вначале приписывали Мульдеру (1839 г.) [1] (см. в работе Виккери [2, 3]), а в настоящее время—Берцелиусу [4, 5], является важной частью самой «живой материи», и в свете работ с N^{15} его следует считать не статическим веществом, а скорее веществом, которое в клетке и организме постоянно находится в процессе синтеза и распада [6].

Здесь уместно отметить противоположную организацию тел растения и животного. Тело животного организуется вокруг желудочно-кишечного тракта, который обеспечивает переваривание нежидкой пищи и экскрецию азотистых и прочих ненужных для организма веществ. Растения организованы так, что при минимальной специализации органов составляющие их клетки способны усваивать простые по составу и строению растворенные вещества. Такой организацией обусловливается азотный обмен в растениях. Только растения и даже лишь особые органы высших растений способны к тому, что можно определить как «первичный синтез белков», т. е. синтез азотистых соединений из неорганических веществ с образованием белков протоплазмы, тогда как обратный синтез белка из продуктов его распада (аминокислот и амидов) широко распространен как в растительных, так и в животных организмах. У растений такие продукты распада или отбросы не выделяются из организма в каких-либо значительных количествах, а в растворенном состоянии откладываются в качестве запасных веществ в вакуолях для дальнейшего использования.

1) ЗАПАСНЫЕ БЕЛКИ

Современные знания о составе растительных белков большей частью основываются на данных определения аминокислотного состава сравнительно немногих запасных белков. Виккери [2] дал

исторический обзор вопроса о составе растительных белков, начиная с классической работы Осборна, который впервые определил в 1871 г. содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот в белковых препаратах, полученных из семян люпина и сои. Эта работа подготовила путь доктрине о незаменимых аминокислотах для питания животных, сформулированной Осборном и Менделем в 1914 г. [7]. Современное состояние вопроса об определении аминокислотного состава очищенных белков рассмотрено в обзорной статье Тристрама [8] (см. также т. I, гл. III). В настоящее время для изучения белков применяются такие новейшие средства исследования, как метод дифракции рентгеновских лучей [9, 10] и электронная микроскопия [9, 11].

2) МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ БЕЛКИ

Сведения о метаболически активной белковой фракции ограничены. Критерии, по которым можно отличать метаболически активные белки от запасных или сравнительно малоактивных форм, являются скорее физическими, чем химическими. В настоящее время хорошо известно различие между менее активными фибриллярными и более активными глобулярными белками [9, 12—14], хотя это относится главным образом к животным клеткам. В связи с этим интересны попытки установить, в какой степени отличительные свойства глобулярного белка сохраняются, когда он «развертывается» на поверхности раздела вода—воздух [15], особенно в отношении сохранения ферментативной, гормональной и иммунной активности соответствующих белков [16].

Осборн [17] полагал, что метаболически или физиологически активные белки по своим свойствам отличаются от запасных веществ, встречающихся преимущественно в семенах. В одной из его работ ([17], стр. 8), находим следующие высказывания:

«О химических свойствах каких-либо растительных белков, за исключением белков семян, вполне достоверных данных имеется мало, так как белки, находящиеся в физиологически активных клетках и жидкостях растений, изучались недостаточно по той причине, что они встречаются в сравнительно небольших количествах и их трудно отделить друг от друга.

Таким образом, не весь белок в семени является запасным. В экстрактах из семян, кроме сравнительно большого количества явно запасного белка одного или двух типов, всегда содержится определенная небольшая часть белка, обладающего заметно иными свойствами... Исследование такого продукта показало, что эти белки, получающиеся лишь в незначительных количествах из всего семени, находятся в сравнительно больших количествах в муке из зародышей... и более сходны с физиологически активными белками животных тканей».

Затем Осборн ([17], стр. 9) обратил внимание на количество нуклеиновой кислоты, связанной с физиологически активным белком в противоположность запасному белку, и показал, что в зародыше пшеницы фактически отсутствуют белки, характерные для эндосперма (глиадин и глютелин), и, наоборот [18], в зародыше содержится извлекаемый солевым раствором глобулин ([18], стр. 115). Даже в этот сравнительно ранний период исследований белков было установлено, что физиологически более активные тканевые белки как растений, так и животных отличаются по своему составу от белков многих видов семян.

3) БЕЛКИ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ПЛЕНКАХ И МЕМБРАНАХ

После открытия лордом Релеем предельно тонких пленок на поверхности воды выяснилось, что белки обладают замечательной способностью распространяться на поверхности воды, так что 1 *мг* белка может покрыть 1,7 $м^2$ поверхности ([16], стр. 117). В этой форме, т. е. в виде растянутой пленки, основная полипептидная цепь белковой молекулы, лежащая на поверхности воды, кажется плоской. В соответствии с результатами исследования поведения белков в поверхностных пленках их считают теперь главными составляющими внешней поверхности оболочек растительных клеток [19]. Вследствие амфотерных свойств белки оказываются пригодными для образования участков, избирательно проницаемых для анионов и катионов, на мозаикоподобной поверхности клеточных мембран. Однако количество белка, необходимое для придания поверхности клеток таких свойств, должно быть невелико.

4) ГИПОТЕЗА КЛЕТОЧНОЙ МАТРИЦЫ ПРИ СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

Гипотеза клеточной матрицы при синтезе белков основывается на представлении о том, что синтез белков происходит фактически внутри или на поверхности растянутой пленки. Молекулы глобулярного белка достигают размеров порядка 20—100 Å в диаметре, тогда как нормальный радиус действия молекулярных сил обычно 4—5 Å. Отсюда следует, что синтез может легче происходить в тонкой пленке или на поверхности белка-матрицы. Образующаяся таким образом пленка представляет собой реплику матрицы, и превращение двухмерного белка в глобулярный происходит после удаления пленки с матрицы. При таком объяснении преобладание нуклеиновых кислот в тех системах, в которых происходит синтез белков или протоплазмы, по-видимому, указывает на то, что нуклеиновые кислоты обладают способностью определять природу поверхности матрицы. Этот взгляд до некоторой степени находит подтверждение в действии частиц вирусов, таких, как вирус мозаики табака, состоящих из нуклеопротеида, которые радикально

изменяют условия в месте синтеза белков, так что при этом образуется видоизмененный белок [120, 21]. Эти представления рассмотрел Гауровитц ([22], гл. XVII).

5) ОТЛОЖЕНИЕ РЕЗЕРВНОГО, ИЛИ ЗАПАСНОГО, БЕЛКА

Резервный, или запасной, белок в растениях может образовываться или отлагаться в эндосперме (как, например, в зернах злаков) или в семядолях (как у бобовых). Предпринимались действительно обнадеживающие попытки [22a] заменить в диете человека животный белок (молока) продуктами, приготовленными из тех семян и плодов, в которых содержится много белков. Такая замена обычно бывает ограничена недостаточным содержанием в этих белках лизина и метионина. Глобулины хорошо известных мясистых запасных органов, подобных клубню картофеля, корнеплоду моркови и пр., а также белки некоторых плодов следует считать по существу принадлежащими к категории резервных веществ.

Прорастание как альбуминозных, так и безальбуминозных* семян сопряжено с использованием запасов азотистых веществ. В альбуминозных семенах или плодах существенными органами накопления запасного питательного материала являются семядоли (как у гречихи *Fagopyrum* и клещевины *Ricinus*). У других альбуминозных семян или плодов (например, у зерен злаков) органом накопления является специальный поглощающий слой (щиток), который можно рассматривать эквивалентным семядоле. Особые приспособления, посредством которых эти поглощающие поверхности доставляют азотистые вещества для синтеза белков к растущему зародышу, могут представлять интерес для дальнейшего изучения. У безальбуминозных семян, например бобовых растений, накопление азотистого материала происходит уже в зародыше внутри семядолей, а в некоторых других случаях, как например у бразильского ореха, который содержит очень богатый аргинином белок ([118], стр. 118), органом накопления является ось зародыша.

Каким бы ни был механизм накопления, основные процессы распада белков в органе накопления и обратного синтеза их в растущих частях зародыша представляют одну из самых ранних открытых и исследованных стадий азотного обмена. Наблюдениями Пириа (1844 г.), значение которых вновь подчеркнул Виккери [23], было обнаружено превращение белка в аспарагин в прорастающих в темноте сеянцах вики, а в известной работе Шульце (1876 г.) было показано, что не менее 63,5% белкового азота в этиолированных сеянцах исчезает и снова появляется в виде аспарагина, который накапливается в количестве, равном $^1/_4$ сухого веса сеянцев (см. Чибнэл [24], стр. 17).

* Безальбуминозные семена—семена без эндосперма.—*Прим. ред.*

Недавно Браун [25] показал, что синтез белков в зародыше ячменя начинается одновременно с накоплением соединений азота. В продолжение 8—96 час. после прорастания семян наблюдается параллелизм между ростом зародыша, проявляющегося в увеличении размеров клетки, и количеством синтезируемого белка.

Уже в раннем периоде исследований было выяснено, что находящиеся в состоянии покоя почки ветвей деревьев и кустарников в известной степени подобны семенам. В развивающихся почках происходит распад белков, и в отличие от покоящихся почек в них часто образуется аспарагин, из которого в меристематической ткани точек роста вырабатывается белок (Бородин, цитировано по работе Чибнэла [24]). Следует отметить раннюю работу Щульце и Барбиери по изолированию свободного лейцина из почек конского каштана (*Aesculus hippocastanum*).

6) РОСТ МЯСИСТЫХ ЗАПАСНЫХ ОРГАНОВ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ

В некоторых мясистых запасных органах, например в яблоке, имеются клетки, которые после созревания больше не растут. Фаза первоначального роста органа преимущественно путем клеточного деления проходит очень быстро. Эта фаза продолжается от 30 до 35 дней после опадения лепестков и в климатических условиях Англии заканчивается в начале июня [27, 28]. В условиях Австралии фаза клеточного деления прекращается через 21 день после полного цветения [29]. По мере прекращения роста путем клеточного деления накопление растворимых в спирте азотистых соединений возрастает, и, после того как их количество достигает приблизительно 50% общего азота, накопление прекращается, плод же увеличивается и зреет ([30], рис. 30). В течение этого периода скорость дыхания на единицу белкового азота в яблоке остается исключительно постоянной ([31], рис. 42). Робертсон и Тарнер [32] также показали, что синтез белков в яблоке неуклонно продолжается и после уменьшения клеточного деления и происходит в течение всей фазы увеличения размеров клеток таким образом, что содержание белкового азота в клетке на единицу ее поверхности имеет тенденцию оставаться постоянным. Наблюдая другие свойства, а именно дыхание, можно заметить, что яблоко, когда оно начинает созревать или зреет, проходит дальнейший критический период, известный под названием кульминационного периода развития плода. Для кульминационного периода характерно возрастание скорости дыхания, сопровождаемое действительным увеличением количества белка за счет аспарагина [33, 34]. По окончании этого периода распад белка становится необратимым, и обмен растворимых соединений азота происходит в системе, в которой протоплазматическая организация постепенно распадается.

7) ВОЗОБНОВЛЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ

Однако рост и обмен веществ во многих других мясистых запасных органах (например, в клубнях картофеля и артишока) при их созревании лишь приостанавливается, но в дальнейшем рост возобновляется, как это можно видеть по клеточному делению, происходящему в тонких срезах, находящихся во влажном воздухе. В этих условиях запасы азотистых соединений (растворимый в спирте азот), из которых образуется новый белок, используются в клетках, где происходит его синтез [35]. Белки в таких покоящихся органах по существу следует отнести к категории запасных веществ, хотя новый белок, который синтезируется при возобновлении деления и роста клеток, очевидно, является метаболически более активным белком.

Однако более активная белковая фракция обычно находится в главных центрах роста вегетативных частей растений (в апикальных областях роста побегов и корней, в пазушных почках, в камбиальных слоях, где бы они ни находились, в интеркалярных областях роста, как у однодольных растений). Но здесь возникает более важная дилемма. Запасные белки семян или мясистых запасных органов, как и белки листа или, точнее, хлоропласта, обладающие специфическими функциями, можно получить почти в любом количестве. Попытки исследовать белки областей роста вегетативных частей растений казались гораздо более трудными. Робинсон и Браун [35а] проанализировали синтез белков, связанный с ростом клеток кончиков корней, на тех белках, которые можно распознать по их ферментативным свойствам. По-видимому, синтез белков продолжается в течение всего роста тканей путем увеличения размеров клеток, и содержание белков на одну клетку достигает максимума в тех участках, где осуществляется полное увеличение размеров клеток.

Поскольку некоторые вирусные белки можно изолировать в чистом состоянии и подвергнуть исследованию при помощи электронного микроскопа, они пригодны для решения этой задачи [11]. Можно ожидать, что растущие, но неорганизованные тканевые культуры будут давать белок, образующийся в усиленно растущих клетках, но, по-видимому, фракции общего белка* из таких источников отличаются некоторыми особенностями своего состава, в частности бóльшим содержанием в них оксипролина и пролина [36] (см. табл. 25а).

Деление ген, хромосом и ядер клеток, представляет одно из самых замечательных жизненных явлений. Здесь объединяются две проблемы, связанные между собой: проблема образования белкового

* Выражение «общий белок» означает все количество белка, находящееся в исследуемом объекте

вещества этих единиц и проблема точного дублирования их формы. По Касперссону ([37], стр. 99—100), воспроизведение генов и других самовоспроизводящихся групп в ядрах или в цитоплазме может происходить только в присутствии нуклеиновых кислот.

Б. Азотный обмен и дыхание

В отличие от большинства животных в растениях накапливается большой запас небелковых или растворимых в спирте азотистых соединений. В них находятся метаболиты в форме аминокислот и амидов, из которых синтезируется белок. Благодаря своему родству с кетокислотами ([24], стр. 188—195) эти растворимые соединения азота настолько тесно связаны с углеводным обменом и тканевым дыханием ([24], стр. 259), что углерод, отщепляющийся непосредственно от аминокислот (образующихся при распаде белка), рассматривается как часть выделяемой при дыхании углекислоты [38].

При изучении веществ в клубне картофеля Стьюард с сотрудниками [39, 40] установили более тесную взаимосвязь между синтезом белка и дыханием (при изучении действия на них различных солей и кислорода), чем между дыханием и содержанием сахаров в клетках. В случае растущих сеянцев Браун [25] также обнаружил более тесную взаимосвязь между дыханием и содержанием аминокислот, чем между дыханием и содержанием сахарозы. Другими словами, белки и возникающие в результате их распада растворимые соединения азота вовлекаются в процесс дыхания.

В. Современное развитие методов исследования

Исследование некоторых из описанных выше проблем стало возможным с разработкой новых методов исследования. Приготовление гомогенных белковых фракций посредством ультрацентрифугирования и электрофореза стало обычным методом. Указанные методы применяются и для выделения растительных белков [40a] (см. раздел 5). Прежние методы кристаллизации, такие, как кристаллизация трех глобулинов из семян бобовых [41], а также метод Самнера обработки белков ферментом уреазой [42], подготовили применение электронного микроскопа для исследования белков. Объектом исследований макромолекул белка, видимых в электронном микроскопе ([111], стр. 9), были другие глобулины, например эдестин, имеющий частицы приблизительно сферической формы диаметром около 70 Å. Техника разделительной хроматографии [42a, b, c] как на колонках [43], так и на бумаге [44] дает новые мощные методы количественного и качественного исследований белковых гидролизатов и белков [45, 46]. Для разделения небольших количеств белков недавно был применен электрофорез на бумаге [46a, b].

Использование ионообменных смол для анализа продуктов гидролиза белков [46c], для изолирования соединений азота [46d, e] и для разделения белков [46f] является весьма перспективным. Как недавно показали Томпсон и Стьюард [47], в настоящее время можно определять аминокислотный состав небольших количеств чистых белков методами, основанными на бумажной хроматографии. Совершенно очевидно, что эти методы дают возможность понять, каким образом сочетаются белки в растущих клетках растения. Очевидно также, что теперь можно узнать многое о белке растения, не прибегая к его разделению на гомогенные фракции.

Посредством распределительной хроматографии на бумаге [48] было установлено наличие в растениях неожиданно большого числа веществ, реагирующих с нингидрином, и хотя они не являются составными частями белковой молекулы, их все же приходится принимать во внимание, если рассматривать весь обмен веществ в целом, частью которого являются белки и их синтез.

Наконец, благодаря применению N^{15} и других радиоактивных изотопов стало возможным более глубокое изучение обмена веществ в растениях, кульминационным пунктом которого является синтез белков. Замечательными примерами являются применение C^{14} и P^{32} к зеленым растениям, в которых осуществляется фотосинтез, и сочетание хроматографии на бумаге и радиографии для обнаружения радиоактивных соединений [49, 50]. Этими методами были получены данные, которые представляют интерес для объяснения как белкового обмена, так и фотосинтеза, и дают многочисленные доказательства тесной взаимосвязи обеих этих сторон обмена веществ [51]. Изотоп S^{35}, применяемый в форме $S^{35}O_2$ или $S^{35}O_4^{2-}$, легко включается в состав белков растений, и его можно также обнаружить при хроматографии и радиоавтографии белкового гидролизата. Потенциальные возможности этой методики были выявлены при обследовании люцерны [52].

Свойства, поведение и роль в обмене веществ белков растений, не входящих в состав семян, будут рассмотрены в этой главе с точки зрения изложенных выше общих понятий и представлений.

2. БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Подробный исторический обзор материала по данному вопросу не является основной целью настоящей главы. Это сделано в известной книге Чибнэла [24] и в обзорной статье Виккери с сотрудниками [23]. В обзорах Найтингейла [53—55], Стрита [56, 57] и Мак-Ки [58, 59] имеются ссылки на работы, в которых излагается история развития исследований белкового обмена, в других же обзорах более полно представлены новые работы [48, 66].

Можно отметить следующие этапы в истории развития учения об азотном обмене в растениях.

А. Классический период

Чибнэл привел документальные данные о том, что начало классического периода исследований азотного обмена в растениях следует отнести к началу XIX в. В течение прошлого века среди экспериментальных работ преобладали исследования семян и их прорастания, а также развития ростков и листьев. Вследствие сравнительно раннего открытия аспарагина (в 1806 г., подробный отчет об этом открытии см. в работе Стрита и Триза [60]) и глутамина (в 1883 г., см. у Чибнэла [24], стр. 14) им приписывалась преобладающая роль в азотном обмене. Попытки объяснить азотный обмен достигли завершающей стадии в работах Шульце ([61], стр. 641), отводившего амидам основное место в азотном обмене, которое за ними и сохраняется с тех пор. Шульце считал аспарагин главным конечным продуктом распада белка и основным исходным веществом для его обратного синтеза (Чибнэл [24], стр. 15—53; Виккери с сотрудниками [23], стр. 762—767; [62], стр. 115—126). Согласно Шульце [61], первичными продуктами распада белков являются аминокислоты, но они подвергаются вторичному разложению до «богатых азотом остатков», которые после открытия окислительного дезаминирования *in vitro* были отождествлены с аммиаком ([61], стр. 641). Из богатых азотом остатков образуется аспарагин, являющийся главной формой, в которой азот подготавливается к синтезу и перемещается в организме растения. Предполагалось, что из аспарагина белок синтезируется легче, чем из аминокислот, и что в некоторых растениях (например, в Cruciferae) аналогичную роль играет глутамин. Когда белок синтезируется *de novo* из внешних источников азота, углеводы доставляют углеродный остов для образования аспарагина, а в дальнейшем—для образования белка.

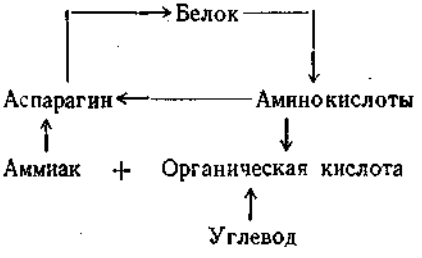


Схема Шульце



Схема Прянишникова

После исследований Э. Фишера, работавшего с 1899 по 1906 г. с белками и получившего аминокислоты гидролизом белков и полипептиды—синтезом из аминокислот, Прянишников представлял белковый обмен несколько иначе, считая амиды (аспарагин и глутамин) источником растворимого азота, в виде которых он перемещается в организме растения. По его мнению, амиды образуются

из аминокислот и дают начало аминокислотам, которые являются непосредственными участниками в процессах синтеза и гидролиза белков. По Прянишникову, амиды образуются всякий раз, когда количество аммиака становится избыточным по сравнению с углеводами, и, таким образом, образование амидов становится средством обезвреживания аммиака (эти превращения изображены на схемах в работе Вильсона [63]).

С этого начинается новый период успешных исследований и теоретического истолкования белкового обмена в растениях.

Б. Новый период

1) КЕТОКИСЛОТЫ И СВЯЗЬ МЕЖДУ АЗОТНЫМ И УГЛЕВОДНЫМ ОБМЕНОМ

Чибнэл [24] отчетливо представлял, что главными рецепторами азота являются кетокислоты, которые, будучи основными промежуточными продуктами распада углеводов и процесса дыхания, представляют собой главные звенья между азотным и углеводным обменом. По новым данным, α-кетоглутаровая и щавелевоуксусная кислоты, являющиеся промежуточными продуктами цикла карбоновых кислот, ведут к образованию соответственно глутаминовой и аспарагиновой кислот и представляют два важнейших «входа» для азота, идущего на образование белка.

2) АММИАК ИЛИ ГИДРОКСИЛАМИН

Прянишников (см. у Чибнэла [24], стр. 75 и 103) считал аммиак альфой и омегой азотного обмена у растений—центром, вокруг которого вращается белковый обмен, так как аммиак является конечным продуктом распада белка и исходным веществом для его синтеза.

Приняв во внимание представления, развитые ранее в отношении фиксации азота (см. у Вильсона [63], стр. 172—178), Виртанен высказал мнение, что центральную роль в азотном обмене, по крайней мере в аэробных организмах (*Rhizobium*, *Azotobacter*), играет гидроксиламин, но, очевидно, не в тех случаях, когда фиксация азота происходит в анаэробных условиях, как например у *Clostridium* [64]. Согласно такому представлению, аминокислоты возникают путем восстановления оксимов, главным образом оксиминоянтарной кислоты, в результате чего образуется аспарагиновая кислота, а из нее путем переноса аминогрупп—глутаминовая кислота. С этой точки зрения аспарагиновая и глутаминовая кислоты являются «Grundaminosäuren»* азотного и белкового обмена в растениях.

* Основными аминокислотами.

Переаминирование как общая реакция (см. у Коэна [65]) способствует образованию других аминокислот путем переноса аминогрупп от дикарбоновых аминокислот независимо от их происхождения—из NH_4 или из NH_2OH.

3) АСПАРАГИН ИЛИ ГЛУТАМИН

Согласно представлениям Шульце и Прянишникова, между ролью аспарагина и ролью глутамина нет большого различия, за исключением того, что в одних случаях какое-либо из этих веществ может преобладать в данном организме, в других же оба эти вещества могут присутствовать в сравнимых количествах. На основании результатов работы, проведенной главным образом с бобовыми растениями, табаком и нарциссом, Виккери ([23], стр. 823, а также другая цитированная литература; см. также Стьюард и Стрит [66], стр. 479, и Стьюард и Томпсон [48], стр. 252) подверг сомнению высказанное предположение о том, что глутамин и аспарагин играют одинаковую роль и могут заменять друг друга. На основании многочисленных данных относительно влияния света и темноты на амиды в листьях растений и соответствующих ответных реакций при питании их нитратами и аммиаком Виккери [67] пришел к следующему выводу: «Таким образом, это свидетельствует о том, что оба амида играют несколько различную роль в процессах обмена в листьях этого вида растений (нарцисса), и такой вывод находится в соответствии с результатами, полученными для растений табака». Если наблюдается такое различие, то аспарагин, по-видимому, бывает более тесно связан с распадом белков в темноте и с обезвреживанием аммиака, а глутамин—с синтезом белков, особенно на свету. Просматривая литературу по этому вопросу вплоть до самых последних работ, можно заметить, что и другие авторы (Стьюард и Стрит [66], стр. 479—480, Стьюард и Томпсон [48], стр. 252, Стьюард и Престон [35], стр. 47, а также другие цитированные ими работы) подтверждают вывод Виккери [23], указывая на противоположное физиологическое поведение обоих амидов. Здесь следует отметить, что Христиансен и Тиманн ([68], стр. 127) в исследованной ими системе (изолированные сегменты стебля гороха) были склонны связать наличие аспарагина скорее с синтезом белков, чем с их протеолизом. Стьюард и Томпсон [69] высказывали сомнения, что глутамин и аспарагин, судя по их свойствам, являются строгими гомологами, и предположили, что аспарагин имеет циклическую структуру (см. раздел 6).

Однако глутамину и глутаминовой кислоте продолжают придавать в обмене веществ все более важное значение, так как их может использовать, по-видимому, большинство организмов, в то время как использование аспарагина наблюдается больше у растений (и, вероятно, лишь у некоторых), а из высших животных—только

у жвачных, в рубце которых для этого имеется особая бактериальная флора. В настоящее время проблема белкового обмена сосредоточивается на весьма важном ферментативном синтезе [70—74] глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака, для чего требуется энергия, заключенная в аденозинтрифосфате (АТФ). Согласно интересному представлению Хэйниса [75, 76], энергия γ-глутамиловой связи в таких пептидах, как глутатион, может играть важную роль в передаче аминокислотных остатков и энергии для образования пептидных звеньев путем процесса транспептидации (см. т. III, ч. 2).

4) АМИНОКИСЛОТЫ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ

Выделить встречающиеся в растениях аминокислоты и доказать, что они присутствуют в свободном состоянии во всех растениях, представляет большие трудности в связи с тем, что очень сложно отделить друг от друга многие вещества, часть из которых содержится лишь в небольших количествах. Как отметил Чибнэл, Шульце ([61], стр. 626) в заключение своего фундаментального исследования мог сообщить о присутствии в свободном состоянии в растениях десяти из всех известных в то время продуктов гидролиза белков, кроме двух амидов: аспарагина и глутамина. В дополнение к этому Чибнэл [24] в 1939 г. получил лишь данные о наличии глицина [77] в сахарном тростнике и аланина и серина [78] в растениях *Medicago sativa*. Однако только после применения метода распределительной хроматографии, особенно на бумаге [44], стало возможным установить присутствие [79] и определить [80, 81] в одном и том же растении одновременно весь набор находящихся в нем аминокислот. Несмотря на неполноту данных о наличии аминокислот и некоторую неточность методов их количественного определения, было сделано много попыток связать регулирующую синтез белков деятельность с аминокислотами, а не с амидами, как это представлял себе Шульце (см. обзоры Петри [82] и Вуда [83]).

5) ЗАПАСЫ УГЛЕВОДОВ И РОЛЬ ДЫХАНИЯ

Как показывают упрощенные схемы, приведенные на стр. 224, Шульце и Прянишников считали, что из углеводов образуется углеродный остов, из которого при участии аммиака синтезируются аминокислоты и (или) амиды. По новым данным и согласно представлениям Чибнэла [24], органические кислоты, принимающие участие в синтезе аминокислот, должны быть кетокислотами. Регулирующее воздействие углеводов и их аэробного обмена на синтез белков широко изучалось в двух направлениях.

Если сахара адэкватны по своим питательным качествам, то они оказывают на белок «оберегающее действие», благоприятствуя

его синтезу, который при этом становится пропорциональным имеющемуся в наличии азоту (аммиак). В этом заключалась основная идея рассмотренной Чибнэлом ([24], стр. 246, 249) гипотезы Пэха.

Поскольку процесс синтеза белков требует энергии для образования пептидных связей, то усиленное дыхание было поставлено в связь с поддержанием высокого содержания белков. Эта связь может принимать различные формы. Одна из них, по теории Грегори и Сена [38], принятой другими исследователями [39, 84], состоит в том, что частично дыхание может происходить таким путем, что двуокись углерода образуется из дезаминированных остатков аминокислот, и освобождающиеся таким путем аминогруппы снова синтезируются в белок при использовании углеродного остова, образующегося непосредственно из сахара. Другая форма связи заключается в том, что синтез АТФ при аэробном окислении углеводов (около 48 молей АТФ на 1 моль глюкозы) может дать энергию для синтеза белковой молекулы.

Из всех неразрешенных проблем биологии и биохимии важнейшей, может быть, все еще остается выяснение механизма синтеза белков и выполнение этого синтеза *in vitro*. Более новые работы, которые теперь предстоит рассмотреть, связаны непосредственно с двумя рассмотренными выше главными линиями исторического развития проблемы белкового обмена в растениях.

3. БЕЛКИ И БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН В ОРГАНИЗМЕ РАСТЕНИЯ

А. Белковый и небелковый азот в растущих клетках и клетках, находящихся в покое

В этом разделе под названием небелкового (растворимого) азота подразумеваются те азотистые соединения, которые экстрагируются 70—80-процентным спиртом или трихлоруксусной кислотой, а белковым азотом называются соединения, не растворяющиеся в этих растворителях.

В растениях количественное отношение растворимого азота к белковому может сильно варьировать (см. раздел 6). Широко обобщая, можно сказать, что в усиленно растущих клетках растворимый азот содержится в небольшом количестве по сравнению с белковым, и, напротив, в тех клетках или органах, которые остаются мясистыми и играют роль находящихся в покое запасных органов, содержится большее количество растворимого азота, чем белкового.

В клубнях картофеля количественное отношение растворимого азота к белковому выражается как 2 : 1. Отмечен только один случай [85], когда при стимулированном росте части картофельного клубня и образовании тканевой культуры указанное отношение стало

равным 1 : 2. Превращение растворимого в спирте азота в нерастворимый (нерастворимый также и в трихлоруксусной кислоте) азот наблюдалось в тонких ломтиках картофеля в различных условиях, особенно под действием влажного воздуха или аэрированных растворов, когда возобновлялся процесс деления клеток. Синтез в этой ткани уменьшается при определенной обработке раствора, например при недостатке кислорода в аэрирующем газе [39], при наличии в потоке воздуха свободной двуокиси углерода, а в самом растворе—бикарбоната [86] или при добавлении к раствору солей кальция [40]. Ее способность к синтезу повышается под действием солей калия [40], нитратных [40] и фосфатных ионов [86]. Однако продолжительная выдержка ткани при низкой температуре [87] уничтожает способность клеток, находящихся в соприкосновении с воздухом, делиться и образовывать феллоген, а также синтезировать белок и аккумулировать соли при погружении ткани в раствор. Эти данные свидетельствуют о том, что при возобновлении роста и деления клеток картофельного клубня, ранее находившихся в покое, в них возрастает количество белкового азота.

До некоторой степени сходный случай представляет опыт с тканью корнеплода моркови, успешно культивировавшейся путем добавления ростовых веществ, находящихся в молоке кокосового ореха [88, 89], в незрелых зернах кукурузы [88, 90] и в других источниках, содержащих питательные вещества для зародышей [90]. В культивируемых клетках, находящихся в состоянии быстрого роста, также содержится больше белкового азота, чем в покоящейся ткани, из которой они были взяты [89]. Количественное отношение растворимого в спирте азота к белковому азоту в находящейся в покое ткани корнеплода моркови выражается величиной порядка 3 : 2, а в быстрорастущих клетках культивируемой ткани оно приблизительно равно 1 : 2.

Шульце и Кастоpo [91] установили, что количественное отношение небелкового азота к белковому в семядолях белого люпина (*Lupinus albus*) равно 2,2, в плюмулах—0,6, в стебле—3,3 и в корнях выращенных на свету однодневных сеянцев—1,9. Это отношение оказалось наименьшим в ткани с самым быстрым ростом—в плюмуле. У более взрослых сеянцев с почти исчерпанным запасом питательных веществ в семядолях это отношение понижается. У люпина в возрасте 30 дней оно составляло 0,54 для листьев и стебля и 0,65 для корней.

Особый интерес представляет исследование азотистых соединений в точках роста растений. При первом таком исследовании методом хроматографии Уэтмор и Нич получали срезы кончиков корней некоторых растений, а Стьюард с сотрудниками [92] исследовал затем эти кончики хроматографически. При этом в области роста можно было обнаружить почти полный набор аминокислот, что находится в резком противоречии с данными Олсопа [93].

Несколько неожиданным было как найденное количество растворимого азота в очень молодых листьях, особенно люпина, так и присутствие в них аспарагина. Но с приближением к точке роста концентрация аспарагина, являющегося наиболее важным растворимым азотистым соединением, заметно понижалась. Эти растворимые соединения, очевидно, образуются в семядолях и достигают точек роста быстрее, чем они могут быть использованы.

Результаты этих исследований подтверждаются другими данными, которые показывают, что в делящейся клетке баланс между растворимым и белковым азотом значительно смещается в сторону белкового азота. Кроме того, влияние ростового фактора из молока кокосового ореха на синтез белка в тканевых культурах корнеплода моркови наводит на мысль, что в кокосовом молоке, возможно, существует целая группа факторов, стимулирующих синтез белков в клетках. Можно также предположить, что в нормальном ходе развития активность этого вещества регулируется ингибиторами [94].

Б. Синтез белков во время роста путем клеточного деления и посредством увеличения размеров клеток

Этот вопрос уже был кратко рассмотрен [48, 66] с указанием относящейся к нему литературы. В экспоненциальной фазе роста *Chlorella*, т. е. при максимальной скорости деления каждой клетки, белок синтезируется в большом количестве, которое затем снижается и с прекращением роста становится незначительным [95]. Нередко допускалось, что синтез протоплазмы в целом, а следовательно и синтез белков, происходит более заметно в делящихся клетках, тогда как в стадии роста путем увеличения размеров клеток (цитологически в стадии «покоя» или интерфазы клеточного ядра) синтез белков фактически прекращается. Такие представления в настоящее время, очевидно, следует признать неправильными [96].

Фрей-Висслинг и Блэнк [97], взявшие в качестве объекта исследования колеоптиль трав, показали, что при увеличении размеров его клеток в них происходит усиленный прирост абсолютного количества общего белка, так как к концу роста клеток его содержание в 9,5 раза превышает исходное. К такому же общему выводу приводят и результаты работы Брауна с зародышами ячменя [25]. Браун обнаружил, что в интервале времени от 8 до 96 час. после прорастания увеличение размеров клеток является доминантной фазой роста зародыша; при этом в клетках происходит накопление сухого вещества и белка. Именно в этой стадии Браун установил более тесную связь между дыханием и количеством аминокислот, чем между дыханием и количеством сахаров (см. раздел 7). Браун и Риклесс [98] разработали

остроумную методику, которая позволяла проследить за процессом деления и увеличения размеров клеток в изолированных кончиках корней, и показали, что размеры клеток увеличиваются в зависимости от поступления таких питательных веществ, как NO_3^-, SO_4^{2-} и $H_2PO_4^-$, и имеются основания предполагать, что эта фаза роста находится в зависимости от синтеза белка из сахара и солей (ср. работу Робинсона и Брауна [35а]). Христиансен и Тиманн [68] также полагают, что рост путем увеличения размеров клеток сопровождается синтезом белков.

В. Синтез белков в листьях и его связь с развитием растения

Порядок, в котором листья образуются у верхушек побегов покрытосемянных растений и проходят ряд последовательных совершенно определенных морфологических изменений после возникновения в виде зачатков, служит достаточным доказательством того, что такой рост осуществляется сложным и точно регулируемым путем. Конечно, это не может не отражаться на белковом обмене в листьях и на его связи с развитием растения. Однако в этой области проделано очень мало систематических исследований.

В противоположность тому, что наблюдается в мясистых запасных органах [35], соотношение между растворимым и белковым азотом в листьях стебля на свету сильно сдвинуто в сторону белкового азота. Если сравнить листья лука, в которых происходит фотосинтез, с «листьями» или «чешуйками» луковицы, где накапливаются запасные вещества, то можно установить, что в зеленых листьях содержится больше белкового азота, а в луковице—больше растворимого азота [99]. Листья вегетативных растений картофеля отличаются тем, что азотистые вещества в них содержатся преимущественно в форме белка [100]. Недавно полученные данные о растении мяты [101] показывают, что растворимые в спирте азотистые соединения в листьях этого растения могут составлять менее 10% общего азота.

В листьях некоторых однодольных растений [102] синтез белков локализуется в интеркалярной области роста у основания листа и в области, расположенной непосредственно над ней. Синтезы белков и протоплазмы, следующие за синтезом углеводов (т. е. фотосинтезом), являются двумя фазами нормального онтогенетического развития каждого отдельного листа таких растений. Это согласуется с данными Бурстрёма [103] о том, что в молодых листьях (*длиной 11 см*) растений пшеницы количественное отношение C/N, равное 4,6, ниже, чем в более старых (длиной 20 *см*), где оно составляет 17,6. Одновременно с ростом листа и увеличением количества общего азота понижается относительное содержание в нем

белка (содержание белкового азота в процентах от общего азота) [104]. Кроме того, когда лист переходит из состояния роста путем клеточного деления в состояние зрелости, меняется и природа синтезируемого белка [92, 104]: вместо белка, богатого основными азотистыми компонентами, такими, как нуклеопротеиды, синтезируется белок, сравнительно бедный этими фракциями. Уокли и Петри [105] также отметили, что синтез белков ослабевает с возрастом растения.

В зеленых листьях чередование света и темноты и периодическая смена то нитрата, то аммиака как источников азота, по-видимому, более благоприятны для синтеза белкового, чем для синтеза растворимого азота (обобщение см. у Стьюарда и Стрита [66], стр. 473—474); наиболее губительно действует на срезанные листья продолжительное нахождение их в темноте, вызывающее распад белков даже в том случае, когда листья снабжаются извне питательными веществами (сахара и нитраты).

Обстоятельное изучение этого предмета (см. цитированную литературу у Лагга [106], стр. 281) допускает только одно заключение, а именно, что постепенный распад белков, который происходит в срезанных листьях в темноте, некоторым образом задерживается или регулируется в листьях, связанных со стеблем. Согласно предположению Чибнэла [24], поддержанному Лаггом [106] и Виккери ([67], стр. 86), это обусловливается регулирующим действием гормонов. Поскольку имеется возможность видоизменять азотный обмен в срезанных листьях, снабжая их гормонами, можно признать с достаточной уверенностью ([66], стр. 474), что обычные «системы растительных тканей обладают различной способностью к синтезу белков, который находится в тесной связи с их ростом и развитием». Основное свойство листьев состоит в том, что, когда они лишаются связи с остальным организмом растения и не получают от него стимулов роста, их способность расти ограничивается. Однако зрелый лист на стебле способен обратимо функционировать как орган синтеза вторичного белка—белка, который непосредственно не сопутствует росту, но который может гидролизоваться, быть перенесенным в другие области роста (цветы и семена) и затем заменяться новыми белками.

4. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИИ В ЦЕЛОМ

А. Введение

1) АМИНОКИСЛОТЫ, ПРИЗНАВАЕМЫЕ ПРОДУКТАМИ ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ

Продуктами гидролиза белков общепринято считать следующие аминокислоты: аспарагиновую и глутаминовую кислоты с их амидами, цистин—цистеин, метионин, серин, треонин, глицин, фенил-

аланин, триптофан, пролин и оксипролин. Посредством распределительной хроматографии на бумаге дополнительно были обнаружены и отнесены к продуктам гидролиза особых белков следующие три аминокислоты: 1) α,ε-диаминопимелиновая кислота из *Corynebacterium*, из *Mycobacterium tuberculosis* [107, 108], из токсина *Pseudomonas tabaci* [108a] и из некоторых сине-зеленых водорослей*; 2) α-аминоадипиновая кислота из белков эндосперма кукурузы и из *Aspergillus oryzae* [109]; 3) саркозин из белка арахиса [110]. В качестве продуктов гидролиза белков изредка встречаются следующие соединения: иодгоргоновая кислота (дииодтирозин), тироксин из щитовидной железы, дибромтирозин из коралловых полипов и оксилизин из желатины.

Кроме того, продуктами гидролиза белков считались многие другие вещества. Однако оксиглутаминовая, диаминоглутаминовая, диаминоадипиновая, оксиаспарагиновая и диоксидиаминосубериновая кислоты, норлейцин, норвалин, оксивалин, окситриптофан и диоксипирролаланин, по-видимому, не являются продуктами гидролиза [111].

2) АНАЛИЗ ОЧИЩЕННЫХ БЕЛКОВ

Недавно было опубликовано несколько обстоятельных обзоров литературы по вопросу анализа наиболее характерных и очищенных белков (см. также т. I, гл. III) [8, 22, 47, 112]. В обзорных работах Тристрама [8] и Блока и Боллинга [112], как и в обзорах Виккери [2, 3], проблема белка рассматривается с точки зрения аналитической химии; при этом высказаны соображения относительно экстрагирования белков и их характеристики. Аминокислотный состав белковой фракции растений недавно вновь рассмотрел Лагг ([106], стр. 236—237), который пришел к следующему заключению: «1) Состав общего белка в листьях растений какого-либо одного вида, вероятно, изменяется лишь в небольшой степени в зависимости от почвенных и климатических условий и от возраста ткани (в упомянутых уже возрастных пределах); 2) аминокислотный состав белков растений разных семейств, по-видимому, несколько различен, но в некоторых случаях эти различия могут быть вполне определенными, например сравнительно низкое содержание цистеина (или цистина) и метионина в бобовых...» Такое утверждение является несколько неожиданным с точки зрения прежних выводов о том, что серологические тесты могут оказаться полезными при таксономической классификации.

---

* Уорк и Дьюи [108 b] рассмотрели отношение α, ε-диаминопимелиновой кислоты к другим веществам, отметив, что она может декарбоксилироваться до лизина и находиться не в метаболических, а в строительных белках.

Б: Данные некоторых анализов общего белка из растений разных семейств

Собранные Лаггом [106] данные о составе белков различных семейств покрытосемянных являются полными только для бобовых и злаковых растений. Метод количественной хроматографии на бумаге [80, 81], который, как это было показано [47], дает хорошие результаты при определении аминокислот в белковых гидролизатах, применялся [101] для анализа нерастворимой в спирте азотистой фракции одного из представителей губоцветных растений (*Mentha piperita*). Были исследованы листья, стебель и корни

Таблица 25

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОБЩЕГО БЕЛКА РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Все данные представляют содержание аминокислотного азота от общего азота белка (в %)

Аминокислота	Бобовые (листья) [106]	Злаковые (листья) [106]	Губоцветные (листья)	*M. piperita* [101]		Тюльпан (*Tulipa*) [116] (чешуя луковицы)
				стебли	корни	
Глицин	—	0,4	0,0	0,0	0,0	9,4
Аланин	—	4,4—5,1	12,5	15,8	12,3	2,8
Валин	4,5	3,3—4,2	8,2	10,9	9,1	3,1
Лейцин	7,3	7,8—8,8	22,6	28,8	19,4	4,7
Изолейцин	3,6					
Фенилаланин	2,4	2,5—2,6	—	—	—	0,1
Цистин	1,1—1,3	1,3—1,5	—	—	—	0,7
Метионин	1,4—1,6	3,0	3,0	2,8	3,5	0,1
Тирозин	2,3—2,6	2,3—2,5	4,6	3,1	2,0	0,1
Триптофан	1,6—1,9	1,8—2,1	—	—	—	—
Аргинин	13,0—14,0	13,7—14,3	5,9	1,6	4,7	47,7
Гистидин	3,8—4,0	3,6—3,7	—	—	—	—
Лизин	6,4—6,5	6,3—6,6	4,8	2,3	3,0	7,8
Аспарагиновая кислота	4,7—5,4	4,9—5,4	4,4	14,6	18,0	8,1
Глутаминовая кислота	6,4—6,7	6,6—7,8	16,6	13,3	6,0	5,7
Пролин	—	3,1	4,5	Следы	5,3	4,5
Оксипролин	—	—	0,02	Следы	3,5	—
Треонин	4,0	3,0	0,0	0,0	0,0	1,1
Серин	—	—	12,9	8,3	13,2	3,9
Амид	5,1—5,3	4,7—5,3	—	—	—	—

этого растения. Собранные Лаггом [106] данные занимают часть табл. 25. Фауден [113] представил подробные данные о составе нерастворимой в эфире—спирте азотистой фракции из *Chlorella* и сравнил их с аналогичными данными, полученными для дрожжей [114], и с данными Лагга для злаковых. В табл. 25 и 25а все эти данные сопоставлены с некоторыми результатами анализов общей

Таблица 25а

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОБЩЕГО БЕЛКА РАЗЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Все данные представляют содержание аминокислотного азота от общего азота белка (в %)

Аминокислота	*Chlorella vulgaris* [113]	Пивные дрожжи [114]	Паслёновые: клубни картофеля, сорт «Себаго» [47]	Паслёновые: клубни картофеля, сорт «Катадин» [36]	Паслёновые: клубни картофеля, активная тканевая культура сорта «Катадин» [36]	Зонтичные: корнеплод моркови [36]	Зонтичные: активная тканевая культура [36]	Крестоцветные [122] (репа, запасной орган)	Розоцветные[a] [115] (яблоко)
Глицин	6,2	8	6,5	7,6	6,7	8,9	7,7	0,3	6,4
Аланин	7,7	10	6,2	7,1	6,6	7,6	8,0	3,6	—
Валин	5,5	8	5,9	6,7	5,8	8,1	7,8	7,5	4,8
Лейцин	6,1	6	11,7	13,6	12,0	18,2	13,5	6,1	6,4
Изолейцин	3,5	4							
Фенилаланин	2,8	1,6	6,7	7,8	5,8	5,9	2,8	2,4	3,2
Цистин	0,2	0,9	—	—	—	—	—	—	1,5
Метионин	1,4	0,5	0,9	1,0	1,4	0,56	0,81	—	1,8
Тирозин	2,8	2	1,9	2,2	4,0	2,9	2,5	—	—
Триптофан	2,1	0	—	—	—	—	—	1,4	0,0
Аргинин	15,8	10	12,0	14,0	11,8	5,0	7,0	6,4	12,0
Гистидин	3,3	8	—	—	—	—	—	5,2	4,8
Лизин	10,2	9	9,6	11,2	13,6	6,1	5,5	5,3	8,3
Аспарагиновая кислота	6,4	8	7,9	9,2	7,0	9,6	9,3	4,7	4,0
Глутаминовая кислота	7,8	10	8,7	10,2	8,0	11,5	9,0	1,9	5,0
Пролин	7,2	3	2,7	3,1	3,9	3,4	7,1	3,2	5,4
Оксипролин	—	—	—	0,0	4,8	3,6	9,2	—	—
Треонин	2,9	7	2,3	2,6	3,2	3,4	4,7	—	3,7
Серин	3,3	4	3,1	3,6	5,5	5,5	5,2	—	5,0
Амид	6,1	—	14,0	—	—	—	—	—	—

[a] Пересчитаны из данных Дэвиса, Феллерса и Эсселена [115].

белковой фракции из активно растущих тканевых культур [36] (из корнеплода моркови и клубня картофеля) и с некоторыми данными о белке яблока [115] для сравнения с белком ткани из запасных органов, находящихся в покое. Эти данные обозначают количество азота, соответствующее каждой аминокислоте, выраженное в процентах от общего азота, содержащегося во всей белковой фракции.

Как установил Лагг, в листьях исследованных видов бобовых и злаковых растений содержится белок весьма близкого состава. Можно предположить, что в случае мяты на хроматограмме фракция [101], отождествляемая с лейцином, содержала некоторое количество фенилаланина, и, следовательно, данные для лейцина будут завышенными. Возможно также, что в сериновой фракции имелась небольшая примесь глицина, который еще не был обнаружен в растениях мяты ни в свободном, ни в связанном виде. Отдавая этому должное внимание, следует все же считать, что состав общего белка листьев мяты определенным образом отличается от состава белков листьев других растений, данные о которых приводит Лагг. Например:

а) треонин не обнаружен в продуктах гидролиза белков листьев мяты, и действительно он вовсе не был найден в мяте;

б) листья мяты богаче серином, чем листья других растений; наличие серина в белках листьев не отмечено Лаггом, хотя значительно раньше его обычно находили в гидролизатах белков [18]. Поэтому возникает вопрос, действительно ли эти две оксиаминокислоты всегда находятся в белках листьев или же их роль в белковых фракциях различных растений может быть иной;

в) белок листьев мяты значительно богаче глутаминовой кислотой, валином, лейцинами и аланином;

г) общий белок листьев мяты беднее основными аминокислотами—аргинином и лизином, чем общий белок листьев других упомянутых растений.

В. Некоторые данные хроматографического анализа общей белковой фракции

Аминокислотный состав белковых фракций листа, стебля и корня мяты в общем один и тот же, хотя имеется одно важное различие. В белке листа больше глутаминовой кислоты, чем аспарагиновой; для корня характерно обратное соотношение, а стебель занимает в этом отношении промежуточное положение—обе кислоты содержатся в его белке приблизительно в одинаковом количестве. Возможно, это свидетельствует о том, что более важную роль в синтезе белка в листьях на свету играет α-кетоглутаровая кислота, а в корне—щавелевоуксусная кислота. В белке стебля обнаружен заметный недостаток основных аминокислот.

В табл. 25 включены данные об аминокислотном составе общего белка чешуек луковицы тюльпана [116]. Эти данные были получены также методом количественной хроматографии [80, 81]; они соответствуют более чем 80% белкового азота, определяемого по методу Кьельдаля, хотя гистидин и триптофан при этом не были обнаружены. Эти данные включены в таблицу потому, что они резко отличаются от данных для наземных листьев и запасных органов, хотя чешуйки луковицы являются видоизмененными листьями. Процентное содержание аргинина в общем белке луковицы значительно больше, чем в других белковых фракциях, представленных в табл. 25 и 25а. Относительное содержание аминокислотных остатков в общем белке луковицы тюльпана можно представить приблизительно следующим образом: Асп. (130), Глут. (95), Сер. (65), Алан. (45), Вал. (50), Лейц. (80), Треон. (20), Лиз. (65), Арг. (200), Глиц. (150), Фен. (3), Тир. (1), Цист. (12), Мет. (1).

Эти данные показывают, что нельзя считать одинаковым аминокислотный состав общих белковых фракций из любых листьев или из любой части одного и того же растения, а также свидетельствуют о ценности хроматографического анализа.

Пользуясь данными табл. 25 и 25а, можно провести некоторые сравнения. Общий белок картофельного клубня можно сравнить с общим белком мяты. Белки запасных органов (клубня картофеля и корнеплода моркови) можно сравнить с белками активно растущих тканевых культур, взятых из тех же органов. Путем таких сравнений обнаружено следующее:

а) Сравнение данных, полученных одинаковыми методами для клубней картофеля двух сортов «Себаго» и «Катадин», показывает, что состав общей белковой фракции нельзя считать постоянным, так как в пределах одного вида он зависит от сорта и, несомненно, изменяется в зависимости от питания растений.

б) Белки запасных органов (картофельного клубня и корнеплода моркови) сильно отличаются от общего белка растений мяты даже в тех случаях, когда анализ тех и других производят одинаковыми методами. В первых содержится глицин, который в белковой фракции мяты не был найден. В белках запасных органов количества серина и треонина приблизительно одинаковы, а в общем белке мяты найден только серин. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты неизменно находятся в запасных органах приблизительно в одинаковых количествах, тогда как в мяте их количественное соотношение в разных органах варьирует.

в) Лейцины (лейцин и изолейцин), аспарагиновая и глутаминовая кислоты содержатся в общем белке картофеля и моркови в сравнительно больших количествах, чем в таких материалах, как *Chlorella*, дрожжи, белки листьев (по Лаггу) и репа (старые данные Уильямса, цитированные Лаггом [106]).

г) Существует интересное различие между белками запасных

органов, находящихся в покое, и белками соответствующих тканевых культур. Пролин и оксипролин в первых либо вовсе отсутствуют, либо находятся только в небольших количествах. Однако в белке клеток растущей тканевой культуры содержится много пролина и, конечно, оксипролина. Метионин также встречается в больших количествах в белке растущих клеток, чем в белке той ткани, из которой получена тканевая культура. Значение этих веществ, особенно в белке усиленно растущих растительных клеток, еще не выяснено.

д) В последнем столбце табл. 25а приведены данные о белке яблока. Ткань яблока развивается из цветоложа (т. е. она не является существенной частью органов воспроизведения) и, следовательно, подобна другим вегетативным запасным органам. Относящиеся к ней данные получали в основном микробиологическими методами и пересчитывали на те же единицы, в которых выражены остальные данные в таблице. Аланин, тирозин и азот амидов не определяли. Азот всех найденных аминокислот составлял 80% общего азота. Единственным заметным отличием ткани яблока от других запасных органов (клубня картофеля, корнеплода моркови) является низкое содержание в белке яблока аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Применяя методы, которые лучше всего можно определить как полуколичественные (ср. работы Томпсона и Стьюарда [80, 81]), Рабидо [118, 119] дал обзор аминокислотного состава общего белка различных трав и проследил относительные изменения его, происходящие в процессе развития трав из семени. Относительное понижение содержания аминокислот с возрастом трав является результатом относительного увеличения количества неазотистых компонентов в расчете на вес сухой травы, по отношению к которому выражены все данные. Рабидо приходит к заключению, что аминокислотный состав белка этих трав по существу одинаков у различных их видов и остается постоянным в процессе всего развития.

Этот вывод кажется несколько странным и преждевременным по следующим соображениям: а) методы исследования были фактически полуколичественными; б) данные являются неполными в отношении глицина, фенилаланина, цистина, тирозина, триптофана, оксипролина и связанного амида. Вывод Рабидо [118], что «постоянное присутствие одних и тех же аминокислот в различных частях *A. ischaemum* во всех последовательных стадиях роста указывает на то, что основное содержание белка не меняется заметно в отдельных органах растений и почти не зависит от их возраста», кажется необоснованным. Прежде чем из таких данных сделать какие-либо выводы, необходимо произвести более полное количественное исследование белков разработанными в настоящее время соответствующими методами [46а, 80, 81, 112, 120].

Г. Соотношение между цистином и метионином в белках

Дальнейшую проверку однородности состава общего белка в листьях, в частности в листьях бобовых растений, можно произвести, используя изотоп S^{35} и сочетая методы хроматографии на бумаге и авторадиографии [52]. Лагг [106] показал, что метионин и цистин содержатся в белке приблизительно в одинаковых количествах ([106], табл. I и VII). Белковую (нерастворимую в спирте) фракцию люцерны разделяли [52] на белок, нерастворимый в водных растворах кислот и в спирте, и на коагулят, выделявшийся при нагревании растворимой в воде фракции из листьев люцерны. Эти фракции резко отличались по количеству выделенных из них кислот, содержащих S^{35}. Нерастворимые в спирте и нерастворимые в воде, спирте и кислотах фракции были относительно богаты метионином и бедны цистином, а в случае теплового коагулята наблюдалось обратное соотношение. В табл. 26 сопоставлены эти данные с количественными отношениями метионина к цистину в других растительных белках. Лагг ([106], стр. 236) также отметил, что в стареющих листьях количественное отношение метионина к цистину ниже, чем в листьях, еще продолжающих расти.

Таблица 26

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОТНОШЕНИЕ МЕТИОНИНА К ЦИСТИНУ В ОБЩЕМ БЕЛКЕ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ

Chlorella [113]	Дрожжи [114]	Злаковые [106]	Листья люцерны [52]		
			общий белок	тепловой коагулят	нерастворимый в воде, спирте и кислотах белок
7,0	0,55	1,1	4,2	0,3	3,4

Установлено, что в части белка листьев люцерны количественное отношение метионина к цистину превышает 4,2. В белках семян это отношение обычно невелико (от 1,0 до 2,5, по данным Боннера [121]). Из этих сопоставлений пока еще нельзя сделать каких-либо обобщений. Необходимо провести значительно больше исследований отдельных белков, содержащихся, очевидно, в гетерогенной общей белковой фракции. Однако показательно, что в растительных вирусах, которые, по-видимому, состоят из белков, полностью лишенных метаболической активности, в большинстве случаев также отмечается абсолютное отсутствие метионина (см. сводную табл. VI в работе Лагга [106]). Стьюард и другие [52] вначале полагали, что тепловой коагулят люцерны при низком содержании в нем метионина состоит в значительной части из метаболически активного белка. Однако это предположение могло быть заблуждением. Общий вывод таков, что белковая фракция растений, подобно растворимой

содержащей азот фракции, по своему аминокислотному составу может изменяться в значительно большей степени, чем это до сих пор предполагалось.

Д. Результаты анализов общего белка растений различных отделов растительного мира

Лагг [106] умело суммировал разрозненные данные анализов общей белковой фракции растений различных отделов растительного мира и пытался извлечь из этих данных сведения филогенетического характера. Сомнительно, чтобы при настоящем уровне знаний можно было бы сделать существенные выводы из такого рода обзора, однако Лагг, несомненно, сделал полезное дело, суммировав относящиеся к этому сведения.

При создании таких обзоров предполагается, что белки имеют определенный состав, характерный для данного вида, семейства, отряда и отдела растительного мира. Но едва ли это соответствует действительности, так как из табл. 25—26 можно видеть различия, обусловленные сортом и уровнем жизнедеятельности растений. Можно также предположить, что состав общей белковой фракции несколько зависит от условий питания растений и других факторов окружающей среды. Составы белковых фракций из морфологически и физиологически разных органов не одинаковы. Даже если допустить, что состав белков листьев достаточно однороден, то все же относительная малочисленность исследованных растительных семейств и недостаточная точность определения общего белкового азота в отдельных растениях не позволяют считать, что в этом обзоре представлены характерные особенности покрытосемянных. Интересно, что в папоротнике было обнаружено (Лагг [106], табл. III) шесть аминокислот (цистин, метионин, тирозин, триптофан, аргинин и лизин), которые вместе давали 30% белкового азота, но это едва ли имеет филогенетическое значение. Если данные о других папоротниковых получены путем исследования только двух организмов, в белках которых обнаружено лишь четыре аминокислоты, то это означает, что фактически по этому обширному вопросу ничего неизвестно.

То же самое можно сказать с большей или меньшей определенностью и относительно всех других отделов растительного мира. Из имеющихся данных о грибах (Лагг [106], табл. IV) известно, что в них содержится 30—60% белкового азота, причем эти данные относятся к трем видам плесени и двум видам дрожжей. Следует сказать, что гораздо важнее полностью выяснить пределы изменений, которым может подвергаться общая белковая фракция под влиянием условий питания и внешней среды в отдельных организмах при их развитии в течение жизненного цикла, чем пытаться на основании таких отрывочных данных составлять общее пред-

ставление о белках в растениях, охватывающее весь растительный мир. Довольно парадоксально то обстоятельство, что данные о патогенных растительных вирусах, вероятно, являются наиболее полными как в отношении состава содержащихся в них белковых соединений, так и в отношении числа исследованных штаммов (Лагг [106], табл. VI). Поэтому вызывает удивление следующий вывод Лагга: «1. За исключением некоторых довольно значительных отклонений, наблюдаемых у представителей слоевцевых растений (отчасти зависящих, по-видимому, от несовершенства методов анализа), общие белковые фракции главных тканей растений (исключая фитопатогенные вирусы), по-видимому, обладают до некоторой степени сходным аминокислотным составом, причем у сперматофитов, а также у папоротникообразных и, возможно, у мховых это сходство выражено сильнее, чем у слоевцевых растений». Это может означать только то, что почти в любом отделе растительного мира, вероятно, можно найти растение, общий белок которого при гидролизе даст обычные, получаемые при гидролизе белков аминокислоты в обычных количественных соотношениях. Но это ни в коей мере не должно означать, что указанные соотношения или даже полная идентичность связанных таким образом кислот является раз навсегда установившейся и неизменной для каждого отдельного растения, тем более, что они характерны для целых семейств и отделов растительного мира. В общей белковой фракции растений, очевидно, можно встретить полный набор аминокислот, входящих в состав вещества, который позволяет определить, что данное вещество является белком, однако ясно, что такой набор аминокислот должен быть более обширным, чем это можно определить путем исследования ограниченного числа запасных или строительных белков.

При использовании хроматографических методов в настоящее время можно было бы составить общий обзор белков всего растительного мира на более прочном основании, так как при этом имеется возможность сосредоточить внимание на малых по своей величине объектах и даже на белках областей роста [92]. Если данные белки специфичны для целой группы объектов, то следует считать, что они связаны скорее с делящимися клетками, чем с временными запасными продуктами, которые перед использованием, конечно, подвергаются распаду.

Даже полный аминокислотный состав белков, полученных из различных представителей растительного мира, вряд ли является наилучшим или единственным критерием для филогенетического обзора растений. Даже при одинаковом аминокислотном составе белков расположение аминокислот в белковой молекуле может быть совершенно различным. Поэтому особенности белков лучше было бы определять по таким свойствам, характеризующим целую молекулу, как электрофоретическая подвижность, скорость диффузии или седиментации, серологические тесты и пр.

5. БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ И РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ

А. Белки листа

Обзоры последних работ по этой теме можно найти у Виккери [2], Лагга ([106], стр. 259 и сл.), Боннера [121, 123] и Уилдмена и Ягендорфа* [124].

1) КЛЕТКИ ЛИСТА И ВКЛЮЧЕНИЯ В НИХ

В 1947 г. Стьюард и Стрит ([66], стр. 475—476) указали на необходимость разработки таких методов, при помощи которых можно было бы идентифицировать белки различных цитологических включений в клетках растений. Эти авторы подчеркнули также, что из всех клеток растительного организма наибольший интерес в отношении белков представляют клетки меристемы. Попытки распознавания различных частей общей белковой фракции впервые широко проводились на животных клетках [13, 14, 125] (см. раздел 1). Такой подход к решению этой задачи, несомненно, был обусловлен тем, что содержимое животных клеток, лишенных оболочек, легче выделить для исследования. С 1947 г. сделано немногое для характеристики белков меристематических клеток, однако была проделана большая предварительная работа, давшая возможность пополнить имевшиеся в то время данные о белках листьев растений. Руэлл [125а] в 1773 г., по-видимому, первый извлек из зеленых листьев материал, который он определил как вещество, известное в настоящее время как животный белок. Сейчас усиленно изучается возможность получения из листьев белка в съедобной форме, который иначе бесполезно теряется (Пири [117] и цитированная им литература).

Зеленый лист представляет собой чрезвычайно неоднородную систему, из которой должны быть изолированы характерные единичные белки, входящие в состав общей белковой фракции. Кроме разнообразия тканей (эпидермис, палисадный и губчатый мезофилл и пр.), осложнение вызывает и то, что живые клетки листьев многих растений отличаются очень широкими пределами физиологической специализации даже в одной и той же ткани (Тодэй [126] и приводимые им данные других авторов). Как установили Уилдмен и Ягендорф [124], в цитоплазме типичных клеток паренхимы листа имеются особые включения, наличием которых можно объяснить высокое процентное содержание общего белка в листе [127—132]. Одна из технических задач в этой области заключается в изыскании возмож-

* Авторы благодарны д-ру Уилдмену за разрешение просмотреть эту очень полезную статью перед ее опубликованием. Уилдмен и Ягендорф цитируют обширный ряд статей и приводят отчет о работе, проведенной калифорнийской группой исследователей.

ностей изолирования препаратов из непрерывной среды—цитоплазмы и (или) из ее различных включений. Решение этой задачи дает возможность ответить на вопрос, характеризуются ли цитологически различимые включения и окружающая их среда различными свойственными им белками.

2) МЕТОДЫ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ

В настоящее время исходным пунктом каждого исследования белков листьев растений является эфирный метод Чибнэла [24], применяемый для разделения общего белка листьев на три основные фракции: белок вакуолей, белок цитоплазмы и белок хлоропластов. Чибнэл подробно описал все ступени экстрагирования и разделения этих белков ([24], стр. 135 и сл.). Они складываются в основном из следующих операций:

а) цитолиз смесью эфир—вода, который делает протопласты проницаемыми;

б) выжимание содержимого вакуолей под давлением, но без разрыва клеточных оболочек и протопластов; предполагают, что в результате этой операции получается «вакуольный сок», из которого извлекают белок вакуолей;

в) размельчение остатка листьев, разрушение клеток, отделение клеточных оболочек пропусканием коллоидной суспензии сквозь шелковое сито и перенесение клеточных включений (хлоропластов и ядер) на бумажную пульпу посредством фильтрования;

г) флоккуляция белка цитоплазмы из прозрачного бурого фильтрата.

Состав белков цитоплазмы (глютелины, растворимые в избытке кислоты или щелочи) оказался весьма постоянным в отношении девяти аминокислот (в совокупности содержавших приблизительно 40—50% общего азота), несмотря на то что образцы были взяты от разных растений. Однако Чибнэл понимал, что эти препараты были только смесями белков, обладающих сходными свойствами в отношении растворимости (Чибнэл [24], табл. 49). Между белками, выделенными из вакуолей, цитоплазмы и хлоропластов одного и того же растения, также наблюдалось большое сходство. Единственное замеченное различие состояло в том, что белок хлоропластов содержал несколько больше гистидина и несколько меньше лизина, чем белок вакуолей. Различие в содержании гистидина в настоящее время подвергается сомнению [106, 133].

3) СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ ЛИСТЬЕВ

Целью большинства исследований Чибнэла (см. также ссылки у Лагга [134]) было получение белков в чистом состоянии, причем их чистота определялась по содержанию азота. Вследствие этого

выходы белка были непостоянными и низкими (1—40% от общего белка листьев). Другие исследователи старались достигнуть более высоких выходов общего белка листьев так, чтобы получаемый белок был характерным для всего листа в целом. Значительный интерес представлял именно состав «цельного» белка, освобожденного от небелковых соединений. Лагг [134] предпринял исследование ряда методов экстрагирования белков, чтобы установить, насколько хорошо изолированный белок характеризует собой цельный белок. Он пришел к выводу, что наилучшим методом является экстрагирование белка из листьев щелочным боратным буфером (pH 9,2) с последующим осаждением белка кислотой или нагреванием. При помощи этого метода было достигнуто почти количественное экстрагирование белка (ср. также работу Крука [135]). Исследуя белки, полученные таким методом, Лагг и Уэллер [136] пришли к выводу, что белки листьев различных видов растений сходны по составу (см. раздел 4).

При оценке метода Лагга [134] следует помнить, во-первых, что белки листьев, несомненно, представляют собой гетерогенную группу, так как состоят из белков хлоропластов, ядер и цитоплазмы, и, во-вторых, что при экстрагировании эти белки могут подвергаться изменениям.

4) БЕЛКИ ЦИТОПЛАЗМЫ

В настоящее время придают особое значение таким новым методам характеристики индивидуальных белков, как фракционированное осаждение, электрофорез и ультрацентрифугирование.

Пытаясь изучить более обстоятельно функцию ауксинов, Уилдмен и Боннер [137] занялись исследованием белков листьев растений. Клетки листьев они разрушали в коллоидной мельнице, клеточные оболочки и неразрушенные клетки удаляли фильтрованием, ядра и хлоропласты отделяли высокоскоростным центрифугированием. Растворимые белки они считали цитоплазматическими белками.

Уилдмен и Ягендорф [124] в одном из последних обзоров, посвященных технике изолирования цитоплазматических (или растворимых протоплазматических) белков листьев отмечают следующие трудности, которые при этом встречаются.

1. Необходимость разработки такой техники растирания листьев, при которой по возможности полностью удаляются целлюлозные оболочки клеток, а разрушение особых цитологических включений минимально.

2. Необходимость предотвращения посредством эффективного забуферивания коагуляции цитоплазматических белков кислым содержимым вакуолей без разбавления при этом препаратов большим количеством добавляемой жидкости.

3. Необходимость обеспечения при помощи изотонических растворов условий, при которых включения остаются незатронутыми в процессе их изолирования, если необходимо получить именно такие включения (например, хлоропласты) и если к растворимым белкам протоплазмы не должны примешиваться белки отдельных включений.

Указание на эти трудности помогает истолковать некоторые расхождения в наблюдениях, отмеченные в литературе.

Уилдмен и Боннер [137] подвергли цитоплазматические белки листьев шпината электрофорезу после фракционирования их сульфатом аммония и нашли, что основная масса белка (фракция I), по-видимому, была гомогенной, а остальная часть (фракция II)— гетерогенной. Пири [138] изолировал из листьев табака фракцию, подобную фракции I. Техника работы заключалась в отделении из мацерата крупных частиц медленным центрифугированием и отделении белков и специфических веществ центрифугированием при высоких скоростях. В воде вновь растворялись только белки. Уилдмен и Ягендорф [124] полагают, что белок в работе Пири, возможно, находился в агрегированном состоянии, так как Эггмен с сотрудниками [139] не мог так же легко, как Пири, осадить центрифугированием фракцию I белка, полученного из листьев.

Таблица 27

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Фракция I	Фракция II
Нерастворима в $(NH_4)_2SO_4$ при 38-процентном насыщении	Растворима в $(NH_4)_2SO_4$ при 38-процентном насыщении
Гомогенный белок	Гетерогенный белок
Содержит до 50% цитоплазматического белка	Не содержит связанного ауксина
Освобождает связанный ауксин при обработке в автоклаве в 0,1 н. растворе NaOH	Практически не содержит связанного фосфата; обладает многими видами ферментативной активности
Содержит 0,3—0,5% связанного фосфата	Средний молекулярный вес около 133 000
Обладает фосфатазной активностью	
Молекулярный вес 600 000	

К данным, представленным в табл. 27, можно добавить следующее.

а) Высказывалось предположение [137], что активность связанного ауксина (3-индолуксусная кислота) фракции I в противоположность фракции II не обусловлена распадом триптофана в процессе

обработки. Однако это предположение было бы более убедительным, если бы можно было показать, что фракция II действительно содержит триптофан, но не дает «связанного ауксина». С открытием β-индолилацетонитрила [140, 140а], представляющего собой естественный ауксин, находящийся в листьях *Brassica*, подверглась сомнению идентичность ауксинового материала, выделяемого из препаратов белков листьев. Более вероятно, что он представляет собой нитрил, а не свободную кислоту, хотя в этом случае потребовалось бы объяснение способа связи этого нитрила с другими веществами.

б) Фосфатазная активность фракции I была первоначально [137] показана по отношению к β-глицерофосфату, креатинфосфату, АТФ, фруктозо-1,6-дифосфату, фитиновой кислоте и фруктозо-6- и глюкозо-1-фосфатам. Сделанные при этом выводы в настоящее время, по-видимому, требуют некоторых изменений [124].

в) Множественная ферментативная активность фракции II [137] была установлена на примере ее дегидразной активности по отношению к целому ряду различных субстратов, а также на примерах полифенолоксидазной, каталазной и пероксидазной активности.

г) Индолуксусная кислота влияет на обмен растворимого в кислотах фосфора в колеоптилях овса, но не оказывает влияния на фосфатазную активность фракции I. Фосфат фракции I, составляющий 0,3—0,51% сухого веса связанного фосфата, может полностью отделиться от белка при хранении в течение 5 суток при 2°. Часть (10%) связанного фосфата неустойчива по отношению к кислотам. Из определений пентозы и пурина следует, что в нуклеиновых кислотах фракции I может находиться фосфор. Одну часть связанного фосфора можно легко удалить 1 н. кислотой, другая же удаляется только после полного гидролиза концентрированной кислотой. Главную составную часть цитоплазматического белка—фракцию I—следует рассматривать как нуклеопротеид, содержащий около 5% нуклеиновой кислоты [139].

Эггмен, Зингер и Уилдмен [139] утверждают, что чистота полученного белка фракции I достигает 95% и что были выделены некоторые основные продукты гидролиза.

В дальнейших исследованиях для разделения растворимых цитоплазматических белков применяли аналитическое ультрацентрифугирование. Поскольку при этом используются свойства, зависящие от массы, а не от заряда, то очень интересно, что таким путем были идентифицированы три важные части белковой фракции [143]. Одна белковая фракция с константой седиментации 18 *S* и молекулярным весом 600 000 отождествляется с фракцией I, которая обнаруживается электрофоретически. Другая—имеющая константу седиментации 24 *S*—является артефактом, возникающим в результате агрегации белка, так как по мере центрифугирования количество ее

увеличивается. Третий компонент—с константой седиментации 4 S является гетерогенным и может быть отождествлен с гетерогенной, содержащей фермент фракцией, обнаруживаемой при электрофорезе. Уилдмен и Ягендорф [124] пришли к следующему заключению: «Картина, возникающая при исследовании цитоплазмы ряда различных двудольных растений путем электрофореза и ультрацентрифугирования, показывает, что смеси белков очень сходны и что для каждой из них характерно наличие гомогенного высокомолекулярного главного компонента, составляющего до 50% всей белковой смеси».

Было показано, что цитоплазматические белки из листьев табака и других двудольных похожи на фракции I и II из листьев шпината. Удивительно, что цитоплазматические белки этиолированных листьев гороха сходны с цитоплазматическими белками нормальных листьев* (Боннер [121], стр. 265).

Хотя в листьях различных растений гомогенная белковая фракция составляет значительную часть всего цитоплазматического белка, этот компонент отсутствует в стеблях гороха (Боннер [121], стр. 266). Согласно сообщению, в них содержатся две разные белковые фракции, каждая из которых составляет до 20% белкового азота. Еще более поразительно [124], что у двух видов трав не обнаружено белка, сравнимого с фракцией I. Если между листьями однодольных и двудольных действительно существует такое различие, оно будет иметь чрезвычайно большое значение.

Следует отметить, что Камус (цитировано по Уилдмену и Ягендорфу [124]), применяя другие способы обработки (растирание в присутствии тиомочевины), наблюдал исчезновение фракции I общего белка в листьях двудольных растений. У некоторых однодольных [124] цитоплазматический белок листьев давал электрофореграмму с размытыми возвышениями вместо острого пика; кроме того, поведение белка в ультрацентрифуге дает возможность предполагать, что этот белок представляет собой гетерогенную смесь белков с более низкими молекулярными весами, чем у двудольных. Таким образом, фракция I, являющаяся нуклеопротеидом, по-видимому, типична для листьев двудольных, но не для листьев однодольных и стеблей двудольных растений.

Широко распространено мнение, что у растений, как и у животных, главными носителями ферментативной активности являются митохондрии [145, 146, 146a, b]. Это может навести на мысль, что фракция II возникает из этих включений, а фракция I—из цитоплазматической среды, в которой находятся как хлоропласты, так и митохондрии.

---

* Данные, полученные Лаггом и Уэллером [144], показывают, что между белками этиолированных и нормальных побегов существуют различия: последние содержат относительно больше триптофана и метионина.

5) БЕЛКИ ХЛОРОПЛАСТОВ

Хотя хлоропласты являются наиболее важными структурами в биологических системах, так как в них происходит фотосинтез, состав их белков, как это ни удивительно, мало известен. Еще в 1884 г. Рейнке [147] предположил, что хлорофилл может встречаться в комплексе с белком, подобном гемоглобину. Результаты многих исследований (см. Фишман и Мойер [148]) подтвердили это предположение. Более определенно оно было доказано работами, проведенными за последние 25 лет.

В хлоропластах содержится 35—45% белка листьев [128, 130, 149—151]. Сам хлоропласт состоит из 40—50% белка и 25—30% липида (в расчете на сухой вес) ([124], табл. 2). Когда хлоропласты экстрагируют растворителями липидов (содержащими некоторое количество воды), получается раствор хлорофилла. Сухие растворители липидов не экстрагируют хлорофилл, потому что при этом связи белка с хлорофиллом, по-видимому, не разрушаются [152]. Другим доказательством существования комплекса белок—хлорофилл является различие между хлорофиллом в листе и хлорофиллом в растворе, которое обнаруживается по спектрам поглощения, флуоресценции и устойчивости по отношению к кислотам.

Поскольку хлоропласт состоит из гранул, содержащихся в строме [149], то в нем, по всей вероятности, имеется не менее двух типов белка. Многие исследователи ([152], стр. 384 и сл.) получали препараты комплекса хлорофилл—белок. При помощи ультрацентрифуги Прайс и Уайкофф [153] определили, что молекулярный вес этого комплекса равен приблизительно 500 000. Смит и Пиккельс [154], применяя тот же метод, нашли, что осветленный детергентом комплекс Смита [155] имеет молекулярный вес около 265 000.

Если раствор комплекса белок—хлорофилл приготовляют при помощи додецилсульфоната натрия, то магний удаляется без расщепления комплекса. Это доказывает, что связь хлорофилла с белком осуществляется не через магний [155].

Хотя Смит [155] предполагал, что на одну единицу Сведберга, равную 17 000, приходится 3 молекулы хлорофилла *a* и 1 молекула хлорофилла *b*, однако данные большинства других исследователей не согласуются с этим предположением (ср. Рабинович [152], стр. 390).

Мойер и Фишмен [156] определяли электрофоретическую подвижность различных комплексов белок—хлорофилл и нашли, что изоэлектрические точки комплексов, полученных из листьев близкородственных бобовых растений, находятся в интервале 4,5—5,0 и что кривые симметричны так, как если бы в каждом комплексе был только один белок. Однако эти авторы не смогли подтвердить это для

белков хлоропластов бобовых растений других родов, а это свидетельствует о том, что белки хлоропластов менее сходны между собой, чем белки цитоплазмы растений разных видов. Далее, Фиппмен и Мойер [148] нашли, что форма кривой зависимости электрофоретической подвижности белка хлоропластов *Aspidistra* от pH сильно отличается от формы аналогичной кривой для белка бобовых растений, хотя изоэлектрические точки их почти одинаковы (pH 4,7).

Чибнэл [24] установил, что белок хлоропластов отличается от белка цитоплазмы только содержанием лизина и гистидина. Он не обнаружил существенного различия в содержании других аминокислот, которые определял (семь аминокислот, включая метионин и цистин). Однако Хэнсон с сотрудниками [130] нашел бо́льшую часть (70%) серы листьев в белке хлоропластов. Они установили также, что количественное отношение азота к сере в хлоропластах остается постоянным в течение всего жизненного цикла растения. Это указывает на гомогенность белка хлоропластов.

Таким образом, на основании результатов этих более новых работ можно сделать следующие выводы о белках листьев растений.

1. В листьях некоторых двудольных белки цитоплазмы можно легко разделить на две фракции: а) фракцию I, которая, по-видимому, является индивидуальным высокомолекулярным белком, составляющим 25—50% всего белка цитоплазмы; в этом белке нет ферментов, за исключением, может быть, фосфатазы; б) фракцию II, состоящую из нескольких белков сравнительно низкого молекулярного веса.

2. Листья некоторых однодольных не содержат белка, соответствующего фракции I. В них имеются лишь гетерогенные низкомолекулярные белки.

3. В хлоропластах содержится белковая фракция, которая состоит из белка хлоропластов, связанного с хлорофиллом. Этот белок можно выделить из хлоропластов при помощи детергентов или органических растворителей, содержащих воду. Белок хлоропластов, возможно, является индивидуальным белком, составляющим не менее 30—45% общего белка в листе.

4. Вакуолярный белок, о котором сообщал Чибнэл, более современными методами не обнаруживается, и, по-видимому, его следует рассматривать теперь как часть «общего» цитоплазматического белка (Лагг [106]).

До настоящего времени не было никаких сообщений об аминокислотном составе этих гомогенных белковых фракций листьев. Очевидно, что будущие успехи в исследовании белков должны зависеть от применения современных методов количественного определения аминокислотного состава гидролизатов электрофоретически чистых белков.

Б. Растительные вирусы как белки

Как уже отмечалось, до некоторой степени парадоксально, что о точном химическом составе и общих свойствах растительных вирусов известно больше, чем о белках листьев вообще. Однако вирусы заслуживают особого внимания в данном обзоре, поскольку их способность к размножению может пролить свет на механизм как синтеза белка, так и явления самовоспроизведения.

Наибольшее внимание привлек к себе вирус мозаики табака, поскольку он является сравнительно устойчивым нуклеопротеидом, обладает очень большой молекулой (молекулярный вес $40 \cdot 10^6$) и достигает высокой концентрации в клетке растения-хозяина (приблизительно 40% общего белка листьев) [157]. В настоящее время общепринято, что сам вирус не живой, но как нуклеопротеид, попадая в клетку растения-хозяина, он способен так изменить характер синтеза белков в ней, что образуется неестественный метаболически неактивный белок. Другими словами, если бы было известно, какое влияние частица вируса оказывает на синтез белков, изменяя его нормальный характер, это дало бы возможность близко подойти к объяснению самого синтеза белков. Часто отмечалось сходство между генами и вирусами, так как в соответствующих им сферах действия и те и другие оказывают влияние на цитоплазму. Именно это общее представление придает особый интерес взаимоотношениям между вирусным белком и нормальными белковыми фракциями листьев.

1) ВИРУС МОЗАИКИ ТАБАКА И БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ ЛИСТЬЕВ

Уилдмен, Чео и Боннер [157] исследовали белки листьев табака после заражения их вирусом мозаики табака. Белки цитоплазмы (без белков хлоропластов) разделяли вышеописанным способом и подвергали электрофорезу. Спустя 3 дня на электрофореграмме обозначился новый белок. Соответствующий ему пик достиг максимума приблизительно через 12—20 дней. Одновременно с этим уменьшалось количество белка цитоплазмы (фракция I). Это показано на рис. 15, взятом из работы Уилдмена и Боннера [158]. В то же время содержание общего азота листьев [159] и, по-видимому, азота цитоплазмы не изменилось сколько-нибудь значительно. На другие белки цитоплазмы (т. е. на гетерогенную фракцию II) размножение вируса, очевидно, не повлияло. Хотя на листьях и не было обнаружено симптомов, которые можно было бы приписать действию вируса мозаики табака (как это имело место через 13 дней), определения инфекциозности показали, что образовавшийся спустя 12 дней белок действительно был вирусом мозаики табака.

Поэтому предположили, что количество белка вируса мозаики табака увеличилось за счет фракции I, т. е. основной гомогенной массы белка самой цитоплазмы. Однако это предположение неверно, так как Коммонер с сотрудниками [160] обнаружил действительное увеличение количества цитоплазматического белка (группа А, по-видимому, соответствующая фракциям I и II Уилдмена и Боннера [137]), которое сопровождало образование белка вируса мозаики табака. Очевидно, электрофоретический метод исследования помогает установить наличие белков, характерных для некоторых других вирусов, которые заражают листья растений других видов (Уилдмен и Боннер [158]).

В одной из более поздних работ [161] показано, что в листьях табака, зараженных вирусом, можно обнаружить электрофоретически наличие не одного, а нескольких специфических белков. Действительно, в настоящее время, по-видимому, можно идентифицировать три таких белка. Два из них считают сходными белками, происходящими от двух штаммов вируса, вызывающих симптомы заболевания различной степени. Третий предположительно считают возможным комплексом двух других. Коммонер с сотрудниками [160] (см. ниже) также нашел, что у растений, зараженных вирусом мозаики табака, образовалось несколько белковых компонентов.

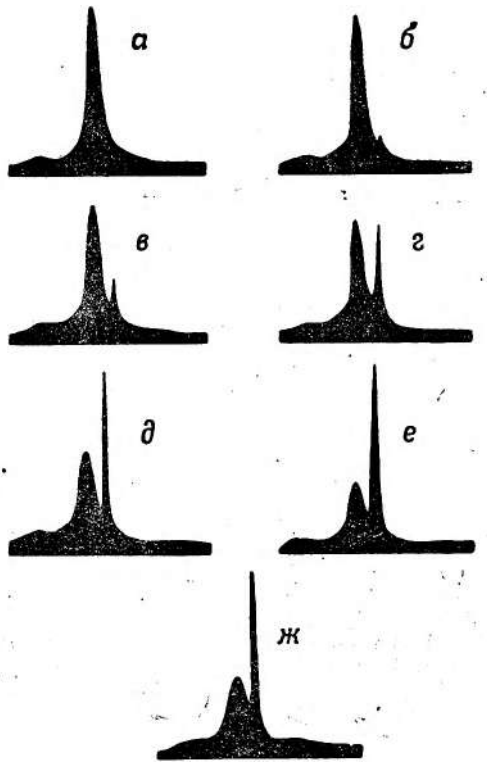


Рис. 15. Электрофореграммы цельной цитоплазмы листьев табака через различные промежутки времени после заражения их вирусом мозаики табака (по Уилдмену и Боннеру [158]).

а—2 дня; *б*—3 дня; *в*—4 дня; *г*—8 дней; *д*—12 дней; *е*—16 дней; *ж*—20 дней.

Близкое сходство между вирусным белком и фракцией I цитоплазмы, из которой, как предполагается, образуется вирусный белок, было установлено путем определения аминокислот и нуклеиновой кислоты [162, 163], а также по их серологическому поведению [164].

Предполагалось также, что мутантные изменения природы и количественных соотношений аминокислот в вирусе могут изменять их влияние на растение-хозяина [162, 165]. Существенным химическим различием между вирусом и общим цитоплазматическим белком является отсутствие в вирусе метионина.

Сходство вирусного белка с фракцией I цитоплазматического белка привело Уилдмена и Боннера [163] к заключению, что вирус мозаики табака не может возникать из продуктов деградации белка, а образуется в результате «некоторой более непосредственной агрегации нормальных нуклеопротеидов», т. е. из фракции I. Такой вывод вызывает сомнения по другим соображениям (см. ниже). Заметное сходство между вирусным белком и белком листьев табака может быть лишь другим аспектом специфичности вируса по отношению к своему хозяину или скорее указанием на то, что существующие способы идентификации компонентов таких белковых фракций являются все еще недостаточно чувствительными.

2) ИЗОТОП N^{15} В БЕЛКАХ ЛИСТЬЕВ И ВИРУСОВ

Менегини и Дельвич [166] недавно опубликовали работу, относящуюся к этому вопросу. Они пропитывали раствором $N^{15}H_4Cl$ листья табака через разные промежутки времени после заражения их вирусом мозаики табака. В ранних стадиях заражения относительное содержание N^{15} в вирусном белке было выше, чем в нормальном белке листьев. Это означает, что имеется более прямой путь от NH_4Cl к вирусу, чем от нормального белка листьев к вирусу. Конечно, можно представить, что только вновь синтезированный белок, в котором концентрируется N^{15}, может легко видоизменяться таким образом, чтобы образовывать вирус, но это едва ли вероятно.

Уилдмен и Ягендорф [124] считают, что Менегини и Дельвич [166] добились довольно эффективного экстрагирования белка вируса мозаики табака, тогда как эффективность экстрагирования цитоплазматического белка была понижена вследствие кислотной коагуляции; последнюю можно предотвратить, применяя более сильные буферы (0,5 *М* раствор малеата). Но даже если с этим можно вполне согласиться, то выводы Менегини и Дельвича, основанные на определении относительного содержания N^{15} в изолированном белке, по-видимому, все же остаются в силе.

Данные, полученные Менегини и Дельвичем [166], противоречат гипотезе Уилдмена и Боннера [163] и дают возможность предположить, что при заражении вирусом происходит борьба за имеющиеся субстраты для синтеза вируса и других белков листьев. Спустя 35 дней после инокуляции вируса Менегини и Дельвич обнаружили, что N^{15} не перешел в вирусный белок, который в листе не размножался и не подвергался метаболическим превращениям. Такой ре-

зультат находится в резком противоречии с поведением нормального белка, который постоянно находится в состоянии распада и синтеза [6]. Эти данные подтверждают также работу Такахаси [167], который показал, что в срезанных листьях белок вируса мозаики табака не дегенерирует, тогда как нормальный белок листьев непременно подвергается распаду. Спенсер [168] обнаружил, что растения даже при недостатке азота не могут использовать азот вируса в своем обмене веществ. Это означает, что вирусный белок с трудом подвергается протеолизу нормальными ферментами растения. С другой стороны, вирус в растениях с недостаточностью азота не увеличивается за счет нормального белка, а может размножаться только за счет более простых соединений азота. Можно представить, что клетка вырабатывает промежуточные продукты, которые могут быть использованы для образования ее собственных белков, т. е. белка хлоропластов, гетерогенного белка или цитоплазматических белков. Используя эти промежуточные продукты, вирус конкурирует с другими центрами синтеза.

3) ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА ВИРУСНОГО БЕЛКА

Много работ было посвящено изысканию ингибиторов синтеза вирусного белка [169]. Развитию мозаики табака препятствуют, по Вудсу [170], цианиды, а по Такахаси [167]—малахитовый зеленый. Однако к этим утверждениям следует отнестись критически, так как указанный эффект был обнаружен только в случае локальных повреждений. Коммонер с сотрудниками [171] применил новый метод, при помощи которого можно изолировать вирус мозаики табака. Это позволило показать, что тиоурацил [159] и другие тиопиримидины [171а] конкурентно препятствуют образованию мозаики табака. По-видимому, тиопиримидины являются конкурирующими ингибиторами по отношению к урацилу, так как последний ослабляет ингибиторное действие в пределах до 75%. Это все, что известно о природе действия тиоурацила. Возможно, что он оказывает ингибиторное действие на процессы образования или использования урацила в синтезе вирусного белка. Влияние тиоурацила на синтез нормального белка в листьях не обнаружено. Несмотря на то, что в результате ингибиторного действия тиоурацила изменяется количество синтезированного вируса мозаики табака, образующийся при этом вирус, по-видимому, является нормальным.

В более поздней работе применение тиоурацила сочетали с электрофоретическим анализом белков листьев [160]. Были культивированы нормальные и зараженные листья табака, и некоторые из последних обрабатывались тиоурацилом. На электрофореграммах была обнаружена группа белков (группа А), которая, по-видимому, соответствовала фракциям I и II цитоплазматических белков, найденных Уилдменом и Боннером [137] и исследованных Коммонером

с сотрудниками. Коммонер связывал наличие вируса мозаики табака с временным увеличением белка группы А; при некоторых концентрациях тиоурацила подавлялось образование как вируса мозаики табака, так и белка группы А.

Через 72 часа на электрофореграмме появлялся пик, соответствующий вирусу мозаики табака. Однако, когда достигалась почти треть максимальной концентрации вируса (спустя 170 час.), появлялся другой белок (компонент В), количество которого в дальнейшем увеличивалось одновременно с вирусным белком. Компонент В рассматривают как промежуточный продукт в процессе образования вируса мозаики табака; он обладает более низким молекулярным весом. В случае обработанных тиоурацилом листьев, в которых было менее трети максимального количества белка вируса мозаики табака, количество компонента В также было пониженным, и он не обнаруживался на электрофореграмме.

Тиоурацил изменяет не только количество белка вируса мозаики табака, но и концентрацию цитоплазматического белка (группы А). При концентрации тиоурацила 10^{-3} *М* количество белков группы А минимально и образование вируса подавляется. При более высоких концентрациях тиоурацила в незараженных листьях образуются белки группы А даже в большем количестве, чем в контрольных листьях.

Коммонер связывал влияние тиоурацила на биосинтез вируса мозаики табака с его действием на белки группы А или цитоплазматический белок. Однако представляется не менее вероятным, что воздействия тиоурацила на биосинтез белка вируса мозаики табака и цитоплазматического белка не зависят друг от друга.

4) СВЯЗЬ МЕЖДУ ВИРУСОМ И РАСТВОРИМЫМИ АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ КОМПОНЕНТАМИ

Коммонер и Дитц [172] изучали влияние синтеза белка вируса мозаики табака на растворимые азотистые соединения листьев. Если азот не доставлялся из внешнего источника, то содержание растворимого азота (аминокислот и амида) в зараженных листьях было ниже, чем в контрольных, до прекращения синтеза вирусного белка. То же самое наблюдалось в листьях, которые получали азот (аммиак) из внешнего источника, хотя количество синтезированного в этих листьях вирусного белка было гораздо больше, чем в листьях растений, не получавших азота. Поэтому Коммонер с сотрудниками [172, 172a,b] пришел к заключению, что белок вируса мозаики табака, подобно любому растительному белку, может образоваться *de novo* из аммиака и не содержащих азота углеродных соединений (см. также Менегини и Дельвич [166]). Вполне возможно, что компонент В в этом синтезе является промежуточным продуктом [172a, 308].

5) ВИРУС И СИНТЕЗ БЕЛКОВ

В какой степени исследования синтеза вирусного белка расширили имевшиеся данные о синтезе нормальных белков? Хотя в настоящее время, по-видимому, установлено, что в листе образуются электрофоретически определенные белковые фракции, но все еще остается не ясным, какова относительная роль каждой из них. Согласно Уилдмену и Боннеру [137], в листьях можно различить три главные категории белков: белок хлоропластов, общий однородный цитоплазматический белок и гетерогенный белок цитоплазмы. Если это так, то существуют ли в листьях три разных вида центров синтеза белков и происходит ли между ними конкуренция за использование имеющихся субстратов? Или же в той или иной системе (например, в образующей непрерывную среду цитоплазме) вырабатываются промежуточные вещества для построения белков, которыми снабжаются различные включения в цитоплазме? Новые методы исследования были приняты сравнительно недавно, и маловероятно, чтобы эти вопросы могли быть разрешены так скоро. Совокупность имеющихся данных свидетельствует о том, что вирус и другие центры синтеза используют один и тот же источник соединений азота и что вирусы, подобные вирусу мозаики табака, в отличие от нормальных белков являются такими центрами, откуда вещества обратно не поступают. Остается загадочным, почему вирус мозаики табака, который, очевидно, является весьма устойчивым и не участвует в обмене веществ растения-хозяина, изменяет обмен настолько, что обнаруживаются симптомы заболевания. Предполагают, что влияние вирусного белка проявляется главным образом во время его образования, а не просто определяется его присутствием в растении [172].

Выделение из листьев электрофоретически однородных белковых фракций было использовано пока лишь для исследования вирусов, поскольку вирусный белок легко отличить от других белков при помощи электрофореза. Для разделения подобных белков можно применять также методы хроматографии на бумаге [45, 46] и электрофореза на бумаге [46а].

До 1939 г. в данных даже самых полных анализов белков из листьев растений не упоминалось о серине и треонине; это относится и к большинству аналитических данных, обзор которых дал в 1949 г. Лагг [106]. Результаты более поздних анализов вирусов свидетельствуют о том, что обе эти кислоты должны находиться в листьях. Поэтому для характеристики различных белков листьев не только по их электрофоретическому поведению, но и по точному аминокислотному составу необходимо применять разработанные в настоящее время новые методы. Кроме того, нужно выяснить, какое влияние на полный состав этих белков оказывают качественные и количественные условия питания растений и другие внешние факторы.

Влияние вирусных частиц на синтез белков в листьях, представляющее большой интерес, вероятно, заключается в действии вируса как химического вещества, способного видоизменить поверхностный слой или среду, в которых происходит синтез, что соответствует гипотезе клеточной матрицы. Очевидно также, что действие вирусной частицы обусловливается не только ее химическим составом, т. е. нуклеопротеидной природой, но отчасти и ее структурой и организацией. Изучение действия ультразвуковых колебаний (Ньютон [173] и цитированная им литература) показывает, что частицы вируса мозаики табака могут распадаться на фрагменты, почти полностью утрачивая свою активность, и что максимальной активностью вирус обладает в форме свободных, почти не агрегированных палочек длиной около 280 *мμ* [173a]*.

6) БЕЛКИ МЕРИСТЕМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

С точки зрения развития растения необходимо, однако, поставить вопрос и о центрах первичного синтеза белков в областях роста, т. е. клетках меристемы. Образуются ли и в них электрофоретически неоднородные белковые фракции или же белки меристематических клеток более однородны, чем белки листьев? Чувствительны ли белки дифференцирующихся клеток к действию факторов, влияющих на образование различных тканей растительного организма? Было бы преждевременно надеяться получить ответы на такие вопросы, однако необходимо указать, что в настоящее время ведутся исследования с целью их разрешения.

6. СВЯЗЬ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА РАСТЕНИЙ С БЕЛКОВЫМ ОБМЕНОМ

Обзор растительных белков и их обмена не может быть полным, если не рассматривается небелковая фракция, так как она представляет собой тот резервуар обмена, куда возвращаются продукты распада белков и откуда берется необходимый для обратного синтеза азот. Экстрагировать небелковый азот из растений лучше всего 70—80-процентным спиртом, соблюдая меры предосторожности (концентрируя нейтральный или только очень слабокислый экстракт на холоду), чтобы предотвратить распад глутамина. В разделе 3 отмечено, что количественное отношение растворимого азота к белковому азоту в растениях может быть относительно большим. Значение этого отношения видно по тем изменениям, которым оно подвергается, когда меняются условия, определяющие рост расте-

* Авторы цитированной работы обнаружили белок X, который, полимеризуясь, принимает вид коротких палочек, не обладающих вирусной активностью, но очень похожих на видимые в электронном микроскопе частицы вируса мозаики табака.

ния и синтез белков в нем. Очевидно также, что при определении содержания белка в растениях по количеству общего азота в них могут возникнуть ошибки, если в качестве фактора пересчета всегда применять стандартную величину, равную 6,25.

А. Классы соединений, образующих растворимую азотсодержащую фракцию

Ниже дается обзор различных классов соединений азота с указанием лишь отдельных их представителей; наиболее важные типы азотсодержащих соединений рассматриваются в других разделах.

1) НЕОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА

К неорганическим соединениям азота относятся нитрат (который, хотя и является наиболее важным источником азота, обычно не накапливается, а быстро восстанавливается), нитрит и аммиак. Гидроксиламин как промежуточный продукт связывания азота и, возможно, восстановления нитрата, согласно Виртанену [174, 175], играет основную роль в аэробном связывании азота (см. также Вильсон [63], стр. 172). Реакцию Грисса на нитриты и реакцию Блома на гидроксиламин можно использовать для обнаружения в растениях нитритов и гидроксиламина (последнего как в свободном, так и в связанном виде); в общем полученные положительные результаты свидетельствуют о наличии небольших количеств этих веществ ([66], ст. 490—491).

2) ОРГАНИЧЕСКИЕ НЕБЕЛКОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА

Находящиеся в растениях свободные органические соединения азота можно разделить на следующие группы.

а) Амино- и иминокислоты, встречающиеся в гидролизатах белков. Перечень этих кислот от аспарагиновой до триптофана дан в разделе 4; любая из этих кислот может встречаться в свободном состоянии в той или иной части растения. Возможное исключение представляет оксипролин, который обычно находится в связанном виде (хотя Гири [175a] изолировал его из листьев некоторых растений) и при введении в растения, возможно, в некоторых случаях является причиной их ненормального или подавленного роста [176, 177].

В разделе 4 перечислено также несколько особых кислот, которые найдены в продуктах гидролиза некоторых белков, но еще не обнаружены в растениях в свободном состоянии.

б) Амино- и иминокислоты, встречающиеся в растениях, но не обнаруженные в гидролизатах белков. В растениях (но не в гидролизатах белков) найдены следующие аминокислоты, имино-

кислоты и амиды: γ-аминомасляная кислота [178—182], β-аланин [179], цитруллин [183, 183a], дженколиновая кислота [184], канаванин [185], диоксифенилаланин [186], α, γ-диаминомасляная кислота [187], байкиаин [188], пипеколиновая кислота [189, 190, 190a, 190b], амид γ-метиленглутаминовой кислоты и сама кислота в свободном состоянии [191], лейценол [191a], гомосерин [191b], путресцин [191c], фенилглицин [191d], аргинóянтарная кислота [191e], дипиколиновая кислота [191f] и 5-бутилпиколиновая кислота [191g]. Аминокислотами, которые в небелковой фракции растений были обнаружены только посредством хроматографии, являются орнитин [192] и α-аминомасляная кислота [79].

в) Амиды, амины, бетаины и более простые азотистые основания. В этой разнородной группе веществ наиболее важными являются амиды, среди которых первое место занимают аспарагин и глутамин. Сообщение об открытии [191] в арахисе амида γ-метиленглутаминовой кислоты, являющегося, таким образом, третьим амидом, который может встречаться в заметных количествах в растениях, требует дальнейших подтверждений; это вещество было обнаружено в других растениях, например в луковице тюльпана [116].

г) Простые пептиды. После открытия глутатиона—широко распространенного глутамилцистеинилглицилпептида, встречающегося как в растительных, так и в животных организмах, возник вопрос о возможности существования других аналогичных и столь же распространенных в организмах соединений. Открытие триглутамина в *Pelvetia* [193] показало, что этот вопрос требует дальнейшего разрешения.

Кроме перечисленных выше соединений в растениях, несомненно, имеется множество других азотсодержащих веществ, но отношение многих из них к белкам и белковому обмену не совсем ясно. К ним относятся такие соединения, как пурины и пиримидины (аденин, цитозин и пр.), алкалоиды (никотин, горденин и пр.), регуляторы роста (β-индолуксусная кислота или недавно открытый нитрил индолуксусной кислоты [140]), витамины (тиамин, рибофлавин и пр.), цианогенные глюкозиды (амигдалин и пр.), фосфатиды (лецитин и пр.). Сведения о них можно найти в более подробных обзорах [56, 57, 59] или в статьях [121, 194—197]. Синдж [197a] предполагает существование еще одной категории веществ—аминокислот, связанных с углеводами.

д) Неидентифицированные вещества, реагирующие с нингидрином. Посредством хроматографии на бумаге в растениях обнаружено большое число ранее не известных веществ, обзор которых дан в статье Стьюарда и Томпсона [48]. Таких веществ оказалось более 20. Из них вещество № 1 ([48], стр. 246, рис. 11) впоследствии определили [189] как (—) пипеколиновую кислоту, вещество № 12—предположительно [116] как амид γ-метиленглутаминовой кислоты, поскольку оно идентично веществу, определенному в рас-

тении арахиса [191], а вещество № 4—как свободную γ-метиленглутаминовую кислоту [116]. Полного обзора тех видов молекул, которые встречаются в растворимых азотсодержащих фракциях обычных растений, еще нет.

Б. История открытия растворимых соединений азота в растениях

Чибнэл ([24], стр. 55) отметил, что Шульце придавал значение изолированию и определению небелковых соединений азота в сеянцах, так как считал их ключом для понимания белкового обмена. В общих выводах своей последней работы [61], опубликованной в 1906 г., Шульце сообщил о наличии десяти аминокислот, известных в качестве продуктов гидролиза белка; к ним относились валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, тирозин, триптофан, пролин, аргинин, гистидин и лизин. Шульце, конечно, изолировал аспарагин и глутамин, но тогда он мог только догадываться, что эти аминокислоты предсуществуют (частично) в белковой молекуле. Кроме того, Шульце в небольшом количестве изолировал из семян и сеянцев многие другие азотистые вещества, например аллантоин, ксантин и пр., которые, по его мнению, могли образоваться в результате распада нуклеопротеида, а также бетаины, такие, как тригонеллин и стахидрин, и алкалоиды, например рицинин. Чибнэл отмечает далее, что, насколько ему известно, в этот перечень входят почти все известные в настоящее время азотсодержащие вещества растений. Шорей [77] в 1897 г. обнаружил присутствие глицина в сахарном тростнике, а Виккери [78] в дальнейшем нашел аланин и серин в зеленых частях *Medicago sativa*.

В перечне свободных аминокислот, найденных Шульце в растениях, отсутствуют такие важные представители аминокислот, как аспарагиновая и глутаминовая кислоты, а также содержащие серу аминокислоты (цистин и метионин) и треонин. Однако у Вемера [198] имеются данные, показывающие, что выделение аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые встречаются в растениях в свободном состоянии, часто производили еще до 1906 г. Цистин был первой свободной аминокислотой, которую можно было открыть [199], но ее нахождение в свободном состоянии в растениях доказано гораздо позднее [198], а метионин и треонин обнаружены среди продуктов гидролиза белков только в 1923 г. (Мюллер [200]) и в 1935 г. (Роуз с сотрудниками [201]).

В. Развитие метода распределительной хроматографии

Большие успехи, которые стали возможными в результате применения распределительной хроматографии на бумаге для исследования растворимых в спирте азотистых веществ растений, можно

проиллюстрировать на примере исследования веществ клубней картофеля. Еще до 1946 г. Стьюард заинтересовался небелковыми соединениями азота, содержащимися в клубне картофеля, как источником азота для синтеза белков. Вследствие интересного поведения амидов было желательно показать, что они являются в действительности глутамином и аспарагином; для этого требовалось их выделить, что и было сделано [202]. Нейбергер и Сангер [203] также изолировали глутамин из клубня картофеля в меньшем количестве. В то время было известно, что в клубне в свободном состоянии встречаются и другие аминокислоты, а именно глутамин, аргинин, лизин, гистидин, лейцин, тирозин и аспарагин [198].

Когда Дент, Стэпка и Стьюард [79] применили метод двухмерной хроматографии на бумаге, то в холодном спиртовом экстракте ткани клубня картофеля одновременно было обнаружено 18 аминокислот, которые обычно находят в белковых гидролизатах. Были найдены также аспарагин и глутамин в больших концентрациях, что находится в соответствии с возможностью легкого их изолирования из тканей клубня картофеля [202]. Таким же способом обнаружены многие другие реагирующие с нингидрином соединения. Одно из них (№ 23) впоследствии определили как γ-аминомасляную кислоту [204], которая позднее была изолирована и точно идентифицирована [182]. Другое вещество (№ 24) [79] в настоящее время известно как (—)пипеколиновая кислота [116, 189].

В этой работе показано, что большинство аминокислот белков встречается в растениях в свободном состоянии; кроме того, дан метод, посредством которого эти аминокислоты можно определять одновременно. Отметим, что все кислоты, которые, как это старался показать Шульце, содержатся в сеянцах, снова появились в этом перечне вместе со всеми отмечавшимися ранее кислотами, которые встречаются в белковых гидролизатах, за исключением оксипролина. Оксипролин редко встречается в растениях в свободном состоянии, хотя его легко обнаружить в растительных белках (см. раздел 4). Заметим также, что указанным методом были обнаружены соединения, не являющиеся продуктами гидролиза белков (γ-аминомасляная кислота, β-аланин) и относительно которых не было основания полагать, что они могут встречаться в количествах, достаточных для их обнаружения. Таким образом, эта работа и метод положили начало новому периоду исследований небелковых соединений азота. Полученные до настоящего времени результаты можно суммировать следующим образом.

Олсон [93] исследовал небелковую азотсодержащую фракцию в точках роста растений—представителей разных отделов растительного мира. Другие работы были проведены с *Chlorella* [205], листьями сои [206] (главным образом в связи с фотосинтезом), клубеньками и корнями бобовых [207], табаком [208], пастбищными травами [118, 119], стеблями гороха [68], дрожжами [209], неко-

торыми плодовыми [210], эндоспермом кукурузы [210a], хмелем, солодовой вытяжкой [210b], тканями ольхи [183a], соками цитрусовых [210c] и со многими другими растениями, обзор работ о которых дали Стьюард и Томпсон [48].

Почти во всех случаях при исследовании этим методом экстрактов небелковых соединений азота получали широкий «спектр» реагирующих с нингидрином соединений; среди них находилась не только основная масса соединений, которые заведомо получаются в результате гидролиза белков, а также некоторые из продуктов их декарбоксилирования (γ-аминомасляная кислота, β-аланин) и родственные им соединения (аспарагин и глутамин), но и множество до тех пор неизвестных веществ. Например, Хант [207] перечисляет 11 таких «неизвестных» соединений, обнаруженных в клубеньках бобовых растений. Мьеттинен [209] нашел 4 подобных вещества в дрожжах, в обзоре же [116], на который он ссылается, названо до 40 таких соединений.

Г. Значение вновь открытых соединений небелковой азотсодержащей фракции

Было бы несколько преждевременно подводить итог или оценивать тот переворот, который был произведен в представлениях о белковом обмене в растениях с применением новейших методов хроматографии. Однако можно попытаться сделать это в отношении вновь открытых соединений растворимой азотсодержащей фракции. Некоторые из них, возможно, родственны известным аминокислотам как продукты их декарбоксилирования, замыкания колец или циклизации.

1) ПРОДУКТЫ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ

Два соединения (γ-аминомасляная кислота и β-аланин), выделенные из высших растений, могут быть родственными хорошо известным аминокислотам (глутаминовой и аспарагиновой соответственно) как продукты декарбоксилирования, но они не являются составными частями белковой молекулы.

В настоящее время известно, что γ-аминомасляная кислота широко распространена в растениях, в которых она часто находится в относительно большом количестве. Например, в клубнях картофеля она занимает первое место после амидов аспарагина и глутамина [47, 204]. Имеются сообщения о присутствии γ-аминомасляной кислоты в дрожжах [178], яблоках [179], свекле [180], ржи [181], и в других растениях [182]—представителях 11 семейств и 21 рода. Таким образом, растение, в котором это соединение не найдено, должно привлекать к себе большее внимание, чем то, в котором оно встречается.

β-Аланин привлек к себе внимание после того, как Виртанен и Лейн [211] исследовали процессы экскреции в бобовых растениях, а хроматографические исследования показали, что это вещество широко распространено в растениях, хотя, как правило, в довольно малых количествах. Его обнаружили в клубнях картофеля (№ 22 в работе Дента с сотрудниками [79]), потом изолировали из яблок [179]; оно известно как составная часть пантотеновой кислоты.

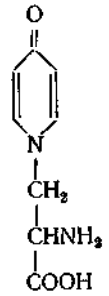
Этаноламин—продукт декарбоксилирования серина—был найден в этиолированных сеянцах пшеницы [212]. Давно известно, что бактерии [194, 213] образуют такие продукты декарбоксилирования, как γ-аминомасляная кислота из глутаминовой кислоты, путресцин из орнитина, кадаверин из лизина, триптамин из триптофана, гистамин из гистидина, тирамин из тирозина, окситирамин из диоксифенилаланина. Гистамин и окситирамин были найдены в растениях Chenopodiaceae [214], а гистамин обнаружен в жгучей крапиве (*Urtica dioica*) [215]. Прум и Войвод [216] установили, что амины: изобутиламин, изоамиламин и β-метилбутиламин происходят от валина, лейцина и изолейцина соответственно. Киркуд и Марион [217] изолировали N-метилтирамин из корней ячменя; предполагают, что он образуется путем метилирования тирамина, который в свою очередь получается из тирозина. Показано также, что γ-метиленглутамин подвергается ферментативному декарбоксилированию [217a], а путресцин [191c]—продукт декарбоксилирования лизина—встречается в растениях ячменя, которым недостает калия. Таурин, образующийся в животных организмах из цистеиновой кислоты, в растениях не обнаружен. Все эти данные показывают, что декарбоксилирование естественно встречающихся аминокислот весьма широко распространено.

Однако наличие довольно большого количества γ-аминомасляной кислоты в тех тканях (например, клубней картофеля), в которых активность соответствующей декарбоксилазы глутаминовой кислоты слабо выражена [182, 218], вызывает некоторые сомнения в таком происхождении этой кислоты. Поскольку γ-аминомасляная кислота весьма широко распространена в различных растениях, ее роль в обратимом карбоксилировании и декарбоксилировании, по-видимому, может быть значительной, хотя пока это еще не доказано. Возможно также, что γ-аминомасляная кислота и все другие продукты декарбоксилирования являются конечными продуктами обмена, азот которых не используется в обмене. (В этой связи многозначительно старое название γ-аминомасляной кислоты «пиперидиновая кислота», которое указывает на ее образование путем сильного окисления пиперидина; см. Каррер [218a,], стр. 741.) Использование γ-аминомасляной кислоты в качестве источника азота для *Chlorella* или для тканевых культур сомнительно [182], хотя ее присутствие в областях усиленного обмена веществ, например

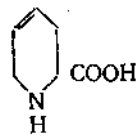
в мозговой ткани [219—221], по-видимому, связано с ее активностью в обмене. Некоторые исследователи утверждают, что γ-аминомасляная кислота участвует в реакциях переаминирования [221a, b].

2) ВНОВЬ ОТКРЫТЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА В БОБОВЫХ РАСТЕНИЯХ

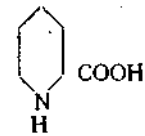
Может показаться несколько удивительным, что, несмотря на всю ту работу, которую проделали Шульце, Прянишников [222] и другие исследователи [24] с бобовыми растениями, именно в этом семействе растений снова удалось впервые открыть еще несколько амино- и иминокислот. К ним относятся следующие:



Лейценол



Байкиаин



Пипеколиновая кислота

а) **Лейценол.** Лейценол, выделенный ранее [191a] из бобового растения *Leucena glauca* Bentham, по-видимому, идентичный [222a] с мимозином из *Mimosa pudica*, находится в семенах и листьях. Синтезом [222b] установлена структура этой α-аминокислоты (аланина), которая в дальнейшем замещается в β-положении.

б) **Продукты замыкания кольца: байкиаин и пипеколиновая кислота.** Байкиаин был изолирован из древесины бобового дерева (*Baikiaea thurijuga*, или родезийский тик) [188]. Пипеколиновая кислота—продукт восстановления байкиаина—была обнаружена на бумажных хроматограммах плодов и семян бобовых (неизвестное вещество № 1 у Стьюарда и Томпсона [48]). Впоследствии ее изолировали и точно идентифицировали как (—)пипеколиновую кислоту [189]. Моррисон [190] получил экспериментальные данные, подтверждающие мнение о том, что вновь обнаруженное в бобовых растениях соединение является пипеколиновой кислотой. В природе это соединение, по-видимому, довольно широко распространено, так как Захариус [116] показал, что оно связано с веществом № 24 (Дент, Стэпка и Стьюард [79]), имеющемся в клубнях картофеля, а также в грибах, тюльпане, спарже и пастернаке.

Пипеколиновая кислота, являющаяся аналогом пролина, может получаться из лизина путем его циклизации с выделением аммиака. Это было доказано на растении (бобы) [222c] и животном (крыса)

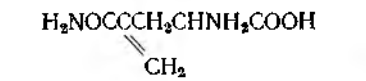
[222d]. Возможно также, что пипеколиновая кислота может превращаться в лизин, однако это еще не доказано. Подобные же производные байкиаина должны были бы содержать ненасыщенную основную аминокислоту, которая, по-видимому, неизвестна как естественный продукт. Указанные соединения открывают дальнейшие возможности в реакциях аминокислот, хотя интересно, что до сих пор эти новые аминокислоты не были обнаружены в качестве продуктов распада белковой молекулы.

3) ТРЕТИЙ АМИД В РАСТЕНИЯХ

Заметное преобладание глутамина и аспарагина и их тесная связь с белковым обменом в растениях время от времени возбуждали вопрос, не существует ли в растениях третий амид [223—225]. Дамодаран с сотрудниками [225] нашел, что при гидролизе аммиак образуется из каких-то других источников, а не из аспарагина и глутамина. Рейфер и Мелвилл [226] заметили, что содержание аммиака в сухой растительной ткани выше, чем в свежей, а впоследствии Дамодаран и Винкатисен [227] показали, что третьим источником аммиака, образующегося при гидролизе, является мочевина. Увеличение количества аммиака при сушке Рейфер и Мелвилл [226] объясняли разложением мочевины уреазой. С 1926 г. [42] хорошо известно, что уреаза содержится в растениях и является весьма специфическим ферментом, поэтому приходится удивляться тому, что получено так мало данных о наличии в них мочевины. Однако теперь доказано, что в растениях мочевина встречается чаще, чем это до сих пор предполагалось, причем содержится в небольших количествах как таковая или в виде уреидов. Широко распространенное применение мочевины для опрыскивания листвы является теперь доказательством способности цветковых растений поглощать и использовать мочевину [227a]. Кроме того, цикл орнитин—цитруллин—аргинин [228], если он встречается в высших растениях, служит средством превращения аммиака и двуокиси углерода в мочевину. Аргиназа, как и уреаза, находится в растениях фасоли (*Canavalia ensiformis*) [229], и, согласно сообщениям, указанный выше цикл имеет место и в низших растениях [230]. Эти наблюдения дают возможность объяснить быстрое исчезновение аргинина в срезанных листьях и увеличение в них содержания аспарагина и глутамина. Под действием аргиназы аргинин может распадаться до орнитина и мочевины, а мочевина—гидролизоваться уреазой с выделением аммиака, идущего на образование амидов. Однако промежуточные продукты в цикле орнитин—аргинин трудно обнаружить посредством хроматографии на бумаге, и поэтому вполне возможно, что в высших растениях такой путь обмена не является главным, как в микроорганизмах (например, в *Neurospora*). Даже в тех растениях, в которых мочевина, по-видимому, образуется (райграсс), она нака-

пливается с трудом; Рейфер и Мелвилл [226] нашли, что растения содержат в 25 раз больше амидного азота глутамина, чем амидного азота мочевины. Эти авторы также установили, что после применения мочевины все же происходило накапливание глутамина. Свойство аргинина накапливаться в семенах и сеянцах некоторых хвойных растений, особенно во время созревания семян и в условиях хранения, было доказано Шульце (см. Мак-Ки [59] и Чибнэл [24]). Аргинин можно изолировать также из некоторых прорастающих семян ([194], стр. 334). В этом смысле аргинин играет ту же роль, что и амиды. Случай, когда аргинин в значительной мере способствует образованию белка в запасном органе растения, уже отмечался (раздел 4).

Стьюард и Томпсон [48] предположили, что некоторые из неидентифицированных неустойчивых к кислотам соединений, которые обнаруживались при обработке нингидрином на хроматограммах в виде пятен, могут быть амидами. Доун и Фауден [191] утверждают, что одно такое соединение, находящееся в растении земляного ореха (*Arachis hypogoea*), является амидом. Они предполагают, что этот амид должен иметь следующую структуру:



Моноамид γ-метиленглутаминовой кислоты

Захариус [116] показал, что листья земляного ореха очень бедны глутамином и аспарагином, но что они содержат много моноамида γ-метиленглутаминовой кислоты, которая, по-видимому, идентична также неизвестному веществу № 12 (Стьюард и Томпсон [48], рис. 2.) Если утверждение Доуна и Фаудена [191] подтвердится дальнейшими исследованиями, то интересно более детально изучить этот «новый амид» в растениях.

Д. Соотношения между аспарагином и глутамином в белковом обмене

1) ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ АСПАРАГИНА И ГЛУТАМИНА

Амиды аспарагин и глутамин сохраняют свое центральное положение, несмотря на значительно увеличившееся в последнее время количество данных о растворимых соединениях азота. В некоторых случаях, например в клубнях различных сортов картофеля, не менее $^3/_4$ небелкового азота может находиться в форме амидов (аспарагина и глутамина), хотя, конечно, общее содержание амидов и относительное значение каждого из них определяется сортом, условиями выращивания и климатом в значительно большей степени, чем это предполагалось раньше. Нейбергер и Сангер [203]

установили, что содержание небелкового азота в форме амидов в клубнях картофеля составляет 38—55%, а количественное отношение глутамина к аспарагину изменяется от 0,51 до 1,16.

Эти результаты относились к клубням сортов картофеля, обычно выращиваемых в Англии. Данные, полученные Стьюардом и Стритом [202] и Стьюардом и Престоном [35], вполне совпали с результатами Нейбергера и Сангера [203]. Но в клубнях картофеля сортов, культивируемых в настоящее время в США, часто содержится больше растворимого азота; значительная часть его находится в форме амида, при этом содержание глутамина может значительно превышать содержание аспарагина (для сорта «Себаго» отношение глутамина к аспарагину равно 2,0). Хотя с точки зрения физиологии эти различия представляют некоторый интерес и могут отчасти зависеть от условий климата (температура и т. д.), широты (продолжительность дня) и пр., эти различия усложняют выяснение соотношений этих амидов в белковом обмене.

2) РАЗЛИЧНОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ АСПАРАГИНА И ГЛУТАМИНА

Полученные ранее экспериментальные данные [35], на основании которых высказывалось предположение, что глутамин особенно связан с синтезом белков (поскольку его количество возрастает в метаболически активных срезах ткани), были получены с клубнями картофеля, которые вначале были относительно бедны глутамином, но содержали сравнительно много аспарагина и аминокислот. В отношении таких тканей несомненно, что установление условий, необходимых для начала синтеза белков, связано с относительным обогащением глутамином, а следовательно, с условиями в растворе, которые благоприятствуют синтезу (увеличение K^+ [40]) или подавляют его (увеличение Ca^{2+} или HCO_3^- и других ионов [40, 86]) и стремятся соответственно понизить или сохранить неизменным содержание глутамина. Такие результаты вместе с другими данными о реакционной способности глутамина наводили на мысль, что в «бедных глутамином клетках другие растворимые соединения азота направляются к белку по каналу глутамин—глутаминовая кислота».

Другие исследователи отметили следующие различия между аспарагином и глутамином [231, 232]. В некоторых растениях (*Lupinus albus*) преобладает аспарагин, в других (*Beta vulgaris*)—глутамин, а в некоторых (растения с кислым соком)—соли аммония над амидами [233].

Оба амида—аспарагин и глутамин—различаются по химическим свойствам и по физиологическим реакциям значительнее, чем это обычно предполагают. В самом широком смысле слова аспарагин является преимущественно продуктом обмена веществ в расте-

ниях, а в организмах некоторых животных он используется лишь с трудом [233a] и выделяется из организма обычно в большем количестве, чем глутамин [233b]*. С другой стороны, глутамин в организмах животных имеет не менее важное значение, чем в растениях [232], и часто может быть существенным фактором роста бактерий.

Как уже отмечалось в разделе 2, предполагается, что в некоторых растениях глутамин и аспарагин играют несколько различные роли. Аспарагин считается запасным продуктом распада белков, а глутамин более связан с их обменом и синтезом. Это было также обнаружено в случае сравнительно «бедного глутамином» типа клубней картофеля, исследованных Стьюардом и Престоном [40]. Виккери [67], работая с растением *Narcissus*, также заметил различие между аспарагином и глутамином: количество аспарагина, отлагавшегося в виде запасного продукта, изменялось в зависимости от количества доставляемого растению нитрата.

3) СВЯЗЬ СВОЙСТВ АСПАРАГИНА И ГЛУТАМИНА С ИХ СТРУКТУРОЙ

Рассмотрение всех качественных и количественных различий между глутамином и аспарагином *in vivo* не входило в задачу авторов (дополнительные данные об этом можно найти в других обзорах [232]). Однако эта проблема, решение которой, по общему признанию, нельзя свести к простому выводу, приложимому ко всем организмам, побудила Стьюарда и Томпсона [69] пересмотреть не только физиологическую роль этих веществ, но также их химические свойства. Аспарагин довольно заметно отличается от глутамина, особенно большей устойчивостью своих амидной (к гидролизу) и карбоксильной (к декарбоксилированию нингидрином) групп. Как эти, так и другие явные различия между соединениями позволяют предположить, что аспарагин в наиболее устойчивой конфигурации может быть циклическим соединением, возможно, родственным «аминосукцинимиду», тогда как глутамин можно удовлетворительно представить обычной формулой с открытой цепью. Если принять эту схему, в пользу которой, по-видимому, свидетельствуют имеющиеся данные, то становятся понятными заметные различия растений в их отношении к указанным амидам; при этом один из них (глутамин) должен был бы входить в состав белка, значительно легче другого (аспарагина).

Было исследовано [234, 235] различное использование микроорганизмами глутамина и аспарагина и соответствующих им пептидов. Некоторые микроорганизмы используют глутамин и глутамино-

---

* Недавно получены данные о том, что следы аспарагина, введенные крысам [233c], могут давать двуокись углерода, но это можно объяснить декарбоксилированием α-карбоксильной группы.

вые пептиды одинаково легко, но аспарагин значительно менее способен поддерживать рост, чем аспарагиновая кислота, тогда как аспарагиновые пептиды (глициласпарагин, аспарагинилглицин) используются приблизительно так же, как и свободная аспарагиновая кислота. Пытаясь объяснить эти различия, Миллер и Велш [234] показали, что амидный азот аспарагина гораздо более устойчив к кислотному гидролизу, чем амидный азот пептидов. Это можно объяснить тем, что свободный и связанный аспарагин имеют различную молекулярную структуру. Более трудное использование аспарагина и его последующая бо́льшая устойчивость как запасного продукта отчасти объясняются его способностью образовывать циклическое соединение, в котором амидная группа стабилизируется тем, что она становится частью кольца.

Имеются данные, показывающие, что аспарагин в форме пептидов существует в виде открытой цепи [235 b, c], подобно свободному глутамину [234a]. Другие исследователи считают, что для объяснения образования комплексов свободного аспарагина с атомами металлов необходимо допустить, что аспарагин отличается от α-аминокислоты [235d]. Интересно, что, превращая глутамин и аспарагин при помощи препарата, полученного из змеиного яда, в их кетоновые аналоги, Мейстер [235 e] получил из аспарагина два таких соединения, тогда как глутамин дал только одно. Это значит, что химия этих соединений еще не вполне известна. До сих пор считают, что свободный аспарагин может существовать в циклической форме [235f].

4) СИНТЕЗ АМИДОВ

Чибнэл [24] уже давно показал, что в листьях многолетнего райграсса, пропитанных α-кетоглутаратом аммония, происходит превращение этого соединения в глутамин. Это находится в соответствии с общим представлением, что кетокислоты являются непосредственными предшественниками аминокислот. В настоящее время известно, как легко образуется глутамин в свекле, обработанной солями аммония [236]. Поскольку в этом случае источником азота является аммиак, считалось, что аминокислота образуется путем «восстановительного аминирования» соответствующей кетокислоты, а амид—под действием глутаминазы. Однако непосредственные синтезы *in vitro* глутамина из глутаминовой кислоты и аммиака [70—74] ясно показали, что на это требуется энергия, которая может быть получена через АТФ и поэтому в конечном счете зависит от аэробного дыхания. Образование глутамина, как показал Спек [72], может осуществляться также в результате взаимодействия глутаминовой кислоты с гидроксиламином, а образующаяся при этом гидроксамовая кислота может затем при восстановлении дать глутамин.

Ферментативное образование гидроксамовых кислот, активируе-

мое АТФ, было доведено Виртаненом и Бергом [237], которые работали с препаратами печени, до бензогидроксамовой кислоты. Поэтому данная реакция, вероятно, является довольно важной.

В настоящее время предполагают, что амид или гидроксамовая кислота, образующаяся из глутаминовой кислоты при помощи АТФ, способны к взаимному обмену в присутствии ферментативной системы, которую назвали глутамотрансферазой [238]. В присутствии такого фермента [239] может происходить замещение $N^{14}H_2$ амидной группы глутамина на $N^{15}H_2$ из $N^{15}H_3$ или же замещение амидной группы гидроксиламином [240]; этот фермент, по-видимому, не менее активен и в отношении некоторых аминокислот. Велш с сотрудниками [240] выделил трансферазы из микроорганизмов; они показали, что препараты ферментов, выделенных из некоторых микроорганизмов (например, из *Proteus vulgaris* X 19), действуют одинаково хорошо—как аспарагино-, так и глутамотрансфераза, тогда как препараты из других микроорганизмов проявляют ферментативную активность только по отношению к соединениям либо аспарагиновой, либо глутаминовой кислоты. Известна ферментная система аналогичного типа, выделенная из покрытосемянного растения (*Cucurbita*), которая взаимодействует только с глутаминовыми соединениями [241].

Понятию «транспептидации» [75, 76] соответствует образование амидной связи, которое требует доставки энергии от АТФ; образующийся при этом «Н-пептид» легко вступает в реакцию обмена с другой аминокислотной частью пептида. Происходящий таким путем ферментативный синтез амида может быть одной из наиболее важных ступеней синтеза белков. Другой путь, по-видимому, состоит в перенесении амидного азота глутамина к кетокислотам [231] с образованием аминокислот. На основании сравнительно высокого содержания связанного глутамина в белке эндосперма ячменя Йемм [242] рассматривает этот глутамин как форму, в которой азот становится усвояемым растущим зародышем.

Во всех этих случаях амид глутамин является особо важным соединением в реакциях синтеза белков.

5) АМИДЫ БЕЛКОВ

Еще в 1872 г. Ритхаузен [243] предполагал, что амиды являются составными частями белковой молекулы. Дамодаран с сотрудниками [244] изолировал после ферментативного расщепления глутамин из глиадина и аспарагин из эдестина [245]. Стэпка и Такахаси [246] показали, что в вирусе мозаики табака находятся и аспарагин и глутамин. Однако доказательство ими наличия в вирусе глутамина не убедительно. Судя по количеству аммиака, выделяющегося при гидролизе белка клубня картофеля (см. табл. 25а), более $^3/_4$ связанных аспарагиновой и глутаминовой кислот могут находиться в форме

их амидов. Однако одним лишь освобождением амидов при гидролизе белков нельзя объяснить значительное преобладание амидов над другими соединениями в растворимом азоте картофеля.

Из всех других компонентов небелковой азотсодержащей фракции наиболее тесно связанными с белковым обменом могут быть оксимы. В хорошо известной работе Виртанена и Лейна [211] указывалось, что возможное направление синтеза, ведущего к образованию аминокислот *in vivo*, может быть представлено схемой кетокислота→оксим→аминокислота.

Достоверность этой гипотезы основывается главным образом на присутствии оксиминоянтарной кислоты в продуктах выделения бобовых, связывающих азот при помощи *Rhizobium* (соответствующая литература указана в статье Вильсона [63]). Продолжительная полемика относительно роли аммиака и гидроксиламина еще не закончилась. Висконсинская группа исследователей настаивает на ведущей роли аммиака. Но наиболее вероятно, что при определенных условиях правильны обе гипотезы. Если в процессе синтеза щавелевоуксусная кислота является главным «входом» для азота благодаря тем факторам, которые управляют углеводным обменом и регулируют цикл Кребса, то самопроизвольное образование оксима должно предрасполагать систему к соединению с гидроксиламином и к возможному образованию аспарагиновой кислоты. Если же «входом» для азота является α-кетоглутарат, то система будет легче соединяться с аммиаком и приводить к образованию глутаминовой кислоты. Следовательно, взаимная превращаемость этих двух кислот могла бы осуществляться трансаминазными системами (обсуждение этого вопроса см. у Коэна [65]).



Новые данные [238, 241] о том, что гидроксиламин может ферментативно реагировать с глутамином и обмениваться с амидной группой, являются дальнейшим подтверждением возможной физиологической роли гидроксиламина.

Е. Другие компоненты небелковой азотсодержащей фракции

Здесь не рассматриваются многие вещества, находящиеся в небелковой фракции, которые не связаны непосредственно с белковым

обменом, даже если они прямо или косвенно образуются из аминокислот. К ним относятся более простые встречающиеся в естественных условиях основания (саркозин, холин, тригонеллин, стахидрин, глицилбетаин) и алкалоиды. Пурины и пиримидины представляют особый интерес в том отношении, что они входят в состав нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов и занимают важное место в ядрах и хромосомах клеток. В последних, как и в вирусных частицах, они, по-видимому, имеют непосредственное отношение к механизму «самовоспроизведения», посредством которого на поверхности матрицы образуется белок.

Встречающиеся в естественных условиях ауксины (индолуксусная кислота, а также ее нитрил [140, 140a]) представляют непосредственный интерес при рассмотрении синтеза белка, так как стимулирование ими роста ведет к усиленному синтезу белка из аминокислот. Христиансен и Тиманн исследовали эти процессы в изолированных сегментах стебля гороха [68].

Из витаминов группы В три непосредственно участвуют в азотном обмене и синтезе белков. Пиридоксин (B_6) [247] является коферментом переаминирования и глутаминовой декарбоксилазой. Амид никотиновой кислоты как составная часть дифосфопиридинового (ДФН) и трифосфопиридинового (ТФН) нуклеотидов входит в структуру коферментов, которые вызывают дегидрирование аминокислот [248]. Рибофлавин является коферментом систем, вызывающих окисление *d*- и *l*-аминокислот [249—251] (см. т. III, ч. 2).

7. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА БЕЛКОВУЮ И РАСТВОРИМУЮ ФРАКЦИИ В РАСТЕНИЯХ

А. Количественное отношение растворимого азота к белковому

В зависимости от условий, определяющих равновесие между синтезом и распадом, накоплением и интенсивностью обмена веществ, количественное соотношение между более простыми соединениями азота (главным образом аминокислотами и амидами) и белками может изменяться в очень широких пределах.

Удобным и довольно широко применявшимся методом было отделение растворимых в 70—80-процентном этиловом спирте небелковых соединений азота от белковой, или нерастворимой в спирте, фракции. Возможность применения спирта для экстрагирования небелковых соединений была обоснована в работах с яблоками [252] и клубнями картофеля [35]. Ясно, что такой метод неприменим в тех случаях, когда исследуемые объекты содержат растворимые в спирте белки (семена злаков).

Изменения, которые могут происходить в растворимой в спирте азотсодержащей фракции клеток, принадлежащих одной ткани,

хорошо иллюстрируются на примере клубня картофеля. В разделе 3 упоминалось о том, что в тонких срезах клубня картофеля растворимый в спирте азот превращается в нерастворимый, если срезы находятся на влажном воздухе или в аэрированных растворах. Для перехода от метаболически неактивного состояния нетронутого клубня, находящегося в покое, к состоянию обмена и даже роста требуется кислород. В действительности скорость дыхания, необходимая для поддержания метаболической и жизненной активности в этих клетках, зависит только от такого компонента дыхания, который имеет относительно высокую потребность в кислороде («насыщение» кислородом происходит только при равновесии клетки с водной средой, содержащей столько кислорода, сколько его находится и воздухе, т. е. 20,9% по объему), тогда как значительно более медленный обмен в нетронутом клубне не зависит от парциального давления кислорода даже при весьма низких его концентрациях [253]. По-видимому, эти различные уровни окислительного обмена зависят от действия разных или, в лучшем случае, дополняющих друг друга конечных оксидазных систем. При усиленном обмене веществ в срезах клубня, ведущем к синтезу белков [35], несомненно, активной является полифеноловая оксидазная система ([35], стр. 50 и сл.). Шейд и Леви [254] показали также, что влияние кислорода на дыхание в срезах клубня картофеля более чувствительно к концентрации кислорода, чем это можно было бы ожидать при наличии в системе только одного цитохрома с. В сравнительно медленном обмене веществ в нетронутом клубне может принимать участие другая конечная оксидазная система (цитохромная система) [255, 257], которая насыщается кислородом при значительно более низких его концентрациях [253]. Таким образом, понятно, почему синтез белков (превращение растворимого азота в белковый) в тонких срезах клубня так чувствителен к столь широким колебаниям концентрации кислорода, находящегося в контакте с клетками [39], так как при этом, несомненно, требуется участие полифеноловой оксидазной системы вследствие ее возможной роли в дезаминировании.

Однако было показано, что превращение в этих клетках растворимого азота в нерастворимый является также функцией количественного отношения катионов $K^+ : Ca^{2+}$ в растворе (при этом K^+ усиливает превращение [40], а Ca^{2+} подавляет его), как и сопровождающих их анионов (анионы усиливают противоположное действие K^+ и Ca^{2+} в следующем порядке:

$$NO_3^- > Cl^- > Br^- > SO_4^{2-}.$$

Однако двуокись углерода и анион HCO_3^- производят единственное в своем роде действие, так как они полностью подавляют синтез даже в хорошо аэрированных растворах и при наличии ионов калия

[86]. Этот эффект свидетельствует о способности CO_2 и ионов HCO_3^- производить регулирующее действие, так как посредством реакции карбоксилирования они могут определять направление обмена в наиболее важных пунктах [66]. В противоположность им поведение фосфата объяснить значительно легче: он стимулирует синтез белков так, как этого и следовало ожидать по его известной роли в процессах дыхания и фосфорилирования [86]. Непосредственное соприкосновение молекулярного кислорода окружающей среды с системой, в которой происходит синтез белка, по-видимому, осуществляется полифеноловой оксидазой, играющей роль конечной оксидазной системы и вызывающей окислительное дезаминирование аминокислот.

Однако ни воздействия одного кислорода, ни влияния взаимодействия ионов недостаточно для обеспечения синтеза, если ткань не обладает другими свойствами, которые в настоящее время можно определить лишь как ее способность расти, а составляющих ее клеток—делиться. Продолжительное действие низкой температуры не подавляет дыхания. Напротив, оно может даже усилиться, но клетки при этом постепенно теряют способность делиться и вместе с тем теряют способность превращать растворимые в спирте соединения азота в нерастворимые [87]. После продолжительного выдерживания клубня картофеля при низкой температуре в его тонких срезах, помещенных в атмосферу влажного воздуха или в аэрированный раствор, происходит ускоренный распад белков. Причина такого резкого изменения обмена в срезах клубня картофеля, находившегося долгое время при низкой температуре, еще не выяснена.

При обмене веществ в листьях растений баланс растворимого и нерастворимого азота регулируется также факторами, о которых часто забывают; эти факторы находятся в зависимости от того, срезан или не срезан лист и содержится он на свету или в темноте. В срезанных листьях, особенно в листьях трав, наблюдается склонность к распаду белков, которая усиливается в темноте. По Вуду ([83], стр. 673), предпочтительное использование некоторых аминокислот, например окисление содержащих серу аминокислот в листьях, предотвращает вторичное использование их в синтезе и смещает баланс в сторону распада.

Общий баланс растворимых азотсодержащих фракций и белкового азота зависит также от минерального питания растений во время роста (см. раздел 8). Количественное отношение растворимого азота к нерастворимому является ценным показателем уровня минерального питания. По содержанию растворимого и белкового азота Штейнберг [258] сравнивал растение с недостаточностью минеральных веществ с нормальным растением и составил таблицы, куда вошли данные, относящиеся к большому числу подобных случаев.

Б. Связь между питанием и белковым обменом в листьях ячменя

Наиболее полными исследованиями влияния уровня минерального питания на баланс растворимого и белкового азота в листьях ячменя, пожалуй, являются работы, проводившиеся в течение многих лет в лаборатории Грегори. В этих исследованиях применялся новый способ отбора проб для анализа, состоявший в том, что анализу подвергались последовательно выраставшие на стебле листья по мере достижения зрелости (максимальных размеров).

Получены следующие результаты. Уровень питания азотом, фосфором и калием определяет количество образующихся в растении растворимых азотсодержащих фракций и белка. При недостатке азота как растворимая, так и белковая фракции уменьшаются *pari passu*, так что не происходит большого относительного изменения состава. Однако недостаток калия и фосфора является причиной относительного увеличения растворимых азотсодержащих фракций [259], причем количество аминокислот возрастает немного, а количество амидов—значительно. Это подтверждают данные, приведенные Штейнбергом [258]. Ричардс [260] проанализировал эти соотношения с точки зрения необходимости определенной интенсивности дыхания для сохранения данного содержания белка неизменным. В этом случае у листьев ячменя, развивающихся в условиях полного питания, интенсивность дыхания на единицу содержавшегося в них белка ниже, а у листьев, растущих при недостатке калия и фосфора,—выше.

Грегори и Сен [38] отмечали, что если бы синтез белков был процессом, обратным их гидролизу, то можно было ожидать, что повышенное содержание аминокислот, наблюдающееся при недостатке калия, способствовало обратному процессу. С другой стороны, если бы синтез не был процессом, обратным гидролизу, то аминокислоты можно было бы считать источником, поддерживающим усиленное дыхание растений при недостаточном снабжении их калием. Так составилось представление о белковом цикле, в котором продукты распада белков дезаминируются, азот вновь вступает в азотный обмен, а углеродный остов аминокислот расходуется на дыхание. В итоге Грегори ([261], стр. 567 и сл.) пришел к следующему общему заключению:

а) недостаток калия связан с высоким содержанием растворимого азота, с усиленным дыханием и ускоренным распадом белка. Сам по себе калий не считается существенным для синтеза, но он необходим для сохранения данного количества белка;

б) у растений с недостатком азота, несмотря на очень высокое содержание сахаров, скорость дыхания низкая, а у растений с недостатком калия, несмотря на низкое содержание сахаров, скорость дыхания высокая;

в) последствия, вызываемые недостатком фосфора, отличаются от последствий, причиняемых недостатком калия; это объясняется тем, что фосфор «перерабатывается» в углеводном обмене, а калий — в азотном обмене.

В. Связь белкового обмена с другими процессами обмена веществ

За последние годы все более широкое распространение находит положение, что азотный и белковый обмены должны быть тесно связаны с большинством жизненных процессов даже в тех случаях, когда эта связь непосредственно не проявляется (например, в случае синтеза белка и роста тканей). Хотя детали этих взаимоотношений остаются еще спорными, но теперь уже очевидно, что такие процессы и жизненные функции, как дыхание, накопление солей и фотосинтез, тесно связаны с белковым обменом. В самом деле, белки цитоплазмы и их обмен вполне могут участвовать в любом из тех процессов, которые трудно или невозможно осуществить вне клеток и в которых поэтому организация живой клетки, по-видимому, играет какую-то существенную роль.

1) Связь между азотным обменом и другими жизненными функциями

В обмене белков и родственных им веществ можно установить следующие зависимости.

1. Кетокислоты в силу их способности функционировать в качестве «акцепторов углерода» азотсодержащих групп занимают такое положение между распадом углеводов и дыханием, с одной стороны, и белковым обменом—с другой, которое связывает эти две стороны обмена и, следовательно, связывает азотный обмен с любой жизненной функцией, для которой требуется энергия дыхания.

2. Процесс связывания двуокиси углерода в силу его способности оказывать влияние на направление промежуточного углеводного обмена через продукты карбоксилирования и декарбоксилирования также может воздействовать на те соединения азота, которые участвуют в белковом обмене.

3. Широко распространенная полифеноловая оксидазная система вследствие способности промежуточных продуктов ее деятельности вызывать окислительное дезаминирование аминокислот может определять снабжение не содержащими азота углеродными соединениями, которые становятся доступными в качестве субстратов для дыхания, а также аммиаком, который (через амиды) снова может принимать участие в синтезе белка.

4. Особенно эффективная роль глутаминовой кислоты в переаминировании и предполагаемая роль глутаминовых пептидов

в транспептидации дают основание считать, что соединения глутамина, глутаминовой и α-глутаровой кислот и те системы, из которых они образуются, занимают центральное место в белковом обмене.

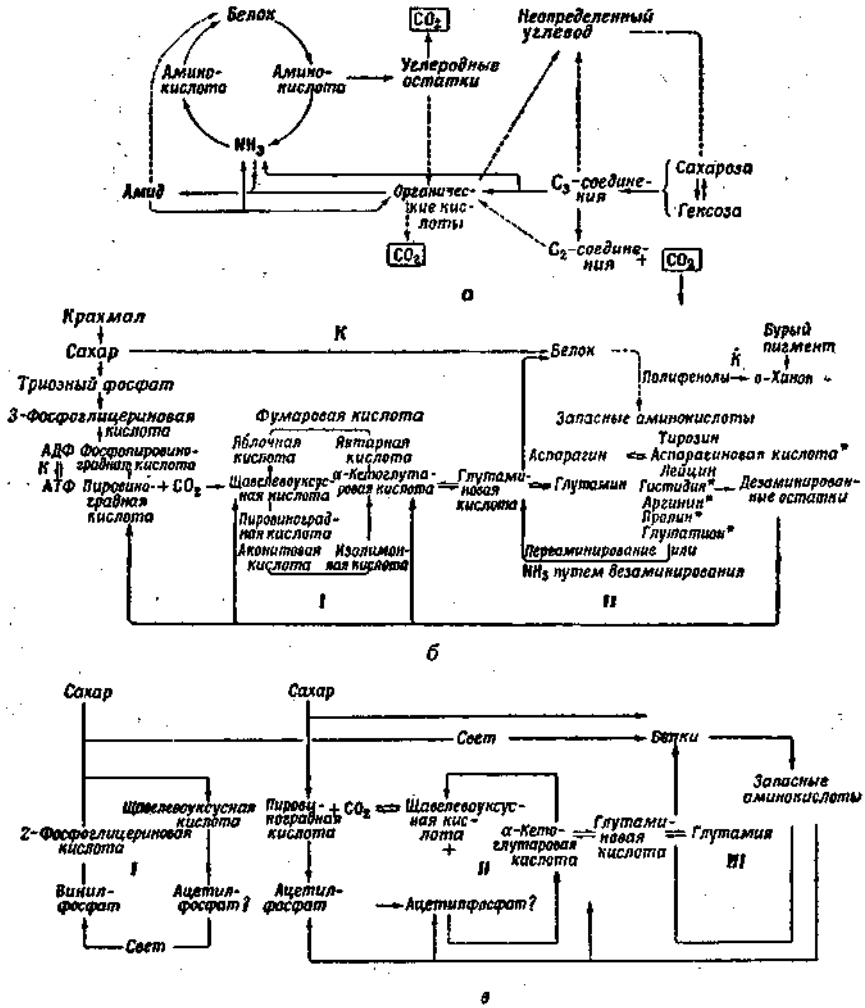
Теперь можно рассмотреть степень участия белков и их обмена в жизненных процессах, которые на первый взгляд с ними не связаны. Однако следует отметить, что, если даже какие-либо из приведенных здесь теоретических схем в конце концов окажутся несостоятельными, их все же необходимо заменить другими рациональными гипотезами, чтобы показать, почему белки и их обмен неизменно сопровождают жизненные процессы, о которых здесь идет речь.

2) АЗОТНЫЙ ОБМЕН И ДЫХАНИЕ РАСТЕНИЙ

В представлениях о дыхании и азотном обмене наступил поворотный момент после того, как Грегори и Сен [38] возвратились к значительно ранее высказанным идеям Споира и Мак-Ги [262] и признали, что соединения азота участвуют в процессе дыхания в большей степени, чем это обычно предполагалось.

Относящиеся к этому вопросу данные суммированы в различных обзорах [24, 261, 263]. Грегори и Сен [38] дошли до утверждения, что углерод в конечном итоге выделяется из организма в виде углекислого газа только потому, что он входит в состав белков. Их схема показана на рис. 16, *а*. Недавно Йемм [263а] доказал, что часть (до 40%) углекислого газа, выделяемого голодающими листьями ячменя, происходит из белка.

Стьюард с сотрудниками (выводы см. у Стьюарда и Стрита [66], стр. 483), стараясь объяснить поведение азотсодержащих фракций в тонких срезах клубня картофеля, обрабатываемых различными солями в разных концентрациях, руководствовались тем же общим положением. Происходящие при этом и кажущиеся на первый взгляд необъяснимыми явления, обусловленные двуокисью углерода и анионами HCO_3^- в растворе, легко понять, если допустить, что одним из эффектов быстрой аэрации раствора воздухом, очищенным от CO_2, является удаление углекислого газа по мере его выделения и создание, таким образом, препятствия в любой стадии обмена, при которой происходит карбоксилирование. Эти схемы представлены на рис. 16,*б* вместе с подтверждающими их данными. Как будет показано, цикл карбоновой кислоты (как его тогда понимали) может снабжаться из двух возможных источников: а) из сахара в виде эфира пировиноградной кислоты через гликолиз или же, в свете более новых данных, в виде ацетилфосфатного производного, который также может быть «продуктом питания» в цикле Кребса; б) из аминокислот, которые могут дезаминироваться с обратным использованием их азота и участием дезаминированных остатков в соответствующих стадиях процесса в «цикле карбоновой кислоты».



Р и с. 16. Схемы связи процесса дыхания с белковым обменом.

а—по Грегори и Сену [38], *б*—по Стьюарду и Стрити [66]. *I*—цикл карбоновых кислот Кребса; *II*—азотный цикл: синтез белков, активируемый O_2 и $\dot{K}^+$ и инактивируемый Ca^{2+} и HCO_3^-; *означает аминокислоты, которые могут давать кислоты в цикле Кребса; $\dot{K}$—стадии, о которых известно или предполагается, что на них непосредственно влияют $\dot{K}$, *в*—по Стьюарду и Томпсону [51]: цикл *I*—упрощенный по Кельвину [1]; цикл *II*—упрощенный цикл Кребса; цикл *III*—см. рис. *б* и работу [66].

По-видимому, в тканях клубня картофеля существуют некоторые взаимосвязанные условия, определяющие широкое вовлечение в процессе дыхания дезаминированных остатков аминокислот. Этими условиями являются: а) большая скорость аэробного дыха-

ния, приводящая в действие каталитические системы (полифеноловую оксидазу); эти системы обладают относительно высоким кислородным насыщением и это требует, чтобы раствор находился в равновесии с атмосферным кислородом; на них оказывает сильное влияние изменение концентрации различных ионов; б) постоянная низкая концентрация двуокиси углерода; в) способность ткани ресинтезировать белок из азота, освобожденного из аминокислот, и использовать сахар (получающийся при гидролизе крахмала) для образования углеродного скелета синтезируемых таким образом белковых молекул. Противоположность каждого из этих условий обеспечивает протекание процесса дыхания без значительного вовлечения в него соединений азота.

Таким образом, считают, что в процессе дыхания тонких срезов ткани обычного клубня картофеля в аэрированных растворах соли выделение двуокиси углерода в целом непосредственно связано скорее с превращением растворимого в спирте азота в нерастворимый, чем с концентрацией сахара. В самом деле, можно представить два пути, по которым происходит продуцирование тканями двуокиси углерода. В срезах клубня, продуцирующих в разбавленных водных растворах около 0,20 *мг* CO_2 на 1 *г* ткани в час при неограниченном доступе кислорода, приблизительно $^2/_3$ [39] этого количества CO_2 выделяется в результате процесса (компонент II), непосредственно зависящего от концентрации кислорода; на этот процесс соли оказывают такое же действие (K^+—стимулирующее, Ca^{2+}—подавляющее, оптимум около pH 7,0; CO_2 и HCO_3^-—подавляющее при постоянном pH), как и на синтез белка (нерастворимого в спирте азота). Остальная $^1/_3$ выделяющейся при дыхании углекислоты (компонент I) не ограничена кислородом даже при значительно более низких его концентрациях и не связана, по-видимому, непосредственно с соединениями азота [39].

Согласно схеме на рис. 16,*б*, компонент I процесса дыхания должен проходить через гликолиз и цикл Кребса без включения соединений азота, вероятно через цитохром и без участия полифеноловой оксидазной системы. Компонент II должен входить в иной процесс дыхания, в механизм которого включены дезаминирование аминокислот, расходование дезаминированных остатков на дыхание, ресинтез белка и деятельность полифеноловых оксидазных систем.

Босвэлл и Уайтинг [84], руководствуясь другими соображениями, также признали существование двух компонентов дыхания в тонких срезах клубня картофеля, в одном из которых принимают участие аминокислоты и полифеноловая оксидазная система.

3) АЗОТНЫЙ ОБМЕН И ФОТОСИНТЕЗ

Эффективность зеленого листа на свету как органа синтеза белков требует установить некоторую связь между промежуточными продуктами фотосинтеза и синтезом белков.

В выдающихся исследованиях калифорнийской школы, руководимой Бенсоном и Кельвином [49, 50], было показано, как быстро $C^{14}O_2$ входит в состав разнообразных аминокислот. Известно также, что бóльшая часть $C^{14}O_2$ быстро включается в состав белка листьев. Бенсон и Кельвин ([49], стр. 30) отмечают: «Бóльшую часть нерастворимых веществ, образующихся в водорослях в первые минуты... составляет белок». Относительно малая скорость, с которой глутаминовая кислота и промежуточные продукты цикла Кребса становятся радиоактивными в контакте с $C^{14}O_2$ на свету, и сравнительная легкость, с которой они обнаруживают радиоактивность в темноте, впервые побудили Кельвина и Бенсона допустить, что свет подавляет или даже прекращает дыхательный цикл Кребса. Стьюард и Томпсон [51] показали, что такой вывод несостоятелен. По их данным, в тех случаях, когда на свету преобладает синтез белков, запасные аминокислоты в листе могут быть дезаминированы, а их остатки израсходованы на дыхание так, как и в клетках картофеля. Всему этому благоприятствует низкая концентрация двуокиси углерода в листе, преобладающая на свету, которая, способствуя скорее декарбоксилированию, чем карбоксилированию в цитоплазме, содействует использованию в цикле Кребса субстратов, позволяющих ему функционировать без внешней CO_2. В то же время фотосинтетический сахар и (или) его промежуточные продукты, соединяясь с азотом растворимых соединений, образуют белок.

Таким образом, обмен веществ в зеленом листе происходит в соответствии с обменом, происходящим в срезах клубня картофеля (см. схему на рис. 16, *в**); этим самым сохраняется представление, что бóльшая часть двуокиси углерода продуцируется в результате процесса, в котором непосредственным субстратом обмена являются аминокислоты, а степень включения их регулируется свободной двуокисью углерода в системе. Снова подтвердилось представление о том, что запасные аминокислоты являются продуктами распада белков и что перед ресинтезом из них белка они должны быть дезаминированы и пройти через промежуточные формы вместе с углеродом, получаемым в результате распада сахара. Поэтому приведенные выше три схемы изображают те последовательные ступени, по которым первоначально высказанное Грегори и Сеном [38] представление для объяснения некоторых воздействий питания растений на белковый обмен и процесс дыхания в листьях ячменя было затем распространено и для объяснения более общих взаимоотношений между растворимыми азотсодержащими соединениями и синтезом

* Эта схема воспроизведена здесь в том виде, в каком она была впервые представлена [51], когда ацетилфосфат считали активной формой ацетата; впоследствии было показано, что активной формой является ацетил кофермента А [236b]. О последних взглядах Кельвина по этому вопросу см. его лекцию в Харрисон-Хау [263c].

из них белков и связи этих реакций с процессами дыхания и фотосинтеза.

Кельвин и Берлтроп [263d] теперь иначе объясняют действие света на процесс дыхания растений, предполагая, что свет влияет на «фактор окисления пировиноградной кислоты» (тиоктиновую кислоту) таким образом, что предотвращает ее декарбоксилирование. Это не исключает, однако, сохранение цикла Кребса путем использования углеродных остатков соединений азота.

Г. Синтез белков *in vivo*

1) СУБСТРАТЫ СИНТЕЗА БЕЛКОВ *IN VIVO*

Сказанное выше по поводу обмена соединений азота приводит к парадоксальному утверждению, что синтез белков *in vivo* из сахара как непосредственного источника углерода и из глутамина и глутаминовой кислоты как промежуточных донаторов азота может протекать легче, чем из аминокислот, уже присутствующих в ткани. С этой точки зрения последние должны рассматриваться скорее как продукты распада и запасные вещества, а не как промежуточные соединения, необходимые для синтеза белков. Однако в этом утверждении ничего не говорится о промежуточных ступенях синтеза, кроме указания на то, что синтез белков не является просто процессом, обратным их распаду, подобно тому, как теперь известно, что гидролиз крахмала и гликогена амилазой может идти путями, совершенно отличными от процесса обратного синтеза.

Иногда индивидуальные аминокислоты при использовании их в качестве единственного или дополнительного источника азота для высших растений или их тканей производят странное действие. Штейнберг утверждает, что некоторые аминокислоты (оксипролин [176] и изолейцин [258]) могут вызвать симптомы, похожие на те, которые возникают у растений табака при недостатке бора и «френчинге»[1]. Райкер и Гутч [264] установили, что некоторые аминокислоты, участвующие в переаминировании, легко отдают свой азот тканевым культурам, тогда как другие могут быть токсичными.

2) СРАВНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА РАСТВОРИМОГО АЗОТА И БЕЛКОВ

Не вызывает удивления то обстоятельство, что простая перекомбинация аминокислот не приводит к синтезу белков. Аминокислотный состав растворимых в спирте соединений азота растений, очевидно, очень плохо приспособлен к тому, чтобы непосредственно давать необходимые для синтеза аминокислоты, как это показывают данные, приведенные Томпсоном и Стьюардом [47] (табл. 28).

[1] Особое заболевание растения табака.

Таблица 28

СОСТАВ НЕБЕЛКОВОЙ И БЕЛКОВОЙ ФРАКЦИЙ КЛУБНЯ КАРТОФЕЛЯ (СОРТ «СЕБАГО»)

Соединение	Небелковая фракция				Белковая фракция		
	количество μг на 1 г свежего веса	количество μг азота на 1 г свежего веса	содержание общего азота в каждом соединении, %	содержание небелкового азота в каждом соединении, исключая амиды, %	количество μг на 1 г свежего веса	количество μг азота на 1 г свежего веса	содержание белкового азота в каждом соединении, %
Аминосоединение	1	2	3	4	5	6	7
Аспарагиновая кислота	106,6	11,2	0,91	3,09	708	72,4	7,92
Глутаминовая кислота	178,2	16,9	1,37	4,67	837	79,7	8,71
Серин	66,2	8,8	0,72	2,42	213	28,4	3,11
Глицин	27,6	5,1	0,42	1,42	319	59,8	6,54
Аспарагин	1374	291	23,6	—	—	—	—
Треонин	100,7	11,8	0,96	3,26	176	20,7	2,26
Аланин	132,0	20,7	1,68	5,72	353	55,5	6,06
Глутамин	3020	579	46,9	—	—	—	—
Лизин	63,2	12,1	0,98	3,33	458	87,7	9,59
Аргинин	356,2	114,5	9,29	31,5	341	109,7	12,0
Метионин	82,8	7,7	0,63	2,13	95	8,1	0,89
Пролин	0,0[a]	0,0[a]	0,0[a]	0,0	201	24,5	2,68
Валин	243,4	29,1	2,36	8,02	450	53,8	5,88
Лейцин	104,4	11,1	0,90	3,07	1005	107,2	11,74
Фенилаланин	138,0	11,7	0,95	3,22	726	61,6	6,73
Тирозин	121,4	9,38	0,76	2,58	230	17,3	1,89
γ-Аминомасляная кислота	299,8	40,7	3,30	11,22	0	0	0
Аммиак	63,2	52,1	4,22	14,3	155	128	14,0
Всего	6414,5	1233,7	99,95	99,95	6267	914,4	100,0

[a] Положительная реакция, но содержание менее 15 μг на 1 г свежего веса.

К сказанному можно добавить еще более важное обстоятельство, если представить себе, что «новый белок», синтезируемый в клетках перед самым началом их роста, по своему составу должен быть ближе к белку в клетках тканевых культур, как это показано в табл. 25а, и как белок должен содержать в себе вещество (оксипролин), которого мало в запасном белке и который не содержится в растворимой фракции. При этом сравнении аминокислотного состава фракций

растворимого и белкового азота особенно необходимо отметить следующее.

1. В растворимом азоте имеется полный набор аминокислот, кроме пролина и оксипролина. Свободный пролин можно обнаружить в тканях [79], но в анализируемой ткани он находился в таких количествах, которые нельзя определить. Оксипролин в свободном состоянии в клубне картофеля не встречается. Цистеин-цистин не найдены в растворимой фракции, однако они были обнаружены в виде продуктов их окисления—цистеиновой кислоты—и в небольших количествах неизменно встречаются в клубнях картофеля [79].

2. γ-Аминомасляная кислота в свободном состоянии встречается в растворимой фракции, но не в белке. [β-Аланин, (—)пипеколиновая кислота и, вероятно, другие аминокислоты также присутствуют в свободном виде в растворимой фракции, но не встречаются в белке (см. раздел 6)].

3. Три четверти небелковых соединений азота могут быть только в форме амидов, и хотя преобладание амидов над аминокислотами и одного амида над другим, очевидно, определяется другими обстоятельствами [сортом, климатом, питанием и пр. (см. раздел 6)], существенно то, что в этом случае количество глутамина вдвое превышало количество аспарагина, т. е. он один составлял бóльшую часть (47%) всего растворимого азота.

4. Если присутствие аммиака в гидролизатах является прямым доказательством включения амидов в состав белка, то 84% аспарагиновой и глутаминовой кислот могут находиться в белке в виде амидов.

5. Существует заметное различие между относительными количествами свободных и связанных в белке аминокислот. Это верно даже в том случае, если рассматривать растворимую азотсодержащую фракцию без амидов. Некоторые аминокислоты (аргинин) в растворимой фракции находятся в бóльших количествах, чем в белковой. Содержание же других (глицин и лейцины) значительнее в белковой фракции.

Из всего сказанного следует, что синтез белков, по-видимому, нельзя рассматривать как простую перекомбинацию аминокислот. Синтезу белков *in vivo* и в азотоавтотрофных растениях присущи некоторые существенные особенности, заключающиеся в том, что ряд соединений (глутамин и глутаминовая кислота) оказываются особенно эффективными как вещества, с которых начинается синтез. Для синтеза *in vivo* характерна также та существенная особенность, что белок образуется легче из сахара или его гликолитических или фотосинтетических промежуточных продуктов, чем из аминокислот, которые предсуществуют в тканях. Поэтому представление о синтезе белков *in vivo* из аминокислот или полипептидов не вполне соответствует тому, что происходит в азотоавтотрофных растениях.

3) РЕГУЛИРОВАНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ

Поскольку неизвестен полный механизм синтеза белков в растениях, естественно, что мало известно и о тех факторах, которые регулируют или направляют его. Выше были отмечены многие переменные, влияющие на те системы, о которых известно, что они способны к синтезу белков. Однако ни одна из них не дает возможности определить условия, необходимые для самого синтеза.

В гипотезе Пэха (см. Чибнэл [24]) подчеркивается роль концентрации сахара и соединений азота, но можно найти такие системы, в которых синтез белков происходит в клетках, сравнительно бедных сахаром, и не происходит в клетках с относительно высоким его содержанием даже при достаточном снабжении их азотом.

Следуя гипотезе Пэха, Вуд [83] и Петри [82] считали, что синтез белков до некоторой степени определяется воздействием веществ, особенно аминокислот, на реакции, ведущие к синтезу, в соответствии с законом действия масс при учете сложности такой системы и влияния на нее факторов, действующих преимущественно на какие-либо отдельные аминокислоты. Однако таким путем едва ли возможно анализировать количественные соотношения между запасными аминокислотами, находящимися в растворимой фракции, и аминокислотами, связанными в белке, так как очевидно, что азот переходит в белок через промежуточные и более простые соединения (например, через амиды). По разработанной для *Neurospora* геноферментной гипотезе [265] каждая ступень синтеза находится под контролем генов, и, таким образом, вопрос о синтезе белков становится частью более широкого вопроса о природе генов и механизме их действия.

В процесс синтеза белков вовлекается почти каждый существенный элемент или существенный фактор роста, но во многих случаях (например, потребность в K^+) причину этого трудно установить (см. раздел 8).

Чибнэл [24] близко подошел к решению поставленного вопроса, когда, пытаясь объяснить регулирование синтеза белков в листьях растений, был вынужден допустить, что синтез направляется действием гормонов (см. раздел 3). Другими словами, это значит, что лист проявляет свою способность синтезировать белок, пока он остается частью целого, способного к росту организма растения, но, будучи изолирован, он не может расти. Отсюда следует, что существует определенная связь между действием ауксина на рост в длину и на синтез белков [68, 266, 267]. В одном из этих исследований [68] было показано, что изолированные сегменты стебля гороха синтезируют белок, пока поглощают воду, и что оба эти процесса стимулируются ауксином и подавляются определенными ингибиторами дыхания. Однако действие ауксина на синтез белков не считается непосредственным. Предполагают, что оно осуществляется

посредством действия его на дыхание в «обмене 4-карбоновых кислот». С этой точки зрения гормонная теория является лишь вспомогательной; вопрос о синтезе белков остается частью более обширного вопроса о том, почему растут клетки.

Таким образом, мы возвращаемся к основной загадке: что́ придает клетке способность синтезировать белок? Здесь можно только признать, что клетки, которые могут расти, обладают свойством воспроизводить свои включения (ядра, пластиды, митохондрии) как самоудвояющиеся единицы, а также способностью увеличивать количество белкового вещества пока необъяснимым, но явным способом самоудвоения.

Современные представления о связи между рибонуклеиновыми кислотами и синтезом белков, особенно с учетом того обстоятельства, что вирусная частица, являясь нуклеопротеидом, видоизменяет этот синтез, указывают на тот факт, что подобные вещества находятся в поверхностном слое или в среде, в которой может происходить синтез белков. Но пока едва ли можно сравнить процесс, происходящий *in vitro*, с синтезом белка *in vivo*. Тем не менее может оказаться полезным подвести итог тому, что известно о синтезе белков или пептидов, поскольку это имеет отношение к синтезу белков в растениях.

4) СИНТЕЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Синтез белков представляет собой выдающийся пример эндоэргического процесса, который происходит *in vivo* в сочетании с экзоэргическим процессом. Накопление солей, включение ионов в клеточный сок, где они достигают значительно большей концентрации, чем в наружном растворе, также увеличивает свободную энергию ([66] и цитированная там литература). Клеточные системы, выполняющие последний из указанных процессов, по-видимому, обладают способностью накапливать соли. Оба эти процесса (см. раздел 3) проходят фазу увеличения размеров клеток, и оба сочетаются с окислением и аэробным дыханием.

Во время синтеза белков из меньших молекул система становится более упорядоченной, вследствие чего уменьшается энтропия. Переход белка из беспорядочного состояния в растворе в более упорядоченное расположение его в поверхностных пленках сопровождается уменьшением энтропии (подобно тому, как это происходит при попеременном растяжении и свертывании миозиновых цепей [268], стр. 333). Такого рода представления допускают возможность того, что во время синтеза белка или вследствие его правильной ориентации и распространения в поверхностной пленке происходят уменьшение энтропии и увеличение свободной энергии системы, а, следовательно, последняя может производить физико-химическую работу (накопление солей). Может быть, в этом отчасти заключается смысл динамического состояния белка [6], т. е. непрерывное постро-

ние и распад его молекул даже во время кажущегося устойчивого состояния, при котором общее содержание белка не изменяется.

Однако в объяснениях синтеза белка предполагают, что энергия доставляется «богатым энергией» фосфатом (например, АТФ, образующимся в процессе обмена веществ). Интересно отметить, что образование глициновых пептидов (гиппуровой кислоты) при участии АТФ подавляется ионами кальция [269, 270], которые сильно подавляют также синтез в срезах клубня картофеля. Липманн [271] полагает, что энергия единичной фосфатной связи (в АТФ 12 000 *кал*) вполне может активизировать единичную пептидную связь (около 3000 *кал*); включение меченных C^{14} аминокислот в присутствии АТФ в белок срезов печени ([268], стр. 157) считается доказательством этого положения.

Однако в высказанном недавно предположении [75, 76] о роли глутаминовых пептидов подразумевается, что энергия обмена (раздел 6) используется на образование γ-глутаминовой связи пептида (глутатиона), после чего аминокислотная половина пептида может быть передана рецепторной поверхности или группе, отдающей аминокислотный остаток вместе с энергией, необходимой для ее связывания.

Даунс [271a], представляя природу этой рецепторной поверхности или матрицы в виде поверхности фосфорилированной пентозонуклеиновой кислоты, допускал, что попадающие на эту поверхность аминокислоты способны соединяться под действием энергии фосфатной связи. Объединив положения Хейнса и Даунса [271b], можно представить, что γ-глутаминовые пептиды могут доставлять аминокислоты на поверхность нуклеиновой кислоты таким путем, что предшествующее фосфорилирование становится необязательным, поскольку энергия для их соединения заключена в γ-связи. Рецепторную поверхность можно теперь рассматривать как γ-глутаминовую пептидазу. Бинкли [271c] даже утверждал, что нуклеиновые кислоты, будучи освобождены от белковой части, обладают пептидазной активностью. Таким образом, γ-глутаминовые пептиды одновременно могут доставлять аминокислотные радикалы для синтеза и энергию для образования пептидных связей.

Как ни интересны представления о синтезе белков на поверхности матрицы, доказать их трудно. Например, полученные Штейнбергом и Анфинсеном [271d] данные относительно яйцевода курицы как системы, способной к синтезу белков и включению в белок $C^{14}O_2$ и аминокислот, уже истолковывались по-разному. Штейнберг и Анфинсен подвергают гипотезу матрицы сомнению, так как не все аминокислотные молекулы одного и того же вида одинаково метятся в белке. Однако Дэлглиш [271e] и Кэмпбелл и Уорк [271f] по разным соображениям не соглашаются с заключением Штейнберга и Анфинсена. (Обсуждение проблемы синтеза белков см. также т. III, ч. 2, гл. II и V.)

8. НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И ПИТАНИЯ НА БЕЛКИ И ДРУГИЕ СОЕДИНЕНИЯ АЗОТА

В этом разделе по необходимости рассматриваются проблемы (а не решение их) и речь идет больше о возможном будущем направлении работ, чем об анализе проделанного. Если принять выводы, изложенные в разделах 4 и 6, то становится очевидным, что ни растворимая азотистая фракция, ни общая белковая фракция в растениях по своему составу не являются столь однородными, как это предполагалось раньше. Поэтому вопрос о воздействии минерального питания и других внешних условий на этот состав является важной проблемой. С самого начала надо признать, что относительно этих воздействий на аминокислотный состав белка в целом фактически нет никаких данных. Об этом можно лишь судить по наблюдавшимся воздействиям на растворимую фракцию и на общий белковый азот. Теперь задача состоит в том, чтобы посредством новых методов количественного определения аминокислотного состава изучить воздействия этих факторов не только на количество, но и на состав синтезируемого белка.

А. Влияние макроэлементов питания

Всякий минеральный элемент, существенный для роста растений, в конечном результате оказывает воздействие на белки, так как последние очень тесно связаны с ростом тканей растения. Однако трудно решить вопрос, имеется ли какая-нибудь непосредственная специфическая связь между ролью данного минерального элемента в питании и его воздействием на белковый обмен.

Рассмотрим сначала функционирующие в качестве существенных макроэлементов питания неметаллы (фосфор и серу); при этом вопрос упрощается, так как они входят в состав белка.

1) ФОСФОР

Можно считать, что снабжение фосфором определяется двумя главными факторами: а) потребностью в фосфоре для синтеза нуклеопротеидов и б) ролью обладающего большой энергией фосфата (АТФ) в доставке энергии для синтеза амидов [269, 270] и образования пептидных связей [271]. Ясно, что эти главные функции фосфора зависят от его количества, получаемого растением. При недостаточном снабжении фосфором растения содержание в нем белка понижается, несколько возрастает количество свободных аминокислот и заметно увеличивается амидная фракция. Это уже отмечали в своем исследовании листьев ячменя Ричардс и Темплемен [259]. Однако, кроме этого, имеется мало подробных сведений о тех факторах, которые воздействуют на отдельные соединения азота в системе.

Уильямс [272] получил, по существу, аналогичные результаты с овсом. При усиленном снабжении фосфором в развивающемся растении табака увеличивается как количество синтезируемого белка, так и сухой вес и пр. [273]; одновременно с этим, как это следует из работы Штейнберга с сотрудниками [274], уменьшается небелковая азотистая фракция. Другие исследователи [275—278] отмечали увеличение небелковой азотистой фракции при недостатке азота, что в некоторых случаях сопровождалось уменьшением количества белка. На основании этого можно предположить, что фосфор не участвует в восстановлении нитрата, но тесно связан с синтезом белка и с балансом растворимой и белковой азотистых фракций, хотя о его воздействии на состав растительных белков ничего неизвестно. Стьюард и Престон [86] показали, что снабжение фосфором тонких срезов клубня картофеля, в которых происходил обмен веществ, усиливало как дыхание, так и синтез белка.

2) СЕРА

Последствия недостатка серы вполне понятны. Давно известно, что внесение серы в почвы, где наблюдается ее недостаток, повышает содержание азота в растениях [279, 280]. Найтингейл, Шермерхорн и Роббинс [281] показали, что выращенные в водной культуре растения при недостатке серы похожи на растения, которым недостает азота, и, подобно им, отличаются высоким содержанием углеводов. Анализ показал, что в этих растениях мало белка и много растворимого азота. Подобные же результаты были получены в случае сои [282], табака [283] и мяты [101]. Штейнберг с сотрудниками [274] показал, что содержание растворимого азота в растениях табака возрастает при недостатке серы.

К рассматриваемому вопросу относятся также исследования Вуда и Берриена [284—286], которые изучали на различных видах трав (*Phalaris*, *Andropogon*, *Lolium*) влияние снабжения их извне сульфатом, аммиаком, цистином и нитратом [284], а также их голодания [286]. Добавление сульфата не увеличивало количества цистина или белковой серы, если при этом растение не снабжалось извне азотом. В листьях голодающего растения содержащие серу аминокислоты быстро окисляются, и даже добавляемый цистин, подобно содержащим серу аминокислотам, получающимся при распаде белка, превращается в сульфат. По изменению количественного отношения белкового азота к белковой сере во время развития растения и под влиянием вносимого азота можно сделать вывод, что имеются две главные белковые фракции: одна с относительно высоким и другая со сравнительно низким содержанием белковой серы. Первая фракция легко реагирует на изменения в снабжении азотом, относительное количество второй уменьшается в процессе развития растения. Хенсон [130] пришел к заключению, что белок с высоким содер-

жанием серы является белком хлоропластов, который в зрелых листьях может содержать до 70% всей серы листьев и составляет 35—40% всего их белка (против 7% в молодых листьях); белок же с низким содержанием серы—это белок цитоплазмы (см. раздел 5).

Поэтому содержание серы в белке, очевидно, строго регулируется; недостаток серы предотвращает образование белка (особенно белка хлоропластов, дефицит которого вызывает хлороз листьев) и способствует накапливанию аминокислот и пр.

3) КАЛИЙ, КАЛЬЦИЙ И МАГНИЙ

Из трех главных катионов, необходимых для цветковых растений, именно калий вовлекается в азотный обмен в наибольшей степени. Относительная независимость белкового обмена от кальция, наблюдаемая у многих бактерий и грибов, указывает на то, что этот элемент вряд ли играет большую роль в синтезе белков, хотя различие между растениями с известковых почв и кальцийфобными видами растений в отношении белкового обмена систематически не исследовали.

Данные о влиянии недостатка кальция на соединения азота в цветковых растениях скудны и несколько противоречивы, особенно в отношении того, связан [287] или нет [288] недостаток кальция с увеличением количества нитрата. Подавление ионами кальция синтеза белков в аэрированных срезах клубня картофеля [40] уже отмечалось в связи с воздействием кальция на ферментативный синтез пептидов при участии АТФ. Недостаток магния, по-видимому, связан с отсутствием синтеза белков и накоплением растворимых соединений азота [274, 287].

Ранее уже упоминалось о влиянии на питание растения ячменя [38] снабжения его калием и о влиянии ионов калия, находящихся в контакте со срезами клубня картофеля [40]. В общем калий способствует или увеличению белковой фракции, или сохранению ее почти в неизмененном количестве; в отсутствие же калия происходят протеолиз белка и накопление растворимых соединений азота. Ниже упоминаются другие исследования по этому вопросу. Однако ответная реакция растений на один и тот же уровень снабжения калием не всегда бывает в точности одинаковой. Например, Уолл [289] показал, что даже верхние и нижние части стеблей томата поразному реагируют на отсутствие калия: в верхних частях количество белка уменьшается, а в нижних остается постоянным. Грегори [261] на основании полученных им данных пришел к выводу, что роль калия заключается скорее в сохранении организации протоплазмы, чем в участии в самом синтезе белков. Можно привести много доводов в пользу следующей теории. Если изменение системы в общем направлено в сторону прироста белка путем его синтеза или в сторону потери его в результате распада под воздействием

каких-либо переменных факторов (например, содержание кислорода в срезах клубня картофеля, свет, степень развития растения и пр.), то влияние калия выразится в том, что он будет способствовать этому изменению, так как он может ускорять ход реакций, происходящий в обратимом белковом цикле (см. рис. 16). Этим и можно объяснить некоторые внешне противоречивые явления.

Б. Влияние микроэлементов

1) МАРГАНЕЦ И МОЛИБДЕН

Оба этих элемента, необходимые, но потребные для растений лишь в ничтожных количествах, вовлекаются в азотный обмен и, следовательно, в синтез белков. Они участвуют в процессах фиксации азота [290] и восстановлении нитратов [291]. Бурстрём первый пришел к заключению, что марганец или при его отсутствии железо может ускорять восстановление нитратов в срезанных корнях. При недостатке молибдена в растениях наблюдалось накапливание нитратов [292, 293]. Однако исследованиями, проведенными с микроорганизмами [294] и высшими растениями [292], теперь выяснено, что именно молибден оказывает специфическое воздействие на восстановление нитратов, а то, что сообщалось прежде о марганце, вероятно, не является вполне специфичным для этого элемента. Нитраты накапливаются при недостатке молибдена, тогда как при недостатке марганца, если это не осложняется недостатком молибдена, накапливаются аминокислоты. Симптомы недостатка молибдена [293] в растениях томата исчезают при добавлении аммиака, хотя в растениях, получавших аммиак, было иное количественное отношение растворимого азота к белковому, равное 1,0 (в нормальных растениях, получавших нитрат, оно равно 0,63). Поэтому воздействие молибдена, по-видимому, полностью объясняется его ролью в восстановлении нитратов и фиксации азота. Дальнейшие исследования системы, восстанавливающей нитраты [294a, b], показали, что фермент этой системы связан с трифосфопиридиновым нуклеотидом, и, как показал Николас с сотрудниками [294 c], молибден участвует только в стадии перехода к нитриту. В исчерпывающем обзоре азотного обмена в сине-зеленых водорослях Фогг и Вольф [294d] подходят к вопросу о роли молибдена иным путем, считая, что он скорее воздействует на обмен органических фосфатов, а не прямо на азотный обмен. Оказывают ли молибден и (или) марганец еще какое-нибудь влияние на азотный обмен и синтез белков, покажут дальнейшие исследования.

2) БОР

Участие бора в азотном обмене в растениях было установлено в результате наблюдения, что в его отсутствие нарушается взаимо-

действие между клубеньковыми бактериями и растением-хозяином *Vicia faba* [295]. Данные о повышенном содержании растворимых соединений азота в растениях при недостатке бора объясняли тем, что в отсутствие бора подавляется синтез белков и усиливается их распад [274, 296—298]. В связи с этим Штейнберг [176] наблюдал любопытное, но еще не объясненное явление усиления вдвое симптомов, обычно вызываемых недостатком бора, при добавлении к асептически культивируемым сеянцам табака оксипролина и изолейцина.

3) ЦИНК, МЕДЬ И ЖЕЛЕЗО

Единственная очевидная связь между потребностью растений в цинке (который теперь общепризнан как необходимый для них элемент) и обменом белков и других соединений азота заключается в следующем. В растениях при недостатке цинка замедляется образование ауксина (индолуксусной кислоты) [299]; это связывают с недостатком в них триптофана [299, 300]. Хотя имеются некоторые данные о восстановлении органического азота в листьях при дефиците цинка [301], но, к сожалению, нет данных о влиянии этого дефицита на количество или состав белковой фракции.

Медь, входящая в состав различных оксидаз (оксидазы аскорбиновой кислоты, тирозиназы, катехолазы или полифеноловой оксидазы), являющихся содержащими медь белками, влияет на обмен веществ растений через эти окислительные системы. Однако медь вовлекается и в азотный обмен, так как данные показывают, что в растениях с недостатком меди может быть более высокое содержание общего азота и увеличение белковой фракции [302—304]. Делались предварительные [303], но явно неубедительные попытки установить различие в аминокислотном составе между белком растений с недостатком меди и белком нормальных растений. Влияние недостатка меди на содержание белка в листьях (фактически в хлоропластах, так как медь находится главным образом именно там) [151] может проявляться косвенно через фотосинтез или же выражаться в заметном уменьшении распада белков в отсутствие меди.

Железо, которое, по Виртанену [305], должно вовлекаться в механизм связывания азота в соответствии с предполагаемой ролью гемопигмента в клубеньках, оказывает глубокое воздействие на образование хлорофилла в листьях и поэтому, вероятно, оказывает влияние на белок, с которым этот пигмент связан в хлоропластах. (По Беннету [306], бесцветные участки пестрых листьев беднее белком и богаче небелковым азотом, чем зеленые участки.) Недостаток железа в листьях связан с более высоким содержанием небелкового азота и с более низким содержанием белкового азота, чем в нормальных листьях [306, 307].

В. Выводы

Рассмотренные данные о влиянии минерального питания растений на образование растительных белков показывают, что здесь открывается почти нетронутое поле для исследований. При помощи современных методов выделения белков как общего, так и электрофоретически индивидуальных, и современных методов хроматографического определения их аминокислотного состава можно установить влияние этих элементов на образование и конечный состав белков.

То, что сказано выше относительно минерального питания, одинаково приложимо к воздействию определенных внешних факторов. Такие переменные факторы, как интенсивность освещения, длительность дня, тепловая периодичность и т. д., оказывают столь очевидное влияние на рост и поведение растений, что было бы трудно представить, что эти факторы совершенно не оказывают воздействия на белки в метаболически активных клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mulder G. J., J. prakt. Chem., **16**, 129, 138, 1839.
2. Vickery H. B., Physiol. Revs., **25**, 347, 1946.
3. Vickery H. B., Ann. N. Y. Acad. Sci., **47**, 63, 1946.
4. Hartley H., Nature, **168**, 244, 1951.
5. Vickery H. B., Yale J. Biol. Med., **22**, 5, 1950.
6. Vickery H. B., Pucher G. W., Schoenheimer R., Rittenberg D., J. Biol. Chem., **135**, 531, 1940.
7. Osborne T. B., Mendel L. B., J. Biol. Chem., **17**, 325, 1914.
8. Tristram G. R., Advances in Protein Chem., **5**, 83, 1949.
9. Schmitt F. O., Advances in Protein Chem., **1**, 26, 1944.
10. Fankuchen I., Advances in Protein Chem., **2**, 387, 1945.
11. Wyckoff R. W. G., Advances in Protein Chem., **6**, 1, 1951.
12. Banga I., Szent-Györgyi A., Enzymologia, **9**, 111, 1940.
13. Bensley R. R., Biol. Symposia, **10**, 323, 1943.
14. Claude A., Biol. Symposia, **10**, 111, 1943.
15. Bull H. B., Advances in Protein Chem., **3**, 95, 1947.
16. Rothen A., Advances in Protein Chem., **3**, 124, 1947.
17. Osborne T. B., The Vegetable Proteins, Longmans, Green and Co., London, 1912, p. 125 (Осборн Т. Б., Растительные белки, Биомедгиз, М., 1935).
18. Osborne T. B., Proteins of the Wheat Kernel, Carnegie Inst. Washington, Washington, D. C., Publ. No. 84, 1907, p. 119.
19. Davson H., Danielli J. F., Permeability of Natural Membranes, Cambridge University Press, London, 1943.
20. Stanley W. M., Science, **81**, 644, 1935.
21. Stanley W. M., J. Biol. Chem., **121**, 205, 1937.
22. Haurowitz F., Chemistry and Biology of Proteins, Academic Press, New York, 1950, p. 405 (Гауровитц Ф., Химия и биология белков. ИЛ, М., 1953).

22a. Dean R. F. A., Med. Research Council (Brit.) Spec. Rept. Ser., No. 279, 1, 1953.

23. Vickery H. B., Pucher G. W., Wakeman A. J., Leavenworth C. S., Conn. Agr. Expt. Sta. Bull., No. 399, 757, 1937.

24. Chibnall A. C., Protein Metabolism in the Plant, Yale University Press, New Haven, Conn., 1939, p. 306.
25. Brown R., Ann. Botany [N.S.], **10**, 73, 1946.
26. Schultzé E., Barbieri J., J. prakt. Chem., **25**, 145, 1882.
27. Smith W. H., Ann. Botany [N.S.], **14**, 23, 1950.
28. Hulme A. C., J. Hort. Sci., **26**, 118, 1951.
29. Bain J. M., Robertson R. N., Australian J. Sci. Res., **4**, 75, 1951.
30. Hulme A. C., Rept. Food Investigation Board, D.S.I.R., London, p. 126, 1936.
31. Hulme A. C., Smith W. H., Rept. Food Investigation Board, D.S.I.R., London, p. 127, 1938.
32. Robertson R. N., Turner J. F., Australian J. Sci. Res., **4**, 92, 1951.
33. Kidd F., West C., Hulme A. C., Rept. Food Investigation Board, D.S.I.R., London, p. 119, 1938.
34. Hulme A. C., Biochem. J., **43**, 343, 1948.
35. Steward F. C., Preston C., Plant. Physiol., **15**, 23, 1940.
35a. Robinson E., Brown R., J. Expl. Botany, **3**, 356, 1952.
36. Thompson J. F., Steward F. C., J. Exptl. Botany, in press.
37. Caspersson T. O., Cell Growth and Cell Function, a Cytochemical Study, Norton, New York, 1950.
38. Gregory F. G., Sen P. K., Ann. Botany [N. S.], **1**, 521, 1937.
39. Steward F. C., Stout P. R., Preston C., Plant Physiol., **15**, 409, 1940.
40. Steward F. C., Preston C., Plant Physiol., **16**, 85, 1941.
40a. Jensen R., Acta Chem. Scand., **6**, 771, 1952.
41. Sumner J. B., J. Biol. Chem., **37**, 137, 1919.
42. Sumner J. B., J. Biol. Chem., **60**, 435, 1926.
42a. Block R. J., LeStrange R., Zweig G., Paper Chromatography—a Laboratory Manual, Academic Press, New York, 1952 (Блок Р., Лейстранж Р., Цвейг Г., Хроматография на бумаге, ИЛ, М., 1954).
42b. Jones T. S. G., A Guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography, H. Reeve Angel and Co., New York, 1952.
42c. Cramer F., Papierchromatographie, Verlag Chemic, Weinheim, Bergstr., Cermany, 1952.
43. Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., **176**, 337, 1948.
44. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Biochem. J., **38**, 224, 1944.
45. Gillespie J. M., Jermyn M. A., Woods E. F., Nature, **169**, 487, 1952.
46. Giri K. V., Prasad A. L. N., Devi S. G., Ram J. S., Biochem. J., **51**, 123, 1952.
46a. McDonald H. J., J. Chem. Educ., **29**, 428, 1952.
46b. Gray B. A., Arch. Biochem. Biophys., **38**, 305, 1952.
46c. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **192**, 663, 1951.
46d. Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., **195**, 669, 1952.
46e. Partridge S. M., Brimley R. C., Biochem. J., **51**, 628, 1952.
46f. Boardman N. K., Partridge S. M., Nature, **171**, 208, 1953.
47. Thompson J. F., Steward F. C., J. Exptl. Botany, **3**, 170, 1952.
48. Steward F. C., Thompson J. F., Ann. Rev. Plant Physiol., **1**, 233, 1950.
49. Benson A. A., Calvin M., Ann. Rev. Plant Physiol., **1**, 25, 1950.
50. Benson A. A., Calvin M., Bassham J. A., Lynch V. H., Ouellet C., Schou L., Stepka W., Tolbert N. E., Symposia Soc. Exptl. Biol., **5**, 284, 1951.

51. Steward F. C., Thompson J. F., Nature, **166**, 593, 1950.
52. Steward F. C., Thompson J. F., Millar F. K., Thomas M. D., Hendriks R. H., Plant Physiol., **26**, 123, 1951.
53. Nightingale G. T., Ann. Rev. Biochem., **5**, 513, 1936.
54. Nightingale G. T., Botan. Rev., **3**, 85, 1937.
55. Nightingale G. T., Botan. Rev., **14**, 185, 1948.
56. Street H. E., Advances in Enzymol., **9**, 391, 1949.
57. Street H. E., New Phytologist, **48**, 84, 1949.
58. McKee H. S., New Phytologist, **36**, 33, 240, 1937.
59. McKee H. S., New Phytologist, **48**, 1, 1949.
60. Street H. E., Trease G. E., Ann. Sci., **7**, 70, 1951.
61. Schultze E., Landwirtsch. Jahrb., **35**, 621, 1906.
62. Vickery H. B., Pucher G. W., Wakeman A. J., Leavenworth C. S., Conn. Agr. Expt. Sta. Bull., No. 424, 1939.
63. Wilson P. W., The Chemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation, The University of Wisconsin Press, Madison, Wis., 1940.
64. Virtanen A. I., Hakala M., Jarvinen H., Suomen Kemistilehti, **B22**, 23, 1949.
65. Cohen P. P., in Sumner J. B., Myrback K., The Enzymes, Academic Press, New York, 1951, vol. 1, pt. II, p. 1040.
66. Steward F. C., Street H. E., Ann. Rev. Biochem., **16**, 471, 1947.
67. Vickery H. B., Pucher G. W., Wakeman A. J., Leavenworth C. S., Conn. Agr. Expt. Sta. Bull., No. 496, 5, 1946.
68. Christiansen G. S., Thimann K. V., Arch. Biochem., **28**, 117, 1950.
69. Steward F. C., Thompson J. F., Nature, **169**, 739, 1952.
70. Speck J. F., J. Biol. Chem., **168**, 403, 1947.
71. Speck J. F., J. Biol. Chem., **179**, 1387, 1949.
72. Speck J. F., J. Biol. Chem., **179**, 1405, 1949.
73. Elliott W. H., Nature, **161**, 128, 1948.
73a. Elliott W. H., J. Biol. Chem., **201**, 661, 1953.
74. Bujard E., Leuthardt F., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, **5**, 39, 1947.
75. Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., Nature, **166**, 288, 1950.
76. Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A., Biochem. J., **51**, 25, 1952.
77. Shorey E. C., J. Am. Chem. Soc., **19**, 881, 1897.
78. Vickery H. B., J. Biol. Chem., **65**, 657, 1925.
79. Dent C. E., Stepka W., Steward F. C., Nature, **160**, 682, 1947.
80. Thompson J. F., Steward F. C., Zacharius R. M., Plant Physiol., **26**, 375, 1951.
81. Thompson J. F., Steward F. C., Plant Physiol., **26**, 421, 1951.
82. Retrie A. H. K., Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., **18**, 105, 1943.
83. Wood J. G., Ann. Rev. Biochem., **14**, 665, 1945.
84. Boswell J. G., Whiting G. C., Ann. Botany [N. S.], **2**, 847, 1938.
85. Steward F. C., Caplin S. M., Science, **113**, 518, 1951.
86. Steward F. C., Preston C., Plant Physiol., **16**, 481, 1941.
87. Steward F. C., Berry W. E., Preston C., Ramamurti T. K., Ann. Botany, **7**, 221, 1943.
88. Caplin S. M., Steward F. C., Science, **108**, 655, 1948.
89. Steward F. C., Caplin S. M., Millar F. K., Ann. Botany, **16**, 57, 1952.
90. Steward F. C., Caplin S. M., Ann. Botany [N.S.], **16**, 491, 1952.
91. Schultze E., Castoro N., Z. Physiol. Chem., **38**, 199, 1903.

92. Steward F. C., Wetmore R. H., Thompson J. F., Nitsch J. P., Am. J. Botany, in press.
93. Allsopp A., Nature, **161**, 833, 1948.
94. Steward F. C., Caplin S. M., Ann. Botany [N.S.], **16**, 477, 1952.
95. Pearsall W. H., Loose L., Proc. Roy. Soc. (London), **B121**, 451, 1937.
96. Frey-Wyssling A., 8th Symposium on Development and Growth—Growth Suppl., **12**, 151, 1948.
97. Frey-Wyssling A., Blank F., Nature, **145**, 974, 1940.
98. Brown R., Rickless P., Proc. Roy. Soc. (London), **B136**, 110, 1949.
99. Bennett E., Plant Physiol., **20**, 37, 1945.
100. Street H. E., Kenyon A. E., Watson J. M., Ann. Applied Biol., **33**, 1, 1946.
101. Crane F. A., Ph. D. Thesis, Interaction between Mineral Nutrients and Growth, Development and Metabolism: with Special Reference to *Mentha piperita L.*, University of Rochester, Rochester, N.Y., 1951 (Work done in the laboratory of F. C. Steward).
102. Pearsall W. H., Billimoria M. C., Ann. Botany [N. S.], **2**, 317, 1938.
103. Burström H., Botan. Arch., **B30**, 1, 1943.
104. Pearsall W. H., Endeavour, **8**, 99, 1949.
105. Walkley J., Petrie A. H. K., Ann. Botany, **5**, 661, 1941.
106. Lugg J. W. H., Advances in Protein Chem., **5**, 229, 1949.
107. Work E., Nature, **165**, 74, 1950.
108. Work E., Biochem J., **49**, 17, 1951.
108a. Wolley D. W., Schaffner G., Braun A. C., J. Biol. Chem., **198**, 807, 1952.
108b. Work E., Dewey T. L., Proc. 6th Intern. Congr. Microbiol. Rome, 1953.
109. Windsor E., J. Biol. Chem., **192**, 595, 1951.
110. Haworth R. D., MacGillivray R., Nature, **167**, 1068, 1951.
111. Vickery H. B., Schmidt C. L. A., Chem. Revs., **9**, 169, 1931.
112. Block R. J., Bolling D., The Amino Acid Composition of Proteins and Foods, Charles C. Thomas, Springfield, Ill, 1947 (Блок Р., Болинг Д., Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов, ИЛ, М., 1949).
113. Fowden L., Biochem. J., **50**, 355, 1951.
114. Lindan O., Work E., Biochem. J., **48**, 337, 1951.
115. Davis S. G., Fellers C. R., Esselen W. B., Jr., Food Research, **14**, 1, 1949.
116. Zacharius R. M., Ph. D. Thesis, University of Rochester, Rochester, N.Y., 1952 (Work done in the laboratory of F. C. Steward).
117. Pirie N. W., Rept. Rotham. Expt. Sta., p. 173, 1952.
118. Rabideau G. S., Edwards B. M., Plant Physiol., **26**, 798, 1951.
119. Rabideau G. S., Botan. Gaz., **113**, 475, 1952.
120. Fowden L., Biochem. J., **48**, 327, 1951.
121. Bonner J., Plant Biochemistry, Academic Press, New York, 1950, p. 537.
122. Williams G., J. Agr. Sci., **8**, 182, 1916/1917.
123. Bonner J., Fortsch. Chem. org. Naturstoffe, **6**, 290, 1950.
124. Wildman S. G., Jagendorf A. T., Ann. Rev. Plant. Physiol., **3**, 131, 1952.
125. Hoerr N. L., Biol. Symposia, **10**, 185, 1943.
125a. Rouelle H. M., J. méd. chir. pharm., **40**, 59, 1773.
126. Thoday D., New Phytologist, **32**, 274, 1938.

127. Menke W., Z. Botan., **32**, 273, 1938.
128. Granick S., Am. J. Botany, **25**, 561, 1938.
129. Neish A. C., Biochem. J., **33**, 293, 1939.
130. Hanson E. A., Barrien B. S., Wood J. G., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., **19**, 231, 1941.
131. Bot G. M., Chronica Botan., **7**, 66, 1942.
132. Newcomer E. H., Botan Rev., **17**, 53, 1951.
133. Lugg J. W. H., Weller R. A., Biochem. J., **42**, 408, 1948.
134. Lugg J. W. H., Biochem. J., **33**, 110, 1939.
135. Crook E. M., Biochem. J., **40**, 197, 1946.
136. Lugg J. W. H., Weller R. A., Biochem. J., **38**, 408, 1944.
137. Wildman S. G., Bonner J., Arch. Biochem., **14**, 381, 1947.
138. Pirie N. W., Biochem. J., **47**, 614, 1950.
139. Eggman L., Singer J. J., Wildman S. G., cited in ref. [124].
140. Jones E. R. H., Henbest H. B., Smith G. F., Bentley J. A., Nature, **169**, 485, 1952.
140a. Bentley J. A., Bickle A. S., J. Exptl. Botany, **3**, 406, 1952.
141. Wildman S. G., Campbell J. M., Bonner J., J. Biol. Chem., **180**, 273, 1949.
142. Wildman S. G., Campbell J. M., Bonner J., Arch. Biochem., **24**, 9, 1949.
143. Singer S. J., Eggman L., Campbell J. M., Wildmann S. G., J. Biol. Chem., **197**, 233, 1952.
144. Lugg J. W. H., Weller R. A., Biochem. J., **35**, 1099, 1941.
145. Laties G. G., Arch. Biochem., **27**, 404, 1950.
146. duBuy H. G., Woods M. W., Lackey M. D., Science, **111**, 572, 1950.
146a. Bonner J., Millerd A., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 135, 1953.
146b. Millerd A., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 149, 1953.
147. Reinke J., Ber. deut. botan. Ges., **2**, 265, 1884.
148. Fishman M. M., Moyer L. S., J. Gen. Physiol., **25**, 755, 1942.
149. Granick S., in Franck J., Loomis W. E., Photosynthesis in Plants, The Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1949, p. 113.
150. Galston A. W., Am. J. Botany, **30**, 331, 1943.
151. Neish A. C., Biochem. J., **33**, 300, 1939.
152. Rabinowitch E. I., Photosynthesis, Interscience Publishers, New York, 1945 (Рабинович Е. И., Фотосинтез, т. I и II, ИЛ, М., 1951 и 1953 соответственно).
153. Price W. C., Wyckoff R. W. G., Nature, **141**, 685, 1938.
154. Smith E. L., Pickels E. G., J. Gen. Physiol., **42**, 753, 1941.
155. Smith E. L., J. Gen. Physiol., **24**, 565, 583, 1941.
156. Moyer L. S., Fishman M. M., Botan Gaz., **104**, 449, 1943.
157. Wildman S. G., Cheo C. C., Bonner J., J. Biol. Chem., **180**, 985, 1949.
158. Wildman S. G., Bonner J., Sci. Monthly, **70**, 347, 1950.
159. Martin L. F., Balls A. K., McKinney H. H., J. Biol. Chem., **130**, 687, 1939.
160. Commoner B., Newmark P., Rodenberg S. D., Arch. Biochem. Biophys., **37**, 15, 1952.
161. Singer S. J., Bald J. G., Wildman S. G., Owen R. D., Science, **114**, 463, 1951.
162. Knight C. A., J. Biol. Chem., **171**, 297, 1947.
163. Wildman S. G., Bonner J., Phytopathology, **40**, 31, 1950.
164. Owen R. D., Wildman S. G., Phytopathology, **40**, 21, 1950.
165. Stanley W. M., Science in Progress, Yale Univ. Press, New Haven, Conn., 1949, p. 138.

166. Meneghini M., Delwiche C. C., J. Biol. Chem., **189**, 177, 1951.
167. Takahashi W. N., Phytopathology, **31**, 1117, 1941.
168. Spencer E. L., Plant Physiol., **16**, 663, 1941.
169. Commoner B., Mercer F. L., Arch. Biochem. Biophys., **35**, 278, 1952.
170. Woods N. W., Science, **91**, 295, 1940.
171. Commoner B., Mercer F. L., Merrill P., Zimmer A. J., Arch. Biochem., **27**, 271, 1950.
171a. Mercer F. L., Lindhorst T. E., Commoner B., Science, **117**, 558, 1953.
172. Commoner B., Dietz P. M., J. Gen. Physiol., **35**, 847, 1952.
172a. Commoner B., Nehari V., J. Gen. Physiol., **35**, 791, 1953.
172b. Commoner B., Schreiber D. L., Dietz P. M., J. Gen. Physiol., **35**, 807, 1953.
173. Newton N., Science, **114**, 185, 1951.
173a. Takahashi W. N., Ishii M., Phytopathology, **42**, 690, 1953.
174. Virtanen A. I., Cattle Fodder and Human Nutrition, Cambridge University Press, London, England, 1938.
175. Virtanen A. I., Hakala M., Jarvinen H., Suomen Kemistilehti, **22B**, 23, 1949.
175a. Giri K. V., Gopalkrishnan K. S., Radharkishnan A. N., Vaidyanathan C. S., Nature, **170**, 579, 1952.
176. Steinberg R. A., J. Agr. Res., **78**, 733, 1949.
177. Robbins W. J., MacVeigh I., Am. J. Botany, **33**, 638, 1946.
178. Reed L. J., J. Biol. Chem., **183**, 451, 1950.
179. Hulme A. C., Arthington W., Nature, **165**, 716, 1950.
180. Westall R. G., Nature, **165**, 717, 1950.
181. Synge R. L. M., Biochem. J., **48**, 429, 1951.
182. Thompson J. F., Pollard J. K., Jr., Steward F. C., Plant Physiol., **28**, 401, 1953.
183. Wada M., Biochem Z., **224**, 420, 1930.
183a. Miettinen J. K., Virtanen A. I., Physiol. Plantarum, **5**, 540, 1952.
184. Hijman A. J., Van Veen A. G., Geneesk. Tijdschr. Nederland, Indië, **76**, 840, 1936.
185. Kitagawa M., Yamada H., J. Biochem. (Japan), **16**, 339, 1932.
186. Torquati T., Arch. farmacol. sper., **15**, 213, 1913; C. A., **7**, 2449, 1913.
187. Catch J. R., Jones T. S. G., Wilkinson S., Ann. N.Y. Acad. Sci., **51**, 917, 1949.
188. King F. E., King T. J., Warwick A. J., J. Chem. Soc., **1950**, 3590.
189. Zacharius R. M., Thompson J. F., Steward F. C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2949, 1952.
190. Morrison R. I., Biochem. J., **53**, 474, 1953.
190a. Harris G., Pollock J. R. A., J. Inst. Brewing, **59**, 29, 1953.
190b. Hulme A. C., Arthington W., Nature, **170**, 659, 1952.
191. Done J., Fowden L., Biochem J., **51**, 451, 1952.
191a. Bickel A. S., Wibaut J. P., Rec. trav. chim., **65**, 65, 1946.
191b. Miettinen J. K., Kari S., Moisio T., Alfthan M., Virtanen A. J., Suomen Kemistilehti, **B2**, 26, 1953.
191c. Richards F. J., Coleman R. G., Nature, **170**, 460, 1952.
191d. Haddox C. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **38**, 482, 1952.
191e. Walker J. B., Proc. Natl. Acad., Sci., U. S., **38**, 561, 1952.
191f. Powell J. F., Biochem J., **54**, 210, 1953.
191g. Gäumann E., Naef-Roth S., Kobal H., Compl. Rend., **234**, 173, 1952.
192. James W. O., New Phytologist, **48**, 172, 1949.

193. Dekker C. A., Stone D., Fruton J. S., J. Biol. Chem., **181**, 719, 1949.
194. Guggenheim M., Die Biogenen Amine, Karger S., A. G. Verlag, Basel, Switzerland, 1951, p. 619.
195. Manske R. H. F., Holmes H. L., The Alkaloids, Academic Press, New York, vol. I, 1950; vol. II, 1952.
196. Schopfer W. H., Plants and Vitamins, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass, 1949, p. 293.
197. Skoog F., Plant Growth Substances, University Press, Madison, Wisconsin, 1951, p. 476.
197a. Synge R. L. M., Biochem. J., **49**, 642, 1951.
198. Wehmer C., Die Planzenstoffe, Gustav Fischer, Jena, 1931.
199. Wollaston W. H., Phil. Trans. Roy. Soc., 223, 1810.
200. Mueller J. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **19**, 161, 1922.
201. Rose W. C., McCoy R. H., Meyer C. E., J. Biol. Chem., **112**, 283, 1935.
202. Steward F. C., Street H. E., Plant Physiol., **21**, 155, 1946.
203. Neuberger A., Sanger F., Biochem. J., **36**, 662, 1942.
204. Steward F. C., Thomson J. F., Dent C. E., Science, **110**, 439, 1949.
205. Stepka W., Benson A. A., Calvin M., Science, **108**, 304, 1948.
206. Vernon L. P., Aronoff S., Arch. Biochem., **29**, 179, 1950.
207. Hunt G. E., Am. J. Botany, **38**, 452, 1951.
208. Roberts E. A. H., Wood D. J., Arch. Biochem. Biophys., **33**, 299, 1951.
209. Miettinen J. K., Acta Chem. Scand., **5**, 962, 1951.
210. Joslyn M. A., Stepka W., Food Res., **14**, 459, 1949.
210a. Duvick D. N., Am. J. Botany, **39**, 656, 1952.
210b. Harris G., J. Inst. Brewing, **58**, 417, 1952.
210c. Underwood J. C., Rockland L. B., Food Res., **18**, 17, 1953.
211. Virtanen A. I., Laine T., Biochem. J., **33**, 412, 1939.
212. Steeensholt G., Acta Physiol. Scand., **11**, 136, 1946.
213. Barger G., The Simpler Natural Bases, Longmans, Green and Co., London, 1914.
214. Werle E., Raub A., Biochem. Z., **318**, 538, 1948.
215. Emmelin N., Feldberg W., New Phytologist, **48**, 143, 1949.
216. Proom H., Woiwod A. J., J. Gen. Microbiol., 5, 930, 1951.
217. Kirkwood S., Marion L., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2522, 1950.
217a. Fowden L., Done J., Biochem J., **53**, 31, 1953.
218. Schales O., Mims V., Schales S. S., Arch. Biochem., **10**, 455, 1946.
218a. Karrer P., Organic Chemistry, Elsevier, New York, 1938 (Каррер П., Органическая химия, 1942).
219. Awapara J., Landua A. J., Fuerst R., Seale B., J. Biol. Chem., **187**, 35, 1950.
220. Roberts E., Frankel S., J. Biol. Chem., **187**, 55, 1950.
221. Udenfriend S., J. Biol. Chem., **187**, 65, 1950.
221a. Bessman S. P., Rossen J., Layne E. C., J. Biol. Chem., **201**, 385, 1953.
221b. Roberts E., Bregoff H. M., J. Biol. Chem., **201**, 393, 1953.
222. Прянишников Д. Н., Азот в жизни растений и земледелии СССР, АН СССР, 1945.
222a. Wibaut J. P., Kleispool R. J. C., Rec. trav. chim., **69**, 37, 1950.
222b. Adams R., Johnson J. L., J. Am. Chem. Soc., **71**, 705, 1949.

222c. Grobbelaar N., Steward F. C., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4341, 1953.
222d. Rothstein M., Miller L. L., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4371, 1953.
223. Vickery H. B., Pucher G. W., Leavenworth C. S., Wakeman A. J., Conn. Agr. Expt. Sta. Bull., No. 374, 1935.
224. Vickery H. B., J. Biol. Chem., **113**, 157, 1936.
225. Damodaran M., Ramaswamy R., Venkatesan T. R., Mahadevan S., Ramdas K., Proc. Indian Acad. Sci., **23B**, 86, 1946.
226. Reifer I., Melville J., J. Biol. Chem., **178**, 715, 1949.
227. Damodaran M., Venkatesan T. R., Proc. Indian Acad. Sci., **27B**, 26, 1948.
227a. Boynton D., Margolis D., Gross C. R., Proc. Am. Soc. Hort. Sci., in press.
228. Krebs H. A., Henseleit K., Z. physiol. Chem., **210**, 33, 1932.
229. Damodaran M., Narayanan K. G. A., Biochem. J., **34**, 1449, 1940.
230. Srb A. M., Horowitz N. H., J. Biol. Chem., **154**, 129, 1944.
231. Waelsch H., Advances in Enzymol., **13**, 237, 1952.
232. Archibald R. M., Chem. Revs., **37**, 161, 1945.
233. Ruhland W., Wetzel K., Planta, **1**, 558, 1926.
233a. McCay C. M., Nutrition of the Dog, Comstock Publishing Co., Ithaca, N. Y., 1949.
233b. Stein W. H., J. Biol. Chem., **201**, 45, 1953.
233c. Krotkov G., Massero W. J., Nelson C. D., Reed G. B., Arch. Biochem. Biophys., **42**, 471, 1953.
234. Miller H. K., Waelsch H., Nature, **169**, 30, 1952.
235. Miller H. K., Waelsch H., Arch. Biochem. Biophys., **35**, 176, 1952.
235a. Cochran W., Penfold B. R., Acta Cryst., **5**, 644, 1952.
235b. Katz L., Pasternak R. A., Corey R. B., Nature, **170**, 1066, 1952.
235c. Leach S. J., Lindley H., Nature, **171**, 1062, 1953.
235d. Tanford C., Shore W. S., J. Am. Chem. Soc., **75**, 816, 1953.
235e. Meister A., J. Biol. Chem., **200**, 571, 1953.
235f. Steward F. C., Thompson J. F., Nature, **171**, 1063, 1953.
236. Vickery H. B., Pucher G. W., Leavenworth C. S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **68**, 294, 1948.
237. Virtanen A. I., Berg A., Acta Chem. Scand., **5**, 909, 1951.
238. Grossowicz N., Wainfan E., Borek E., Waelsch H., J. Biol. Chem., **187**, 111, 1950.
239. Delwiche C. C., Loomis W. D., Stumpf P. K., Arch. Biochem. Biophys., **33**, 333, 1951.
240. Waelsch H., Owades P., Borek E., Grossowicz N., Schou M., Arch. Biochem., **27**, 237, 1950.
241. Stumpf P. K., Loomis W. D., Michelson C., Arch. Biochem., **30**, 126, 1951.
242. Yemm E. W., New Phytologist, **48**, 315, 1949.
243. Ritthausen H., Die Eiweißkörper der Getreidearten, Hulsenfrüchte und Ölsamen, Verlag von Max Cohen und Sohn, Bonn, 1872.
244. Damodaran M., Jaaback G., Chibnall A. C., Biochem. J., **26**, 1704, 1932.
245. Damodaran M., Biochem J., **26**, 235, 1932.
246. Stepka W., Takahashi W. N., Science, **111**, 176, 1950.
247. Gunsalus I. C., Bellamy W. D., Umbreit W. W., J. Biol. Chem., **155**, 685, 1944.
248. von Euler H., Adler E., Enzymologia, **7**, 21, 1939.

249. Krebs H. A., Enzymologia, 7, 53, 1939.
250. Ratner S., Nocito V., Green D. E., J. Biol. Chem., 152, 124, 1944.
251. Stumpf P. K., Green D. E., Biol. Chem., 167, 77, 1947.
252. Hulme A. C., Rept. Food Investigation Board, D.S.I.R. (London), 1937, p. 117.
253. Choudhury J. K., Proc. Roy. Soc. (London), B127, 238, 1939.
254. Schade A. L., Levy H., Arch. Biochem., 20, 211, 1948.
255. Levy H., Schade A. L., Arch. Biochem., 19, 273, 1948.
256. Goddard D. R., Holden C., Arch. Biochem., 27, 1, 1950.
257. Goddard D. R., Meeuse B. J. D., Ann. Rev. Plant Physiol., 2, 207, 1950.
258. Steinberg R. A., in Truog E., Mineral Nutrition of Plants, University Press, Madison, Wisconsin, 1951, p. 359.
259. Richards F. J., Templeman W. G., Ann. Botany, 50, 367, 1936.
260. Richards F. J., Ann. Botany [N. S.], 2, 491, 1938.
261. Gregory F. G., Ann. Rev. Biochem., 6, 557, 1957.
262. Spoehr H. A., McGee F. M., Carnegie Inst. Wash. Publ., No. 325, 1923.
263. Steward F. C., Ann. Rev. Biochem., 4, 519, 1935.
263a. Yemm E. W., Proc. [Roy. Soc. (London), B136, 632, 1950.
263b. Lipmann F. Federation Proc., 12, 673, 1953 and following papers in the Symposium on Chemistry and Functions of Coenzyme A.
263c. Calvin M., Chem. Eng. News., 31, 1622, 1735, 1953.
263d. Calvin M., Barltrop J. A., J. Am. Chem. Soc., 74, 6153, 1952.
264. Riker A. J., Gutsche A. E., Am. J. Botany, 35, 227, 1948.
265. Beadle G. W., Chem. Revs., 37, 15, 1945.
266. Avery G. S., Jr., Linderstrøm-Lang K., Botan. Gaz., 102, 50, 1940.
267. Northen H. T., Botan. Gaz., 103, 668, 1942.
268. Haurowitz F., Progress in Biochemistry, S. Karger, Basel, Switzerland, 1950.
269. Cohen P. P., McGilvery R., J. Biol. Chem., 169, 119, 1947.
270. Cohen P. P., McGilvery R., J. Biol. Chem., 171, 121, 1947.
271. Lipmann F., Federation Proc., 8, 597, 1949.
271a. Dounce A. L., Enzymologia, 15, 251, 1952.
271b. Steward F. C., Millar F. K., Symposia Soc. Exptl. Biol., 7, 1953.
271c. Binkley F., Exptl., Cell. Res., Suppl., 2, 145, 1952.
271d. Steinberg D., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., 199, 25, 1952.
271e. Dalgliesh C. E., Nature, 171, 1027, 1953.
271f. Campbell P. N., Work T. S., Nature, 171, 997, 1953.
272. Williams R. F., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 16, 65, 1938.
273. Watson R., Petrie A. H. K., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., 16, 65, 1938.
274. Steinberg R. A., Bowling J. D., McMurtrey J. E., Jr., Plant Physiol., 25, 279, 1950.
275. Jones W. M., Plant Physiol., 11, 565, 1936.
276. Kraybill H. R., Ind. Eng. Chem., 22, 275, 1930.
277. Kraybill H. R., Smith T. O., New Hampshire Agr. Expt. Sta. Bull., No. 212, 1924.
278. Turschin T. W., Z. Pflanzenernähr., Düng. Bodenk., 44, 65, 1936.
279. Reimer F. C., Tartar H. V., Oregon Agr. Expt. Sta. Bull., No. 163, 1919.

280. Olsen G. A., St. John J. L., Wash. Agr. Expt. Sta. Bull., No. 165, 1921.
281. Nightingale G. T., Schermerhorn L. G., Robbins W. R., Plant Physiol., **7**, 565, 1932.
282. Eaton S. V., Botan Gaz., **97**, 68, 1935.
283. Eaton S. V., Botan. Gaz., **102**, 536, 1941.
284. Wood J. G., Barrien B. S., New Phytologist, **38**, 125, 1939.
285. Wood J. G., Barrien B. S., New Phytologist, **38**, 257, 1939.
286. Wood J. G., Barrien B. S., New Phytologist, **38**, 265, 1939.
287. Burrell R. C., Botan Gaz., **82**, 320, 1926.
288. Nightingale G. T., Addoms R. M., Robbins W. R., Schermerhorn L. G., Plant Physiol., **6**, 605, 1931.
289. Wall M. E., Soil Sci., **47**, 143, 1939.
290. Bortels H., Arch. Mikrobiol., **1**, 333, 1930.
291. Bürstrom H., Planta, **30**, 129, 1939.
292. Hewitt E. J., Jones E. W., Williams A. H., Nature, **163**, 681, 1949.
293. Mulder E. G., Plant Soil., **1**, 94, 1948.
294. Steinberg R. A., J. Agr. Res., **55**, 891, 1937.
294a. Nason A., Evans H. J., J. Biol. Chem., **202**, 655, 1953.
294b. Evans H. J., Nason A., Plant Physiol., **28**, 233, 1953.
294c. Nicholas D. J. D., Nason A., McElroy W. D., Nature, **172**, 34, 1953.
294d. Fogg G. E., Wolfe M., Symposia Soc. Gen. Microbiol. (in press—cited from manuscript).
295. Brenchley W. E., Thornton H. G., Proc. Roy. Soc. (London), **B98**, 373, 1925.
296. Scripture P. N., McHargue J. S., J. Am. Soc. Agron., **35**, 988, 1943.
297. Scripture P. N., McHargue J. S., J. Am. Soc. Agron., **36**, 864, 1944.
298. Briggs G. P., Plant Physiol., **18**, 415, 1943.
299. Tsui C., Am. J. Botany, **35**, 172, 1948.
300. Nason A., Science, **112**, 111, 1950.
301. Smith C. B., Plant Phislol., **26**, 737, 1951.
302. Gilbert S. G., Sell H. M., Drosdoff M., Plant Physiol., **21**, 290, 1946.
303. Gilbert S. G., Plant Physiol., **26**, 398, 1951.
304. Lucas R. E., Soil Sci., **65**, 461, 1948.
305. Virtanen A. I., Biol. Revs., Cambridge Phil. Soc., **22**, 239, 1947.
306. Bennet J. P., Soil Sci., **60**, 91, 1945.
307. Guest P., Proc. Am. Soc. Hort. Sci., **42**, 104, 1943.
308. Commoner B., Yamade M., Rosenberg S. D., Wang T. Y., Baster E., Jr., Science, **118**, 529, 1953.

БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛИМФЫ*

У. Юз

W. L. Hughes, Jr., «Interstitial Proteins: The Proteins of Blood Plasma and Lymph» (vol. II, part B, pp. 663—754)

1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ОБЩИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ

А. Пределы свободной диффузии

Основное назначение циркуляторной системы, очевидно, заключается в переносе метаболитов. Простой расчет показывает, что путем диффузии не может доставляться достаточное количество метаболита на расстояния, превышающие несколько миллиметров. Так, например, было вычислено, что это диффузионное расстояние для O_2 при нормальном атмосферном давлении и при скорости потребления кислорода, свойственной ткани млекопитающего, составляет 0,2 *мм* [1, 2].

Б. Описание крови, клеток крови и плазмы

Циркуляционная система, развитая у высших животных, впервые проявляется в виде гемоцеля (например, у ракообразных), представляющего собой кровяной резервуар, из которого жидкость нагнетается через непрерывную разветвленную систему к тканям, откуда она возвращается к кровяной полости, и в конечном итоге завершается замкнутой сосудистой системой у высших моллюсков

---

* 1. Эта глава не претендует на полное изложение предмета. Однако автор считает, что при принятом способе изложения достигаются лучшее понимание и критическая оценка предмета, возмещающие значительные в некоторых отношениях пропуски. Ряд белков, которые, естественно, можно было бы включить в данную главу, рассматриваются в других главах и поэтому упоминаются здесь лишь попутно. К таким белкам относятся гемоцианин (гл. VI) и фибрин (гл. VIII). Изъятие из данной главы рассмотрения фибрина не могло, с точки зрения автора, служить основанием для того, чтобы полностью исключить вопрос о свертывании крови, который представляется в настоящее время весьма сложным. Поэтому кратко рассмотрены некоторые данные, относящиеся к фибриногену и протромбину, и указана более обстоятельная литература по этому вопросу. Рассмотрение иммунитета ограничено неиммунными свойствами антител (более полное изложение вопроса дано в гл. VII).

2. Принимая полную ответственность за излагаемые здесь взгляды, автор выражает признательность многим друзьям, с которыми у него были плодотворные дискуссии и чьи взгляды, естественно, нашли отражение в данной главе. Особую благодарность автор выражает Д. Джитлину, Г. Излайкеру, Дж. Паппенгеймеру, а также редакторам этой книги.

(осминог) и позвоночных [3, 4]. На всем протяжении этой эволюции кровь состоит из различных «форменных элементов» (клетки и небольшие частицы, такие, как кровяные пластинки) и большого разнообразия молекул, начиная с молекул солей, сахаров, аминокислот и других метаболитов и кончая большими молекулами белков плазмы.

Взятие крови для получения белков плазмы требует особых предосторожностей, чтобы избежать быстрых изменений, происходящих в крови после ее извлечения. Кровь является жидкостью, способной самопроизвольно застудневать; процесс свертывания, приводящий к этому застудневанию, активируют химически или физически некоторые составные элементы крови или вещества, образующиеся в результате повреждения тканей. В крови позвоночных изменения такого рода можно задержать путем предотвращения контакта крови с поврежденными клетками или со «смачиваемыми» поверхностями. Для этого вводят трубчатую иглу непосредственно в сосудистую систему и применяют сосуды, пробирки и пр., поверхности которых покрыты парафином или другим несмачиваемым материалом. В настоящее время для этой цели наиболее удобно применять пробирки, сосуды и даже иглы, изготовленные из пластмасс [5] или «силиконизированные» стеклянные изделия [6], а также покрытые силиконовым маслом иглы и другие металлические части.

Коагуляцию крови можно также предотвратить путем исключения одного из последовательно связанных друг с другом процессов, приводящих к образованию сгустка. Этот метод оказывался успешным, когда не предполагалось изучение самого процесса свертывания крови. Для предотвращения коагуляции прибавляют цитрат [7, 8], оксалат или натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты [9] в качестве веществ, связывающих ионы кальция. Эти вещества прерывают процесс свертывания, останавливая превращение протромбина в тромбин (процесс, в котором принимают участие ионы кальция). Свертывание предотвращают также, пропуская кровь через катионообменную смолу, обработанную насыщенным раствором NaCl, при этом ионы кальция крови обмениваются на ионы натрия [10]. Можно применять также гепарин, который оказывает влияние на последнюю стадию процесса свертывания, предотвращая действие тромбина на фибриноген*.

Если хотят иметь «дефибринированную» кровь, то брать кровь можно без каких-либо предосторожностей, при этом во время свертывания кровь перемешивают (взбивают), что предотвращает значительную окклюзию клеток сгустком, который, сокращаясь, образует небольшие кусочки**.

* Однако *in vivo* гепарин, по-видимому, останавливает превращение протромбина [11].

** Представляет исторический интерес то обстоятельство, что этот процесс был описан Хьюсоном, который впервые изолировал фибрин [12].

Плазму—часть крови, освобожденную от клеток,—можно получить или простым осаждением клеток (при использовании крови лошади), или удалением их посредством центрифугирования.

Разные виды клеток в крови человека значительно различаются по плотности, что дает возможность разделять их при помощи жидкостной колонки с градиентом плотности [13—15]. В большом масштабе такое разделение клеток можно производить дифференциальным центрифугированием. Этот процесс более эффективен при применении специальных центрифуг (Кунс, частное сообщение) и реагентов, вызывающих агрегацию эритроцитов, например декстрана [16]. Кровяные пластинки отделяют посредством дифференциального центрифугирования или путем адсорбции на ионообменных смолах (Таллис, личное сообщение).

Полученная таким образом плазма из крови голодающих животных представляет собой желтоватую жидкость, которая на вид кажется устойчивой, если она стерильна. Однако при хранении плазмы в ней происходят непрерывные изменения не только упомянутых выше компонентов свертывания крови, но также липопротеидов, комплемента и др. [17]. Некоторые изменения вызываются находящимися в плазме ферментами, другие связаны с естественной неустойчивостью белковых компонентов. Эти изменения можно свести до минимума, если хранить плазму при низкой температуре, однако при 0° может происходить осаждение значительных количеств фибриногена или нерастворимого на холоду глобулина. Поэтому кровь рекомендуется хранить при 4°. Плазму крови можно сохранять замороженной или высушенной (посредством «лиофилизации»—возгонки воды из замороженной плазмы в вакууме), при этом устойчивость ряда компонентов заметно повышается. Однако некоторые липопротеиды изменяются при применении этой техники (см. стр. 343).

Постоянство состава плазмы крови явилось для Бернара отправной точкой для установления понятия о *milieu interieur**, которая окружает все клетки организма и предохраняет их от вредного воздействия внешней среды. Постоянство, на которое ссылается Бернар, относится к составу циркулирующих электролитов (табл. 29), который действительно отличается постоянством, не обычным для «биологических констант». Белки (включая липопротеиды) составляют основную массу компонентов плазмы и по сравнению с постоянством ионного состава подвержены более значительным изменениям, которые можно установить физико-химическими методами. Так, общее количество белка в плазме можно определять по плотности, однако при этом возможны ошибки, если содержание липидов в плазме изменяется. Действительно, при использовании этого метода почти не учитывается наличие липидов, поскольку их

* Внутренней среды.

плотности близки к плотности воды. Поэтому данные о количестве белка, полученные этим методом, находятся в хорошем соответствии с величинами, найденными путем определения азота, при допущении, что все белки содержат 16% N [18].

Количество белка можно также определить посредством измерения показателя преломления. Поскольку показатель преломления липидов относительно близок по своей величине к показателю преломления белков, то данные, полученные этим методом, хорошо совпадают с определениями белка как общего количества недиализируемых веществ в плазме [19].

Таблица 29

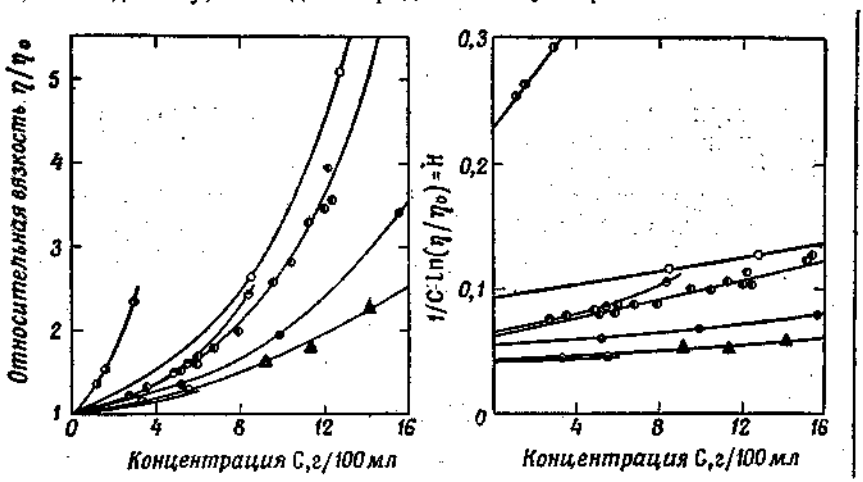
ИОННЫЙ СОСТАВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Катионы	Количество, *мэкв/л*	Анионы	Количество, *мэкв/л*
Na^+	142	Cl^-	103
K^+	5	HCO_3^-	27
Ca^{2+}	5	HPO_4^{2-}	2
Mg^{2+}	3	SO_4^{2-}	1
		Органические кислоты	6
		Белок	16
Всего...	155	Всего...	155

В. Необходимые условия для циркуляторной функции

Белки плазмы млекопитающих обладают сходными физико-химическими свойствами: все они отрицательно заряжены при физиологических значениях pH и имеют молекулярные веса в пределах от 40 000 до 150 000 (белки с бóльшими молекулярными весами указаны в табл. 34). Эта относительная гомогенность, по-видимому, связана с функцией белков в кровяном токе. Указанные размеры молекул близки к размерам «пор» ретикуло-эндотелия (эти поры, очевидно, устроены так, что относительно небольшие изменения в структуре мембраны могут значительно изменять количество белка, проходящего через мембрану). Через оболочки общего капиллярного русла (включая гломерулы почек) проходит только незначительная часть белка, бóльшие количества белка проникают через капилляры печени [20]. Несомненно, что ограниченная способность к диффузии, по-видимому, необходима для сохранения высокой концентрации белков в крови. Однако, возможно, более интересным является вопрос, почему мембраны вообще обладают какой-то проницаемостью. Имеет ли значение это «несовершенство» природы

для высокой проницаемости некоторых метаболитов с небольшими частицами или такого рода проницаемость мембран по отношению к белкам способствует выполнению их функций? В случае некоторых белков, например обладающих гормональной активностью, правильно, по-видимому, последнее предположение. Проницаемость может



Р и с. 17. Вязкость белков плазмы при 37° (по данным Онклея с сотрудниками [61]).

◑ фибриноген; ○ α_2-глобулин (IV-6); ◓ α_1-липопротеид; ◐ γ-глобулин; ● β_1-глобулин, $s=5{,}5$ (IV-7); ▲ альбумин; ◒ β_1-липопротеид.

оказаться необходимым свойством и по отношению к белкам, функция которых состоит в переносе метаболитов или защите организма от инфекции. Дальше будет дополнительно рассмотрено соотношение между функцией различных белков плазмы и их относительной проницаемостью.

То, что частицы всех белков плазмы при физиологических значениях pH отрицательно заряжены и близки по размерам (см. табл. 34), является существенным для их осмотической активности (см. раздел 2). Эти факторы важны и для гидродинамической активности белков. Действительно, взаимодействие белков между собой, усиливающееся, когда частицы белков несут противоположные по знаку электрические заряды, должно было бы приводить к уменьшению осмотического давления и увеличению вязкости крови. Это относительно слабое взаимодействие между белками плазмы является благоприятным моментом для исследователей, занимающихся выделением индивидуальных белков.

Белки плазмы, за исключением фибриногена, характеризуются также близкими и относительно низкими значениями внутренней вязкости (рис. 17). Для кровообращения это имеет существенное значение, так как при этом уменьшается работа, производимая серд-

цем. Фибриноген, естественно, имеет асимметричные частицы (и поэтому является вязким); он представляет собой тот материал, из которого образуется остов кровяного сгустка.

Г. Распределение белков в плазме, экстраваскулярной жидкости и клетках

1) ИСТОЧНИКИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ

Несмотря на то, что среди белков плазмы имеется ряд легко идентифицируемых компонентов с частицами такой величины, которая способствует их задержке в сосудистой системе, все же в полной мере эта задержка не осуществляется. Так, при помощи изотопов было показано, что при инфузии небольшого (по сравнению с содержанием в плазме) количества сывороточного альбумина приблизительно 50% его выходит из кровотока в течение первого же дня [21]*. Значительную часть этой «потери» можно объяснить выходом белка из капилляров в межклеточные пространства**. В целом объем таких пространств значителен и составляет около $^1/_5$ общего объема организма млекопитающего [24] и, следовательно, примерно в 3 раза больше объема плазмы. Содержание белка в этой экстраваскулярной жидкости должно изменяться в широких пределах; среднее значение находится между 0 и 2—4%—содержание белка в лимфе [25]. Таким образом, имеется, по-видимому, достаточно оснований для того, чтобы объяснить потерю белка посредством трансфузии.

Однако лимфа представляет собой концентрированную (в отношении белка) экстраваскулярную жидкость; очень малая проницаемость капилляров по отношению к белкам плазмы в сочетании с практически полным равенством между осмотическим давлением коллоидов плазмы и средним капиллярным гидростатическим давлением (превышающим тканевое давление) [26] приводит к выводу, что экстраваскулярная интерстициальная жидкость должна содержать белка плазмы значительно меньше (в среднем меньше 1%), чем это следует из рассмотренных выше соображений. Дринкер установил, что находящаяся в покое конечность в нормальном состоянии не отекает, несмотря на недостаточность лимфотока [25]. Отсюда

---

* Дейхмиллер, Диксон и Маурер [22] нашли, что время, в течение которого исчезает половина некоторых гомологичных сывороточных альбуминов (меченных J^{131}), для человека равно 15 дням, для собаки—8 дням, для кролика—6 дням, для мыши—1,2 дня.

Это явление, вероятно, впервые наблюдали у людей Дженджэй и Нейл, которые, применяя количественный преципитиновый метод Гейдельбергера для изучения скорости выхода из кровотока сывороточного альбумина быка, нашли, что 50% белка исчезает в течение первого дня; в дальнейшем скорость выделения значительно уменьшается.

** С помощью гомологического антитела Гитлин и Дженуэй [23] установили наличие динамического равновесия между васкулярным и экстраваскулярным белком.

опять следует, что фильтрация белка должна быть ничтожно малой. Эти соображения приложимы также к экстраваскулярной жидкости скелетных мышц и придатков. Этому соответствует и тот факт, что при перфузии изолированной задней конечности [27] не наблюдается перехода белка плазмы в экстраваскулярное пространство*.

Поэтому рассмотренная выше большая потеря белка, по-видимому, не является повсеместной. В некоторых внутренних органах (например, в печени), проницаемость капилляров которых, как известно, велика, должны существовать экстраваскулярные «резервуары» белков плазмы, близкие по своей концентрации к плазме крови. [Вследствие низкого гидростатического давления в системе воротной вены проницаемость ее капилляров, по-видимому, должна быть высокой (см. раздел 2).]

2) О НАЛИЧИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ ВНУТРИ КЛЕТОК

Другим возможным местонахождением белков плазмы являются клетки. Недавно проведенные иммунохимические исследования показали, что при инъекции гетерологических белков последние быстро обнаруживаются внутри клеток, и особенно в их ядрах. В клетках и в клеточных ядрах обнаружены также гомологические белки плазмы. Разработанный Кунсом для этой цели «иммуногистохимический метод» состоит в окраске фиксированных спиртом срезов ткани антителом, связанным с флуоресцентным красителем. После удаления соответствующей отмывкой неспецифически адсорбированного антигена локализацию белка, для связывания которого вводилось антитело, наблюдали методом ультрафиолетовой микроскопии [28]. Таким путем Кунс наблюдал быстрое (в течение 10 мин.) проникновение овальбумина и сывороточного альбумина в различные клетки после их внутривенной инъекции мышам [29]. Гауровитц также показал, что после инъекции кроликам меченных радиоактивным иодом чужеродных белков последние проникают в клетки печени. Таким образом он обнаружил радиоактивность в различных частях клетки: в микросомах, митохондриях и ядрах. Однако радиоактивное вещество можно было отделить от самого нуклеопротеида [30].

Можно предположить, что такое проникновение белка внутрь клеток является первой стадией иммунной реакции животного, ана-

* Личное сообщение Паппенгеймера. Он измерял изменения осмотического давления и поэтому не мог обнаружить изменений в белке экстраваскулярной жидкости, который был осмотически неактивным. О наличии такого «связанного» белка плазмы можно судить по присутствию белков плазмы вместе с интерстициальной соединительной тканью в иммунохимически окрашенных гистологических срезах, взятых из любой части тела [33]. Если это не является артефактом при изготовлении гистологических препаратов, то, возможно, потребуются дальнейшие изменения наших представлений о механизме капиллярной проницаемости.

логичной ранее наблюдавшемуся фагоцитозу особых антигенов [31]. Однако распределение белка, наблюдавшееся Кунсом, представляет более распространенное явление и не ограничивается теми клетками, которые обычно связывают с этим процессом*. Применяя технику Кунса, Джитлин с сотрудниками изучал распределение гомологичных белков плазмы в клетках [33] и обнаружил, что подобное распределение наблюдается в тканях человека для сывороточного альбумина, γ-глобулина и β-липопротеида. Посредством инъекции ребенку γ-глобулина, который не может синтезироваться в его организме, было показано, что рассмотренное выше распределение белков действительно представляет проникновение их в клетки. Ткани ребенка, которые до инъекции не дают окраски, характерной для γ-глобулина, нормально окрашиваются после инъекции.

Не известно, могут ли белки плазмы обратимо поступать и снова покидать клетку, хотя было установлено, что гетерологические белки исчезают из клеток примерно за тот промежуток времени, за который должно совершаться их выведение из кровотока [29]. Количественные данные, относящиеся к этим опытам, не известны, однако отмечалось, что внутри мышечных клеток [33] можно было обнаружить только следы белков плазмы. Следовательно, при сколько-нибудь значительных накоплениях белков в клетках белки плазмы должны снова переходить в межтканевые пространства тела.

Значение внутриклеточных белков плазмы, по-видимому, состоит в том, что они имеют непосредственное отношение к белковому обмену. Шонгеймер, Риттенберг и др. [34] установили наличие динамического равновесия между белками плазмы и тканевыми белками, а Уиппл и Медден [35] показали, что белки плазмы имеют важное значение как источники аминокислот при голодании животного. Однако не ясно, переносятся ли белки плазмы к месту их включения неизмененными или они сперва расщепляются на составляющие их аминокислоты (см. т. III, ч. 2). Решить этот вопрос на основании известных физических параметров невозможно, так как концентрация большинства связанных аминокислот (в виде белков) в 10—100 раз больше концентрации свободных аминокислот в плазме, в то время как проницаемость капилляров по отношению к свободным аминокислотам, вероятно, в 100 раз превосходит проницаемость по отношению к белкам [36]; кроме того, накопление данных о захвате белков клетками происходит медленно, явление же захвата аминокислот значительно более теоретически обосновано [37].

3) О НАЛИЧИИ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ

Присутствие случайных белков в плазме, поступающих в нее из тканей, может быть результатом отмирания клеток или повышенной

* О влиянии изменения физико-химических свойств на распределение белка в клетках (фагоцитоз?) см. работу Гитлина [32].

проницаемости клеточных мембран. Таким образом можно объяснить нахождение в плазме гидролитических ферментов, например амилазы, фосфатазы и эстеразы. Наличие в плазме каталазы, которую иногда рассматривают как плазменный фермент, может быть следствием гемолиза при собирании крови, так как ее концентрация пропорциональна концентрации гемоглобина в плазме [38]. Аналогично деструкцией эритроцитов объясняют наличие пептидаз в сыворотке [39]. Недавно в куриной плазме был обнаружен овальбумин, причем в наибольших количествах у несущихся кур. Однако концентрация его никогда не превышала 0,1% общего количества белка [40].

При патологических состояниях часто наблюдаются изменения состава белков плазмы, изучение которого приобретает все возрастающее значение в диагностике различных заболеваний. Эти изменения могут заключаться или в изменении содержания нормальных белковых компонентов плазмы (например, уменьшение концентрации альбумина при нефрозах), или в появлении одного или нескольких новых компонентов, не обнаруживаемых в плазме при нормальном состоянии. Интересным примером последнего случая является появление кристаллического «реакционноспособного компонента С» Мак-Карти [41] (белок, обнаруживаемый в течение острого периода некоторых инфекционных заболеваний). Более подробное рассмотрение патологического изменения состава плазмы выходит за рамки данной главы, и читателю рекомендуется обратиться к обзорной статье Гутмана [42].

Д. Обмен белков плазмы

Обмен белков плазмы более полно рассмотрен в т. III, ч. 2. Здесь же интересно отметить, что важнейший компонент плазмы—сывороточный альбумин—при голодании животного проявляет свойства резервного белка. Скорость кругооборота сывороточного альбумина человека тем не менее очень мала (7% в сутки) [22], что указывает на относительную устойчивость этого белка в процессах обмена и катаболизма. Однако устойчивость альбумина *in vitro* при физиологических условиях настолько велика [43, 44], что его исчезновение не может быть функцией «изнашивания» при кровообращении. Были обнаружены места образования определенных белков плазмы; так, сывороточный альбумин найден в печеночных срезах [45], иммунный глобулин—в плазме клеток [46]*.

* Миллер, Бейл и Бли [47] установили включение C^{14} (ε-лизин) во все белки плазмы, за исключением γ-глобулинов, при перфузии печени, а также в γ-глобулины при перфузии трупа, лишенного внутренностей. В перфузированном трупе небольшие количества C^{14} включаются также в α- и β-глобулины. Однако это скорее объясняется связыванием продуктов обмена лизина липопротеидами, а не синтезом белка.

2. ПОСТОЯНСТВО ОБЪЕМА СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

А. Физиология периферического кровообращения

В более простых системах кровообращения, например у ракообразных, кровь из сердца проходит через все более и более мелкие сосуды, разветвляющиеся в непрерывную сеть—«сосудистое дерево», и в конце концов просачивается в межклеточные пространства, из которых она переходит обратно в целомическую полость тела и отсюда по венам к сердцу. Имеющиеся при этом осмотические соотношения маскируются явлением активного переноса через клеточные поверхности.

В замкнутой сосудистой системе позвоночных для объяснения явления кровообращения достаточно знания законов гидродинамики и диффузии. Для предотвращения сжатия кровеносных сосудов давление крови внутри них должно быть больше, чем в окружающем сосуды тканевом пространстве. Поскольку через проницаемые стенки капилляров проходит небольшое количество жидкости, гидростатическое давление в них должно уравновешиваться химическим потенциалом (осмотическим давлением) [48]. Действительно, средняя величина перепада гидростатического давления по обе стороны стенки капилляра в пределах ошибок опыта равна осмотическому давлению коллоидов крови [49]*. Если учесть доннановское равновесие, устанавливающееся по обе стороны стенки капилляра, то состав лимфы и плазмы по отношению к ионам и низкомолекулярным веществам должен быть одинаков [51]. Следовательно, активная секреция капилляров или не имеет значения, или не существует (конечно, нельзя исключить возможность специфического секреторного механизма для небольших количеств некоторых компонентов).

Вследствие того, что вдоль капилляра наблюдается непрерывное падение давления, в артериальном конце капилляра гидростатическое давление превышает осмотическое давление, и жидкость выходит из капилляра, тогда как в венозном конце она поступает в капилляр из межклеточного пространства. Жидкость, не поступившая из межклеточных пространств в венозный конец капилляра, собирается лимфатической системой и изливается в вену. Эта лимфа содержит белки плазмы, концентрация которых после перехода их в вену повышается вследствие реабсорбции воды. Тем не менее фильтрация в этом физиологическом процессе, по-видимому, относительно

* Интересное отклонение наблюдается у осьминогов, у которых, несмотря на высокое гидростатическое давление крови [25], осмотическое давление коллоидов мало (давление крови в аорте равно 25—80 *мм* рт. ст. [25], осмотическое давление коллоидов 2,7 *мм* [50]). Интересно, каким образом в организме осьминога разрешается это затруднение: путем ли большого перепада давлений между сердцем и проницаемыми капиллярами, вследствие ли большего лимфотока или каким-либо иным образом.

несущественна. Скорость кровотока в конечных отрезках артерий достаточно мала, поэтому диффузия большинства веществ имеет важное значение [36]. Это значит, что фильтрация (движение молекул растворенных веществ с потоком) незначительна по сравнению с их броуновским движением (это, конечно, благоприятствует диффузии метаболитов против потока в венозном конце капилляров). Из этого следует также, что геометрическое распределение капилляров должно обеспечить достаточную диффузию к каждой клетке, как это указывалось в разделе 1. (Крог показал, что расстояние между капиллярами равно приблизительно 0,02 *мм* [52].)

До сих пор мы имели дело с перепадами давления по обе стороны стенки капилляров. Абсолютное давление в капилляре должно превышать атмосферное давление на величину этого перепада (осмотическое давление коллоидов) плюс тканевое давление. Тканевое давление можно рассматривать как упругое сопротивление растяжению тканей. Следовательно, при уменьшении осмотического давления коллоидов (гипопротеинемия) при постоянном гидростатическом давлении в капилляре ткань должна набухать (отек). Наоборот, в терапии при инъекции белка плазмы осмотическое давление коллоидов повышается и жидкость поступает обратно в кровоток, откуда она выделяется через почки, уменьшая отек. (Механизм диуреза, возникающего в результате повышения осмотического давления коллоидов плазмы, не совсем ясен, так как при уменьшении химического потенциала воды гломерулярная фильтрация должна была бы уменьшаться.)

Б. Проницаемость капилляров и функция почек

Мембраны можно рассматривать как молекулярные сита, дающие возможность разделять молекулы соответственно их величине. Это было доказано на искусственных мембранах [53], хотя диаметр пор применяемых при этом мембран и не был абсолютно одинаков.

С этой точки зрения мембраны сосудов, казалось бы, должны иметь в различных органах разные по диаметру поры: самые маленькие—в почечных гломерулах и наибольшие—в капиллярах печени [20]*. Имеется значительное количество данных, относящихся к почечным гломерулам, полученным в результате исследований функции почек и прекрасных опытов Ричардса с сотрудниками на изолированных гломерулах. Общепринято, что белки, величина молекул которых больше, чем у альбуминов, не проходят через мембрану гломерулы. Однако для молекул, близких по величине к молекулам альбумина, имеются некоторые противоречивые данные.

* Современные электронномикроскопические исследования почек, по-видимому, подтверждают физиологические данные [54].

Г. Сывороточный альбумин

1) ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Как указывалось выше, методы определения сывороточных альбуминов млекопитающих, обусловливающих наибольшую часть осмотического давления, создаваемого коллоидами плазмы, изменялись по мере накопления и расширения наших знаний. Каждое новое определение в общем приводило к исключению какого-либо родственного белка, который имел некоторые особенности по сравнению с основной массой сывороточных альбуминов. Так, в одной из первых классификаций, основанной на растворимости, сывороточные альбумины определялись как белки, растворимые в полунасыщенном растворе сульфата аммония или растворимые при диализе против дистиллированной воды, насыщенной углекислым газом [63, 64]. Уже в то время было установлено посредством изучения химического состава отдельных фракций, получаемых из альбуминов при их кристаллизации [65] или другим путем, что такие альбумины содержат заметные количества совершенно отличных от них компонентов. Электрофоретический анализ, разработанный Тизелиусом [66], представляющий более совершенный метод разделения белков на отдельные компоненты, привел к новому определению сывороточного альбумина человека, согласно которому этот белок является главным компонентом при электрофоретическом анализе, имеющим подвижности, равные (в единицах Тизелиуса) —5,2 в фосфатном буфере (Г/2 0,2, pH 7,7) и —6,0 в вероналовом буфере (Г/2 0,1, pH 8,6) [67]. (Вероналовый буфер имеет то преимущество, что в нем лучше растворяются примеси α_1-глобулина [67].) Аналогичным образом можно определить бычий альбумин и, вероятно, альбумины других животных.

По-видимому, наиболее простой химической пробой на чистоту альбумина является определение углевода, так как при кристаллизации электрофоретически гомогенного (более 98%) альбумина человека или быка бо́льшая часть получаемого белка не содержит углевода. Можно предположить, что содержащийся до кристаллизации углевод был связан с небольшими количествами α-глобулинов, допуская, что содержание углевода в последних составляет не более 10% [68]*.

2) ГЕТЕРОГЕННОСТЬ

Однако определяемые таким образом альбумины еще не представляют собой гомогенных белков; они не становятся гомогенными и при повторной перекристаллизации из водно-спиртовых смесей [68]. Гетерогенность может быть установлена электрофоретическим ана-

* Таким образом, это определение исключает прежде описанные «углеводсодержащие» альбумины (последние рассматриваются в связи с гликопротеинами в разделе 8)

лизом, проводимым при более критических значениях pH. Так, наиболее очищенные препараты альбуминов, как это впервые обнаружил Лейтчер [69], при pH 4,0 можно электрофоретически разделить на два (или более) компонента. Они также обнаруживают обратимое растекание на границе раздела при pH 4,6 [70]. Последний метод является более достоверным. Электрофоретические измерения при pH 4,0, хотя и являются вполне воспроизводимыми, интерпретируются труднее, так как они осуществляются в области, в которой альбумин, возможно, неустойчив, и, кроме того, вид получаемых при этом электрофореграмм в значительной степени определяется находящимися в среде ионами.

Повторно перекристаллизованные сывороточные альбумины оставались гетерогенными, что было установлено при определении постоянства растворимости с избытком растворяемого препарата в забуференных водно-спиртовых системах (Юз, неопубликованные сообщения). Исключением является сообщение Мак-Микина, который нашел, что фракция сывороточного альбумина лошади, кристаллизующаяся в виде сульфата при pH 4,0, при повторных перекристаллизациях из раствора сульфата аммония, будучи приведена в равновесие с этим растворителем, обнаруживает постоянную растворимость [71]. К сожалению, в его исследованиях количества насыщающего раствор препарата изменялись не в достаточно широких пределах, чтобы выяснить, насколько строго выполнялся критерий постоянства растворимости. Кендалл [72] также установил, что кристаллический комплекс сывороточного альбумина человека с жирными кислотами обнаруживает исключительное постоянство растворимости. Однако препарат Кендалла был гетерогенным в отношении содержания жирных кислот (смесь стеариновой, олеиновой, линоленовой и других кислот). Сам глобулин был, вероятно, неоднородным по содержанию сульфгидрильных групп, как это будет рассмотрено ниже. Поэтому Кендалл, по-видимому, имел дело с твердым раствором, находящимся в равновесии с жидким раствором того же состава. Нортроп с сотрудниками наблюдали аналогичное явление при изучении пепсина [73].

Простое химическое доказательство гетерогенности сывороточных альбуминов человека и быка можно получить путем определения содержания сульфгидрильных групп. Юз во всех опытах находил значительно менее одной тиоловой группы на одну молекулу альбумина человека или быка, если они не были фракционированы ртутным методом [74]. Однако фракционированные таким путем препараты все же обнаруживали гетерогенность по критерию растворимости и при электрофорезе в кислой среде.

В небольшой степени гетерогенность обнаруживается также при ультрацентрифугировании в буферных растворах с ионной силой 0,1. При этом гетерогенность обычно выявляется по небольшой асимметрии шлирен-диаграммы. Однако в случае «плохих» препаратов

впереди главного пика может наблюдаться четкий выступ, которому соответствует константа седиментации, отвечающая димеру альбумина. Количество этого компонента зависит от возраста и предыстории препарата альбумина. Хранение в «сухом» состоянии при комнатной температуре, по-видимому, особенно неблагоприятно. Считают, что метод ультрацентрифугирования имеет меньшее значение по сравнению с другими методами измерения гетерогенности, так как степень гетерогенности обычно ниже 10%, а в хороших препаратах—меньше 5%.

Относительно основных причин гетерогенности альбумина можно сделать следующие предположения. Во-первых, можно допустить, что механизм биосинтеза не является достаточно точным для полного воспроизведения всей сложности молекул сывороточных альбуминов. Однако на основании того, что известно о специфичности биосинтеза, такое предположение кажется маловероятным. Во-вторых, естественно предположить, что молекула альбумина, находясь в кровотоке, с течением времени может подвергаться небольшим изменениям. Таким образом, смесь вновь образованных и старых молекул будет гетерогенной. С точки зрения структурных представлений это изменение может выразиться в уменьшении содержания сульфгидрильных групп в сывороточном альбумине. Как известно, сульфгидрильные группы весьма неустойчивы и в физиологических условиях могут окисляться, а также соединяться между собой. Однако при современном состоянии знаний трудно распространять аналогичные представления на другие группы, находящиеся в молекулах сывороточного альбумина. Нет никаких данных об изменениях, связанных с окислением фенольных групп остатков тирозина в молекулах этого белка. Изменения, связанные с гидролитическими процессами, которые могут проявляться в изменении суммарного заряда (гидролиз амидов), не происходят в значительной степени, как это подтверждается электрофоретической гомогенностью белка. Наблюдавшееся Альберти незначительное обратимое растекание изоэлектрического сывороточного альбумина на границе раздела он объяснял изменением суммарного заряда молекулы белка, так как в молекуле сывороточного альбумина находится 86 гидролизуемых амидных связей [70].

Гетерогенность, наблюдаемая электрофоретически или посредством определения растворимости, может быть следствием прочного связывания электрически заряженных частичек примесей. Сывороточные альбумины весьма прочно связывают многие анионы, хотя и не в простых стехиометрических отношениях (см. стр. 326, а также т. II, гл. V). Так, очищенные альбумины обычно содержат небольшие количества высших жирных кислот, измеряемые долями моля каждой кислоты на моль белка [68]. Не известно, можно ли подобной гетерогенностью объяснить изменение растворимости. Юз, исследуя растворимость белка в водно-спиртовых системах, обна-

ружил признаки (хотя и незначительные) фракционирования белка в отношении содержания жирных кислот. Кроме того, Кенделл установил, что при кристаллизации белка из раствора сульфата аммония происходит значительное фракционирование в отношении содержания жирных кислот [72].

И, наконец, можно предположить, что гетерогенность альбуминов является следствием индивидуальных вариаций среди животных одного и того же вида. Поэтому альбумины, получаемые теперь в больших количествах из смешанной плазмы, должны быть более гетерогенными, чем описанные в более ранних исследованиях альбумины, которые часто получали от одного животного. Индивидуальные вариации белков и их соединений с другими веществами могут быть установлены иммунологически; на этом основывается объяснение существования различных типов крови. Такого рода вариации, вероятно, являются также причиной неудачных пересадок тканей от одного индивидуума к другому.

Несмотря на указанные выше признаки гетерогенности, свойства сывороточных альбуминов, изученные многими исследователями, можно объяснить и с точки зрения единого белкового компонента. Поэтому в последующих разделах сывороточный альбумин рассматривается как гомогенный белок (если не будет сделано специальных оговорок).

3) КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Обычно сывороточные альбумины очищают посредством кристаллизации, хотя исключительно чистый препарат был получен фракционированием с помощью этилового спирта [75]. В литературе описана техника высаливания для получения кристаллических сывороточных альбуминов лошади [65, 71, 76, 77] и человека [72, 78]; для кристаллизации бычьего сывороточного альбумина методы высаливания оказались неудовлетворительными*. Для кристаллизации применяли сульфаты аммония, магния и натрия, а также NaH_2PO_4. Из перечисленных солей наиболее эффективным является сульфат аммония вследствие его более значительной растворимости; растворимость сульфатов магния и натрия недостаточно велика для осаждения альбумина на холоду. Преимущество NaH_2PO_4 заключается в том, что он обладает буферным действием.

Для получения кристаллических альбуминов человека и быка применяли кристаллизацию при низких значениях ионной силы растворов с помощью органических осадителей [68, 72]. При этом лучшим реагентом оказался этиловый спирт, хотя, по-видимому,

* Юз наблюдал кристаллизацию в растворах бычьего сывороточного альбумина, сконцентрированных посредством вакуумной перегонки жидкости после осаждения глобулинов по Кону (метод 6, осадки I—IV-4). В этом случае альбумин высаливается по мере повышения концентрации ацетатного буфера, прибавляемого при фракционировании.

можно применять и метиловый спирт, а иногда и ацетон [79]. Очищенные в достаточной степени (обычно путем предварительной кристаллизации), сывороточные альбумины быка или человека (или по крайней мере часть их) могут кристаллизоваться из водных растворов [68]. Сывороточный альбумин лошади в виде сульфата также можно получить из водного раствора при pH 4 [71].

В общем сывороточные альбумины легче всего кристаллизуются из концентрированных растворов, содержащих не менее 10% белка, в слабощелочной области, pH которой на 0,2—0,5 единицы больше изоэлектрической точки белка. Кристаллизация из спиртово-водных смесей облегчается различными низкомолекулярными веществами, прочно связывающимися альбумином. К таким веществам относятся высшие спирты: от пентанола до деканола, толуол, хлороформ и олеат натрия. Соли жирных кислот, по-видимому, также играют определенную роль при кристаллизации сывороточного альбумина человека из растворов сульфата аммония по методу Кенделла [72]. В дальнейшем Левен показал, что различные ионы и небольшие молекулы могут связываться сывороточным альбумином, не оказывая отрицательного влияния на способность альбуминов кристаллизоваться [79]. Механизм действия этих веществ неизвестен. Однако для его понимания важен тот факт, что олеат натрия и деканол заметно уменьшают диэлектрический инкремент сывороточных альбуминов [80]. Это указывает на изменение распределения электрических зарядов, которое должно быть одной из ориентирующих сил в процессе кристаллизации.

Сывороточные альбумины человека и быка, будучи связаны с атомами ртути, кристаллизуются в виде димерных единиц*. Для получения оптимальных выходов необходимо добавлять количество соли ртути, по возможности эквивалентное количеству сульфгидрильных групп в белке. Образование кристаллов из водных растворов этилового спирта происходит в условиях, сравнимых с условиями кристаллизации мономера с той разницей, что растворимость димера значительно меньше, вследствие чего его можно легко перекристаллизовать из воды. Таким путем можно легко отделить меркаптальбумин от белка, не содержащего тиогрупп. Для получения чистого димера обычно достаточно провести две-три перекристаллизации; о чистоте препарата можно судить на основании ультрацентрифугального анализа или результатов определения содержания ртути (см. рис. 21).

4) ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Физико-химические свойства сывороточного альбумина, о которых часто шла речь в различных главах тома II, здесь будут только

* Детальное описание техники кристаллизации принадлежит Юзу и Динтцису (готовится к печати).

кратко суммированы. Эти свойства можно объяснить, если исходить из того предположения, что молекула сывороточного альбумина представляет собой вытянутый эллипсоид вращения, длина которого равна 150 Å, диаметр 38 Å, отношение осей 4 : 1, а молекулярный вес (в безводном состоянии) 65 000. Эти размеры находятся в прекрасном соответствии с различными физико-химическими данными (размеры элементарной ячейки кристалла, константы седиментации и диффузии, вязкость, длина молекулы, выводимая из результатов измерения двойного лучепреломления в потоке). Однако предположение о том, что молекула сывороточного альбумина представляет собой эллипсоид вращения, может быть лишь грубым приближением к истинной форме. Даже незначительные отклонения от предполагаемой формы (например, предположение, что молекула имеет цилиндрическую форму или что она пронизана отверстиями) приводят к совершенно другим размерам, как это установлено Шульманом и Ферри для фибриногена [288]. Даже величина молекулярного веса, который может быть измерен непосредственно, вызывает некоторые сомнения. Заметим, что численное значение молекулярного веса, равное 65 000, значительно меньше ранее принятого значения 69 000 [68]. Новая величина основана главным образом на современных рентгено-кристаллографических данных, полученных Лоу [81], по вычислениям которой молекулярные веса двух типов кристаллов сывороточного альбумина человека оказались равными 65 200 и 65 600. Эти значения подтвердили Крит [82] и Кёниг и Перринг [83], которые нашли по данным ультрацентрифугирования величины молекулярного веса, равные 65 400 и 64 500 соответственно.

Что касается более ранних данных, приводивших к среднему значению, равному 69 000, то следует отметить, что методы определения среднего молекулярного веса, такие, как осмометрия и метод светорассеяния, при наличии в исследуемом объекте более тяжелых компонентов (рассмотренных выше) будут давать завышенные величины по сравнению с истинным молекулярным весом. Прежние значения седиментационных констант вследствие технических трудностей, связанных главным образом с точным измерением температуры, также отличаются от истинных величин [84]. Недавно Во и Ифантис обнаружили влияние изменений температуры в роторе центрифуги на ускорение, обусловленное расширением металла [85].

Различные физико-химические данные, полученные ранее, указывали на то, что молекулярный вес сывороточного альбумина значительно меньше 65 000 [86, 87]. Однако в дальнейшем исследователи всегда обнаруживали ошибки или в технике проведения опыта, или в интерпретации полученных данных. В настоящее время физико-химические методы, подтверждаемые данными анализа, показывающими, что альбумин человека содержит только

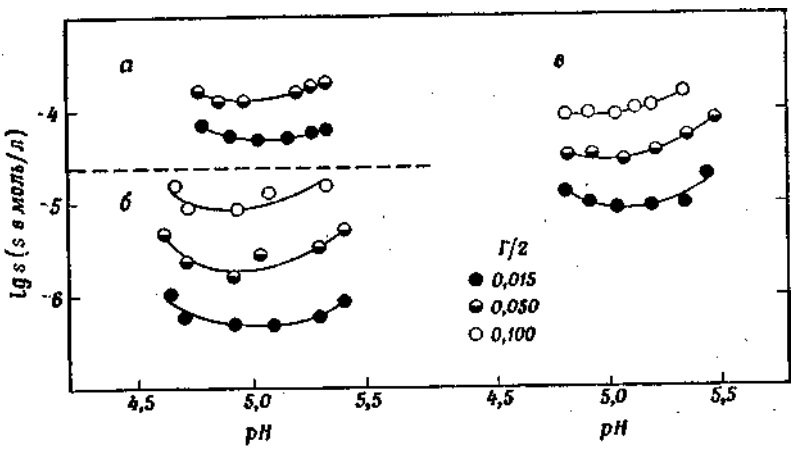
одну тиоловую и одну триптофановую группы в частице с молекулярным весом 65 000, а альбумин быка—одну тиоловую группу и одну полипептидную цепь (одну свободную α-амино- и одну свободную α-карбоксигруппы) [88, 89], по-видимому, дают вполне убедительные данные. Таким образом, лучше использовать молекулярный вес альбумина для проверки правильности физико-химических методов, чем наоборот.

Изоэлектрический сывороточный альбумин содержит приблизительно сто пар положительных и отрицательных зарядов. Несмотря на то, что под словом «пара» подразумевается весьма специфическое распределение заряда, выбор этого термина продиктован кажущимся высокосимметрическим распределением зарядов, дающим в итоге асимметрический заряд, который можно представить дипольным вектором, расстояние между положительными и отрицательными зарядами которого равно 150 Å (700 единиц Дебая), имеющим наклон 30° по отношению к длинной оси молекулы. Непостоянство величины этого диэлектрического инкремента у различных препаратов альбумина в настоящее время объясняют различным содержанием жирных кислот в альбумине. Удаление жирной кислоты (пропусканием через колонки с анионообменной смолой при периодической обработке анионита ацетатом) увеличивает диэлектрический инкремент, а последующее прибавление олеата натрия уменьшает его до исходного значения. Наиболее заметный эффект наблюдается при добавлении первого моля жирной кислоты на моль белка. Весьма неожиданным является то обстоятельство, что деканол производит аналогичное действие [80].

Растворимость сывороточного альбумина практически во всех растворителях выше растворимости большинства других компонентов плазмы, поэтому методы его выделения обычно основаны на осаждении других компонентов, тогда как альбумин остается в растворе. Альбумин принято рассматривать как водорастворимый белок; это свойство было положено в основу прежних определений альбуминовой фракции. Однако можно получить кристаллизацией из дистиллированной воды фракции сывороточного альбумина, которые в последующем обнаруживают относительную нерастворимость в этом растворителе [68, 71]. Это особенно справедливо по отношению к димеру альбумина, содержащему ртуть.

Растворимость альбумина удобно исследовать в водно-спиртовых системах, в которых можно независимо друг от друга варьировать концентрацию спирта, ионную силу, pH, температуру и специфическое действие ионов. Поскольку при изменении количества насыщающего вещества не достигается постоянство растворимости, то последнюю можно выражать только в относительных величинах как функцию изменения параметров. Таким путем при изучении влияния различных переменных на растворимость любого данного препарата альбумина можно получать воспроизво-

димые результаты. На рис. 19 показано влияние на растворимость ионной силы и концентрации этилового спирта в ограниченных пределах значений pH [90]. В изоэлектрической точке альбумин обнаруживает заметный минимум растворимости; с увеличением заряда частиц белка его растворимость резко возрастает. Растворимость альбумина в водно-спиртовых системах возрастает с повышением температуры, в присутствии полиэлектролитов [91] она почти не зависит от температуры, а при наличии ионов цинка уменьшается с ростом температуры (Вебер, личное сообщение).



Р и с. 19. Растворимость кристаллического сывороточного альбумина человека в водно-спиртовых смесях при —5° [90].
а—мольная доля этилового спирта 0,0624 ($18_{25°}$%); *б*—мольная доля этилового спирта 0,1630 ($25_{25°}$%); *в*—мольная доля этилового спирта 0,0907 ($40_{25°}$%).

Альбумин способен взаимодействовать с другими белками, поэтому его растворимость в естественных системах может резко отличаться от растворимости в изолированном состоянии. Так, он часто осаждается с глобулиновыми фракциями при таких условиях, при которых он должен быть растворим. В белковых фракциях, полученных из печеночных клеток, связь альбумина с другими белками настолько прочна, что его присутствие может быть обнаружено только иммунохимическими методами [92]. Положение облегчается тем, что альбумин в плазме находится в значительно бóльших количествах, чем какой-либо иной компонент, так что его взаимодействие с другими белками заметно не отражается на его выходе.

5) УСТОЙЧИВОСТЬ

Вопрос о растворимости белка, естественно, приводит к рассмотрению его устойчивости, так как влияние на растворимость бел-

ка времени, пределов изменений pH, температуры и состава растворителя, в которых белок остается устойчивым, должно быть известно. Сывороточный альбумин является одним из наиболее устойчивых белков плазмы. На холоду он устойчив в интервале pH от 10 до 4. Он может сохранять устойчивость даже при меньших значениях pH, однако при этом с помощью ультрацентрифуги можно обнаружить прогрессивное возрастание степени агрегации (Саров, личное сообщение). Возможно, что это связано с образованием фибрилл, описанных Во [93].

При повышенных температурах сывороточный альбумин в концентрированных водных растворах обнаруживает максимум устойчивости в пределах значений pH от 6,5 до 7,0 [43]. При добавлении многих анионов сывороточный альбумин становится более устойчивым [43, 46, 94]. Установлено, что в этом отношении каприлат натрия (0,04 *М*) оказывается особенно эффективным; в его присутствии можно нагревать альбумин («пастеризация») в течение нескольких часов при 60° [94]. При таких условиях устойчивость альбумина значительно больше устойчивости других компонентов плазмы, что дает возможность очищать альбумины посредством селективной денатурации некоторых глобулинов [68]. При этом скорость денатурации при повышении температуры на каждые 2° возрастает приблизительно вдвое [94], что является общим с кинетикой тепловой денатурации других белков.

В концентрированных растворах мочевины сывороточный альбумин претерпевает быстрые изменения, связанные с денатурацией белка и проявляющиеся в увеличении оптического вращения и вязкости [95—97] (см. также т. II, гл. VI). За этим следует дальнейшее увеличение вязкости, приводящее к образованию геля. Первичные быстрые изменения, по-видимому, вполне обратимы. Вторичные изменения в настоящее время рассматривают как реакцию обмена, в которой принимают участие дисульфидные группы. В результате этой реакции образуются межмолекулярные дисульфидные мостики и как следствие этого—трехмерная сетка. Опыты показали, что сульфгидрильные группы играют существенную роль во вторичных изменениях [98]. Механизм процесса можно выразить следующим уравнением:

$$R-SH+\begin{matrix}S\\|\\S\end{matrix}\!\!>R_1 \longrightarrow R-S-S-R_1-SH,$$

где R и R_1—две молекулы белка. Вновь образованная сульфгидрильная группа может снова вступать в реакцию, давая начало цепному процессу. Сывороточный альбумин, растворенный в ледяной уксусной кислоте, также превращается в гель по истечении нескольких дней, что указывает на возможность рассмотренного выше механизма.

Вероятно, больший интерес представляет степень обратимости изменений белка в течение первой (быстрой) стадии взаимодействия его с мочевиной. Регенерированный после такой обработки альбумин обладает приблизительно теми же самыми свойствами (растворимость, электрофоретическая подвижность, вязкость, способность присоединять анионы, иммунологические свойства), что и исходный белок [97, 99]. Очевидно, структура сывороточного альбумина в основном определяется главной пептидной цепью и дисульфидными мостиками. Изменения конфигурации белковой молекулы могут быть в значительной степени обратимыми, если предположить, что дисульфидные связи не подвергаются изменению. Ниже будут приведены дополнительные примеры, доказывающие это положение.

6) СОСТАВ

Сывороточный альбумин, по-видимому, состоит исключительно из аминокислотных остатков. По определению этот белок (см. стр. 314) не содержит углеводов [68] (отрицательная проба на образование фурфуральдегида). Не установлено также наличия в этом белке какой-либо простетической группы. Спектр поглощения может быть интерпретирован исходя из содержания в альбумине ароматических аминокислот [100]*. Элементарный состав альбумина установлен Брэндом [101]. Полный аминокислотный состав определял ряд исследователей [101—104]; результаты суммированы в табл. 30. Найденные аминокислоты составляют 98% взятого для анализа белка, что является дополнительным доказательством наличия в этом белке только аминокислотных остатков.

Особенно ненадежные результаты получаются при определении триптофана, так как все гидролитические исследования, очевидно, вызывают значительный распад этой аминокислоты [105]. Однако цветные реакции на нативный белок подтверждают тот факт, что бычий сывороточный альбумин содержит больше триптофана, чем сывороточный альбумин человека. Исследователи, производившие регулярное определение триптофана в процессе фракционирования сывороточного альбумина лошади, показали, что на одну молекулу альбумина приходится одна или две группы триптофана. Однако в их исследованиях имеются противоречивые данные относительно изменения содержания триптофана в белке в процессе его фракцио-

---

* Максимум поглощения при 405 *мμ* часто объясняется примесями гемина.

В области 340—400 *мμ* наблюдается очень небольшое поглощение, которое нет оснований связывать с содержанием в белке ароматических аминокислот или с тиндалевым светорассеянием.

Таблица 30

СОСТАВ СЫВОРОТОЧНЫХ АЛЬБУМИНОВ[а] (Число остатков на 65 000 г)

Компонент	Бык	Человек	Сравнительные данные	
			бык	лошадь
Аланин	46	—		
Глицин	17	14	(16)	
Валин	33	43	(36)	
Лейцин	61	54	(68)	(50)
Изолейцин	13	8	(14)	
Пролин	27	29	(32)	
Фенилаланин	26	31	(24)	
Тирозин	18	17	(20)	(17)
Триптофан	2	1		(1—2)
Серин	26	20		
Треонин	32	25		
Цистеин	1	1		
Цистин/2	34	34	34	34
Метионин	4	6	4	0
Аргинин	22	23	(23)	(21)
Гистидин	17	15	(16)	(18)
Лизин	55	55	55	
Аспарагиновая кислота	50	48	50	
Глутаминовая кислота	75	75	75	
Амидный азот	(36)	(41)		
Общая сера	40	41	40	37

Примечание. Содержание азота в бычьем сывороточном альбумине: измеренное 16,07, вычисленное из вышеприведенных данных 16,2[б].

[а] Большинство данных взято из т. I, гл. III, но пересчитано на молекулярный вес 65 000. Данные для цистеина были исправлены в соответствии с исследованиями Юза (см. текст). Данные Штейна и Мура, а также Брэнда для глицина, лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот заменены, вероятно, более точными данными Шемина [104], полученными методом изотопного разведения. Цифры 3-й и 4-й колонок даны для непосредственного сопоставления с соответствующими цифрами 2-й колонки, которые были получены для данной аминокислоты в одной и той же лаборатории [102—104].

[б] Вычисление производили по формуле: $\frac{\text{Число атомов азота} \times 14}{65\,000 \times 100}$.

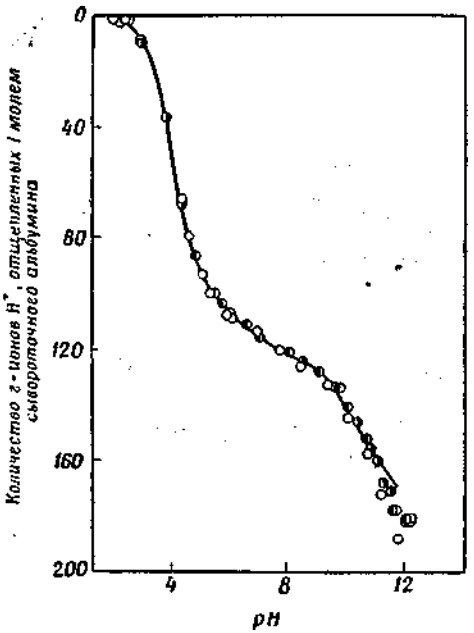
нирования*. Разработка надежного количественного метода определения триптофана, несомненно, является весьма необходимой;

* Так, например, Хевитт [77] нашел, что содержание триптофана в альбумине лошади снижается до 0,3% при изолировании фракции, не содержащей углеводов. Мак-Микин [71] установил, что фракция, освобожденная от углеводов, содержит 0,5% триптофана, и это содержание не изменяется при дальнейшем фракционировании.

этот метод можно использовать для установления дополнительного критерия гомогенности белка.

Распределение серы в сывороточном альбумине также должно быть предметом дальнейшего изучения. Брэнд нашел, что в бычьем сывороточном альбумине содержится 42 *г-атома* серы на 69 000 *г* белка (или соответственно 40 *г-атомов* S на 65 000 *г*) и четное число остатков цистеина и метионина [101] (см. табл. 30). Однако в молекуле сывороточного альбумина содержится только одна группа цистеина [106], откуда следует, что если общее содержание серы определено правильно, то в молекуле белка должно быть нечетное число групп метионина или должна существовать дополнительная сульфо-связь неизвестного типа.

Поскольку в молекуле сывороточного альбумина человека, лошади, свиньи и быка содержится только одна концевая α-аминогруппа (аспартиловая) [88], то молекула сывороточного альбумина может состоять из одной полипептидной цепочки.



Р и с. 20. Кривая титрования сывороточного альбумина человека (по Тэнфорду [107]).

◐ данные Бланшара; ◑ данные Юза, препарат деканола-10; ○ данные Юза, меркаптальбумин; — кривая, построенная по вычисленным данным.

7) РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ

Реакции сывороточного альбумина, как и вообще белков, настолько многочисленны, что их рассмотрение здесь будет ограничено реакциями, имеющими особое значение для выяснения его структуры, а также в большей или меньшей степени свойственными только сывороточному альбумину. Более детальное обсуждение вопроса дано в т. I, гл. IV.

Прежде всего будут рассмотрены равновесия с водородными ионами, так как в них вовлекаются практически все реакционноспособные группы сывороточного альбумина, вследствие чего эти равновесия следует рассматривать как наиболее важные реакции среди многих других взаимодействий, обсуждаемых ниже (подробности см. т. II, гл. IV, раздел 2 и гл. V, раздел 6,А). Недавно Тэнфорд

[107] вновь получил кривую титрования (рис. 20), которая, по существу, находится в соответствии с прежними определениями.

Точки на рис. 20—экспериментальные, сплошная кривая—теоретическая, вычисленная на основании данных по аминокислотному составу и значений истинных pK', соответствующих каждому типу остатков (см. т. II, гл. 5, табл. 7). Влияние заряда белка на равновесие (исключая равновесие в кислотной области) учитывалось по Скэтчарду [108]. Величину истинного pK' тирозильной группы определяли спектрофотометрическим титрованием. Затем находили величины истинных pK карбоксильной, имидазольной и аминогрупп из экспериментальных данных (см. рис. 20) по соответствующей кривой, определяя влияние температуры на равновесие. Теплоты ионизации карбоксильной, имидазольной и аминогрупп достаточно различаются между собой (см. т. II, гл. IV, табл. 6 и гл V, табл. 7), чтобы можно было оценить влияние каждой из этих групп на любую часть кривой титрования.

Следует заметить, что значения истинных констант находятся в довольно хорошем соответствии с значениями констант, полученных для модельных соединений (т. II, гл. IV). Однако различия между ними могут иметь некоторое значение. Так, например, карбоксильные группы, по-видимому, должны иметь определенно более кислотный характер, и это уменьшение сродства к протону является общим уменьшением сродства к катионам, что отражается на прочности связывания цинка и кальция (Гард и Юз, неопубликованные данные); сродство к протону, рассчитанное на карбоксильную группу, в случае изоэлектрического альбумина значительно слабее, чем в случае простых соединений, содержащих карбоксильные группы, Было бы интересно обсудить, не является ли это слабое сродство к катионам следствием сильного сродства этого белка к анионам (см. ниже).

Другая интересная особенность кривой титрования состоит в очень крутом спаде ее в кислотной области, соответствующем титрованию карбоксильных групп; при этом спад кривой таков, как если бы не проявлялось влияние зарядов. Частично этот эффект можно объяснить связыванием анионов [107], однако, чтобы его полностью отнести за счет связывания анионов, надо было бы допустить, что при pH 2 одна молекула белка связывает 89 ионов хлора—количество, неправдоподобно большое. Поэтому кажется более правильным объяснить этот участок кривой некоторыми структурными изменениями молекулы—ее раскручиванием, приводящим к уменьшению электрического потенциала. Уменьшение константы седиментации, наблюдаемое в кислых растворах [109], можно было бы также объяснить увеличением асимметрии молекул. Такое развертывание белковой молекулы должно быть полностью обратимым, так как при нейтрализации растворов альбумина, pH кото-

рых был доведен до значений ниже 2, на кривой титрования не обнаруживается гистерезиса [107].

Рассмотрение реакционной способности, характерной для сывороточного альбумина, логично начинать с тиольных групп по следующим соображениям: 1) они являются наиболее реакционноспособными группами (с точки зрения органической химии); 2) их природа

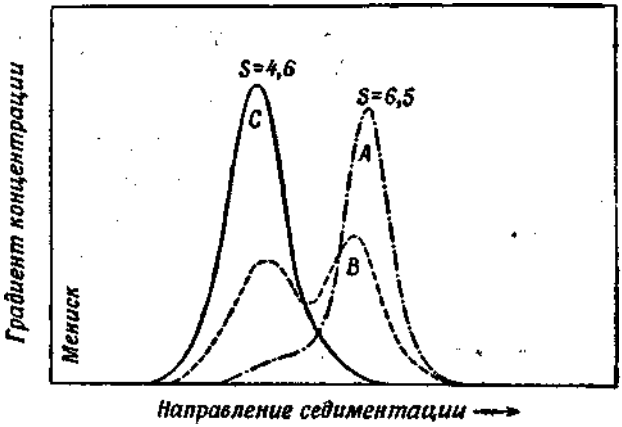
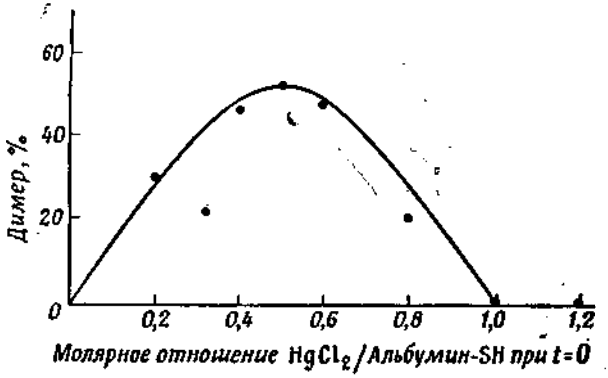


Рис. 21. Кривые седиментации содержащего ртуть кристаллического сывороточного альбумина при pH 7.
A—кривая, характерная для димера альбумина (s=6,5), получена для свежего раствора кристаллического белка; *B*—кривая, полученная с тем же раствором, но стоявшим в течение недели; часть димера диссоциировала. Добавление избытка хлорида ртути вызывает немедленную диссоциацию; получается кривая *C* (s=4,6), типичная для сывороточного альбумина [106].

и локализация способствуют протеканию реакции димеризации между молекулами меркаптальбумина, которая может быть прослежена с помощью обычных физико-химических методов (рис. 21—23); 3) наличие в молекуле белка единственной тиольной группы исключает статистическое рассмотрение вопроса, осложняющее изучение других группировок.

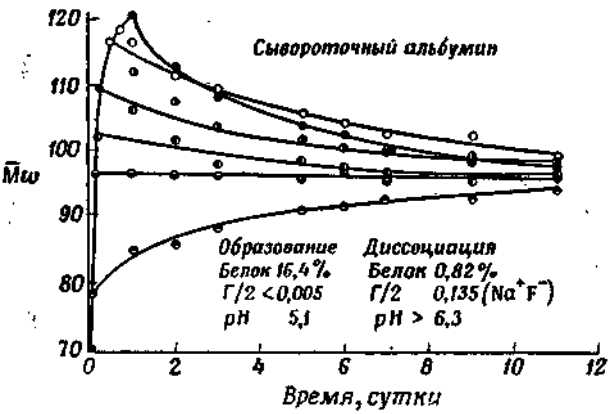
Взаимодействие сульфгидрильных групп с ионами двухвалентной ртути, ведущее к образованию кристаллизующихся димеров, как это рассмотрено выше, дает возможность отделить меркаптальбумин от альбумина, не содержащего сульфгидрильных групп. Однако, за исключением содержания сульфгидрильных групп (обычно имеющихся у $^2/_3$ молекул альбумина), каких-либо других различий между этими двумя фракциями не наблюдалось. Это позволяет предположить, что примерно $^1/_3$ молекул альбумина потеряла свои сульфгидрильные группы в результате реакции окисления или образования дисульфидных связей. Это предположение подкрепляется тем фактом, что сульфгидрильные группы могут освобождаться из



Р и с. 22. Равновесная концентрация димера меркаптальбумина как функция величины отношения $HgCl_2$/ Альбумин-SH при $t=0$.

Экспериментальные данные получены методом светорассеяния [111].

Общий альбумин 1%; ацетатный буфер (pH 4,25, Г/2 0,05), температура 23°; ● экспериментальные данные; —— вычисленные данные для константы равновесия $K'=3\cdot10^4$.

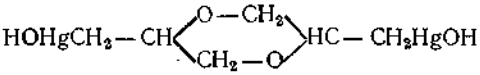


Р и с. 23. Образование и диссоциация ртутных димеров сывороточного альбумина по измерениям светорассеяния при комнатной температуре.

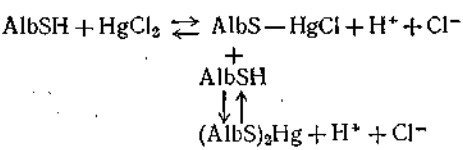
Сывороточный альбумин и стехиометрическое количество $HgCl_2$ смешаны в начальный момент при условиях, указанных в столбце «Образование»; через определенные интервалы времени пробы разбавляли, как это указано в столбце «Диссоциация». Производимые тотчас после разбавления измерения мутности давали восходящую часть кривой ассоциации, а затем измерения разбавленных проб давали сходящиеся кривые, указывающие на ассоциацию или диссоциацию по отношению к состоянию равновесия (по Эдельхоху).

этой фракции тиогликолятом при таких условиях, при которых меркаптальбуминовая фракция не образует дополнительного количества сульфгидрильных групп (Хантер, личное сообщение).

Не известно, чтобы ионы других металлов производили димеризацию альбумина подобно ионам ртути, однако такого рода реакция протекает с «двухвалентным» меркуриалом



с значительно большей скоростью, чем с ионами ртути [110]. Диссоциацию обоих димеров могут вызывать реагенты, отнимающие ртуть у альбумина (особенно эффективны сульфгидрильные группы, CN^- и J^-), а также вещества, отнимающие альбумин у ртути (Ag^+, Hg^{2+}). Эффект диссоциации, вызываемый избытком солей двухвалентной ртути (см. рис. 22), объясняется следующей схемой, если допустить, что первая реакция протекает значительно более полно, чем вторая:



Специфичность этой реакции можно понять, если вспомнить, что сродство ртути по отношению к иону —SH приблизительно в 10^{10} раз больше, чем по отношению к какой-либо другой группе, содержащейся в альбумине*. Таким образом, димеризации благоприятствует наличие некоторого, очень слабого внутримолекулярного мостика даже при условии преодоления значительных пространственных затруднений. На пространственные затруднения, имеющие место при димеризации, указывает малая скорость этого процесса (см. рис. 23) [111] по сравнению с чрезвычайно большой скоростью образования нормального меркаптида. В соответствии с этим реакция димеризации с «двухвалентным» меркуриалом протекает в несколько тысяч раз быстрее, чем с хлоридом ртути (II); расстояние, на которое при этом должны сблизиться поверхности двух молекул меркаптальбумина, в последнем случае приблизительно на 10 Å меньше.

Скорость реакции димеризации (измеренная методом светорассеяния) имеет высокий температурный коэффициент, что указывает на необходимость некоторой молекулярной перегруппировки до начала реакции. Это опять-таки служит подтверждением „гибкости" молекулярной структуры. Однако сульфгидрильные группы проявляют нормальную реакционную способность по отношению

* Сродство Hg^{2+} к RS^-, по-видимому, то же, что и к CN^- ($K_1 = 10^{18}$) [112].

к метилртутьиодиду; константа равновесия при этом имеет ту же величину, что и в случае цистеина [106]. Это свидетельствует о том, что сульфгидрильные группы в молекуле альбумина не связаны внутренними связями.

В течение долгого времени не удавалось найти избирательные реагенты для определения имидазольных групп сывороточного альбумина. Однако с помощью равновесного диализа было показано, что ионы цинка избирательно соединяются с имидазольными группами при pH 5—7. Связывание ионов цинка в этом интервале значений pH можно объяснить, допуская, что в молекуле сывороточного альбумина имеется 15 идентичных участков, эквивалентных числу имидазольных групп, и принимая численное значение истинной константы ассоциации равным $10^{2,82}$ (по сравнению со значением $10^{2,76}$, принимаемым для первой константы ассоциации цинк—имидазол) [113]. Таким образом, эти данные указывают, что имидазольные группы свободны для осуществления реакции, но расположены в молекуле альбумина так, что их пары не могут взаимодействовать с ионами цинка. Замечательное соответствие констант ассоциации цинка со свободными имидазольными группами и их остатками в альбумине может быть случайным, так как константу в случае альбумина вычисляли при допущении, что вторая валентность цинка оставалась свободной. Если бы в соединении с белком участвовала и вторая валентность цинка, то значение константы, вычисленное для цинк-имидазольной связи, было бы слишком большим. Отсюда следует, что взаимодействие между цинком и имидазольной группой, подобно взаимодействию протона с имидазольной группой, в альбумине должно быть слабее, чем в имидазольных веществах. Ионы двухвалентной меди и, возможно, некоторых других металлов также избирательно реагируют с имидазольными группами [114, 115]*. Однако другие специфические реакции на имидазольные группы не известны. При иодировании имидазольные группы и тирозильные остатки одновременно реагируют с иодом (см. далее).

Самый большой класс катионных групп в молекуле сывороточного альбумина представляют 55 ε-аминогрупп лизина. При взаимодействии с О-метилизомочевиной они могут полностью превращаться в гомоаргининальные группы [117], а при взаимодействии с уксусным ангидридом —в ацетаминогруппы [118]. Гуанидированные производные кристаллизуются, и, по-видимому, они совершенно аналогичны с исходным веществом в отношении иммунологических свойств (Дженуэй, личное сообщение) и способности связывать анионы [119]. Однако гуанидированное производное значительно менее растворимо, чем сывороточный альбумин; так, при pH 5 и низких значениях ионной силы (ниже 0,01 Г/2) оно не растворяется. Изучение

* Клотц с сотрудниками установил, что сульфгидрильные группы способны взаимодействовать с ионами меди [116].

кинетики взаимодействия с О-метилизомочевиной [117] показывает, что не все группы лизина идентичны в отношении реакционной способности; однако подобные изменения реакционной способности не выявляются на кривой титрования (см. рис. 20), которую можно построить при допущении, что pK имеет одно значение для остатков лизина. Эти различия могут исчезать вследствие структурных изменений, происходящих под влиянием высокого заряда белковой молекулы, возникающего при титровании ее аминогрупп.

Как указывалось выше, тирозильные остатки определяют спектрофотометрическим титрованием. При обращении этого титрования не наблюдается гистерезиса, как это имеет место в случае яичного альбумина [120]. К тому же значение истинной константы ионизации совпадает со значениями констант соответственно замещенных фенолов, что может служить доказательством отсутствия водородной связи. Однако максимум поглощения сывороточного альбумина при 279 $m\mu$ заметно отличается от максимума поглощения тирозина и его пептидов (275 $m\mu$). При обработке же сывороточного альбумина разбавленной уксусной кислотой его максимум поглощения смещается к максимуму поглощения тирозина [100]. Отсюда следует, что тирозильные остатки могут каким-то образом обратимо связываться водородными связями (более подробно см. т. II, гл. III).

Остатки тирозина специфически реагируют с иодом в растворе иодида калия (J_3^-) в простых стехиометрических соотношениях; некоторые другие группы, вероятно остатки гистидина, реагируют аналогичным образом, но более медленно [121]. Вначале может образоваться некоторое количество моноиодтирозильных остатков, однако главным продуктом реакции являются дииодтирозильные остатки [121, 122], имеющие ожидаемое значение pK [107]. Частично иодированные препараты кристаллизуются изоморфно с исходным белком [121]. Некоторые исследователи получили иодированный сывороточный альбумин лошади в кристаллическом состоянии [123—125].

Иодированный сывороточный альбумин в настоящее время находит значительное применение как меченый белок в физиологических исследованиях [21, 22]. При этом обычно допускают, что иодированный альбумин ведет себя так же, как и нормальный альбумин, что в основном, по-видимому, верно. Однако иногда для разработки некоторых гипотетических физиологических механизмов принимают, что иодированный альбумин отличается по свойствам от нормального, хотя различия между этими белками обстоятельно не рассматривались. Некоторые из наиболее очевидных особенностей иодированного альбумина заключаются в следующем.

1. Иодпротеиновые связи неустойчивы; в этом отношении интересны опыты Питт-Риверса по превращению дииодтирозильных остатков в тироксин [126]*.

* Недавно было показано, что 3,5,3′-триодтиронин, получаемый из тироксина, является активным гормоном [127].

2. Иодированный белок неустойчив. Неустойчивость может увеличиваться в процессе иодирования при введении значительного количества иода или в результате небрежного хранения альбумина в течение некоторого времени перед инъекцией. Такой альбумин может исчезать быстрее в результате фагоцитоза или катаболизма или медленнее вследствие его меньшей способности диффундировать через оболочки капилляров.

3. Иодированный альбумин гетерогенен. Обычно иодирование производили в очень небольшой степени; при этом предполагалось, что полученный таким образом белок будет наиболее близок к нормальному альбумину и наименее гетерогенным в отношении содержания иода (т. е. каждая молекула или имела один атом иода, или не содержала его вовсе). Однако нет оснований полагать, что все остатки тирозина эквивалентны. Среди них определенно имеются изомеры. Некоторое количество иода может быть связано также с имидазольными группами. Более того, известно, что первые два эквивалента иода, которые реагируют с альбумином, не соединяются с ним, а окисляют сульфгидрильные группы [121].

Карбоксилированные группы, несмотря на их большое число в сывороточном альбумине, обладают малой реакционной способностью по отношению к металлам-комплексообразователям и к протонам. Как установлено выше, низкая реакционная способность может быть результатом наличия солевых связей, поскольку, как это следует из приведенной кривой титрования, это свойство усиливается с увеличением заряда белковых частиц.

Эффективное химическое видоизменение карбоксильных групп также ограниченно. Это частично связано с тем обстоятельством, что для образования простого эфира необходима карбоновая кислота в неионизированной форме. Таким образом, белок сначала должен быть превращен в кислую соль посредством особо энергичной обработки, в результате которой разрываются все солевые связи. Такого рода методику применяли Фрэнкель-Конрат и Олкотт, которые обрабатывали сывороточный альбумин хлористым водородом в сухом метиловом спирте. Они считают, что в этом случае происходит количественное и специфическое метилирование карбоксильных групп, однако физико-химические свойства продукта реакции указывают на заметные структурные изменения, происходящие при этом [128].

Более мягкий метод этерификации основан на взаимодействии карбоксильного иона с окисью этилена и алифатическими диазосоединениями. В нейтральной среде окись этилена легко реагирует с частью карбоксильных групп. Однако реакция не является специфической и не протекает количественно. Приблизительно эквивалентное количество реагента взаимодействует с другими группами, в том числе и с аминогруппами [129]. Уилкокс исследовал в качестве реактивов ряд диазосоединений с формулой $RCHN_2$ [130].

Он нашел, что при pH 5—6 и 0° наиболее подходящими реактивами являются $N_2CH—COOC_2H_5$ и $N_2CH—CONH_2$. Хотя оба этих вещества значительно менее реакционноспособны, чем диазометан, но они специфичны по отношению к карбоксильным группам. (Было показано, что диазометан реагирует практически со всеми группами, содержащими активный водород [131].) Альбумин, как обработанный окисью этилена, так и «диазоэтерифицированный», обнаруживает предполагаемое смещение изоэлектрической точки в щелочную область.

Реакционная способность остальных групп в сывороточном альбумине исследована мало, отчасти потому, что не известны подходящие для этой цели реакции, протекающие в мягких условиях. Алифатические гидроксилы сульфировались при обработке концентрированной серной кислотой при низких температурах [132]. Амиды гидролизовались сульфоновыми кислотами, хотя при этом происходил разрыв некоторого количества пептидных связей [133].

Установлено, что в нативном белке дисульфидные связи довольно устойчивы по отношению к восстановителям. Однако при pH 8—10 наблюдалось обратимое восстановление некоторого количества дисульфидных групп ионами тиогликоля (Хантер, личное сообщение). При этом восстанавливается в среднем не более двух дисульфидных групп, в то время как в молекуле денатурированного белка при той же концентрации тиогликолята происходит полное восстановление этих групп. Является ли это следствием измененной реакционной способности дисульфидных групп в нативном белке или результатом простого смещения равновесия в сторону образования дисульфида белка, еще не установлено.

Пока нет такого метода избирательного воздействия ферментов на пептидные связи, который давал бы возможность получать большие фрагменты белковой молекулы. Водородные связи пептидной цепи, по-видимому, обладают особой реакционной способностью по отношению к мочевине (т. е. к денатурирующему агенту); даже 4 *М* раствор мочевины оказывает заметное действие [96]. Однако, как уже упоминалось, большинство изменений обратимо.

Некоторые реакции сывороточного альбумина в настоящее время нельзя объяснить с точки зрения структуры белка. Наиболее изученными из них являются реакции связывания анионов, которые были обстоятельно рассмотрены Клотцем (т. II, гл. V) и здесь упоминаются лишь постольку, поскольку они имеют отношение к структуре белка. Возможно, что наиболее неожиданной особенностью является наблюдаемая величина констант взаимодействия, превосходящая на несколько порядков величину констант модельных веществ в водном растворе с любыми реакционноспособными группами. Так, например, Скэтчард с сотрудниками [134] нашел, что истинная константа связывания ионов SCN^- с альбумином равна 1000. Это позволяет предположить, что реакции протекают в среде,

эффективная диэлектрическая постоянная которой значительно отличается от диэлектрической постоянной воды [135].

Вторая особенность взаимодействия альбумина с ионами заключается в предпочтительном взаимодействии альбумина с анионами, которое, по-видимому, должно найти свое отражение в действительном отсутствии сродства к катионам, по крайней мере в отношении простых модельных веществ. Таким образом, любое предполагаемое объяснение взаимодействия альбумина с ионами должно учитывать оба упомянутых эффекта.

Третья особенность заключается в заметном изменении структуры, происходящем при связывании анионов, как это следует из большой величины энтропии (т. II, гл. V).

Юз считает, что, пока топография белковой молекулы не известна настолько, чтобы детально объяснить эти явления, последние можно объяснять в общих чертах с точки зрения конкурентного взаимодействия с заряженными группами, обладающими различной энергией гидратации в средах, диэлектрическая постоянная которых изменяется в широком интервале.

Особенно важно подчеркнуть значение конкурентных взаимодействий, так как в водных растворах все валентности атомов и радикалов можно предполагать насыщенными растворителем, если они не насыщены другими группами, и направление ряда реакций может определяться относительным сродством к молекулам растворителя групп, участвующих в реакции. Так, солевая связь*, например, аминогруппа плюс карбоксильная группа в молекуле альбумина, существующая в безводной среде**, может быть разорвана конкурирующим анионом (например, SCN^-), который менее гидратирован, чем ионизированная карбоксильная группа. Вследствие этого последняя лишается возможности перемещаться в более гидратированную область и энергия связывания тиоцианата становится равной разности энергий гидратации ионизированной карбоксильной группы и тиоцианатного иона.

Наоборот, катионы металлов будут связываться слабее, чем в модельных веществах, так как они, вероятно, более сильно гидратированы, чем катионные группы, содержащие азот, которые они

* Линдерстрём-Ланг и Якобсен [136] считают, что, изучая объемные изменения при титровании белка кислотой, они исключили возможность образования большого количества солевых связей. Изменение объема для реакции $RCOO^- + H_3O^+ \rightarrow RCOOH + H_2O$ составляли $+11$ *мл* на моль для ацетата и β-лактоглобулина. С другой стороны, твердый глицин, который они принимали в качестве возможной модели солевых связей белка, обнаруживает изменение объема, равное 4 *мл* на моль при растворении в водном растворе кислоты. Однако кажется сомнительным, чтобы твердый глицин мог адэкватно представлять солевые связи в растворе, в котором вокруг взаимодействующих групп может происходить значительная электрострикция растворителя.

** Как полагает Шеллмен [135], «безводными» средами будут также среды с низким значением диэлектрической постоянной

должны были бы замещать. Такая теория усложняет дальнейшее изучение проблемы связывания ионов, поскольку при этом вместо изолированных группировок необходимо рассматривать пары групп. Однако значение такого рода механизма становится ясным, если напомнить, что средняя плотность заряда белковой молекулы приблизительно равна плотности заряда молярного раствора соли, и, следовательно, распределение многих зарядов, находящихся на близком расстоянии друг от друга, будет не менее хаотичным, чем в солевом растворе.

8) ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Сывороточные альбумины, кроме того, что они являются резервом азота в организме и играют определенную роль в осмотической регуляции, выполняют также транспортную функцию благодаря их способности связывать ионы [137, 138]. Таким путем альбумины связывают многие анионы в крови, являясь «буферами» их активности и делая их одинаково доступными для всех участков организма, омываемых кровью. Они могут также принимать участие в удалении ядовитых веществ, например связывая конъюгаты глицина и перенося их в почки.

Подобным же образом при помощи тиоловых групп альбумина могут удаляться тяжелые металлы. Интересно, что соединения ртути переносятся в крови главным образом альбуминами* и отлагаются в почках до удаления из организма [139]. Это явление разгрузки крови, вероятно, связано с более высокой кислотностью внутренней среды почек.

Малая проницаемость стенок капилляров по отношению к альбумину может иметь важное значение в явлениях переноса. Например, экскреция ртутных соединений может происходить путем фильтрации соединений альбумина с ртутью через гломерулы с последующей реабсорбцией альбумина в канальцах, где при более низких значениях pH связь между альбумином и соединением ртути становится менее прочной.

Обсуждение вопроса о транспортной функции альбумина в межтканевой жидкости в настоящее время невозможно, так как неизвестны пределы, в которых колеблется содержание альбумина в межтканевой жидкости. Значение такого переноса находится в зависимости от относительных скоростей диффузии свободных и связанных с альбумином метаболитов через стенки капилляров. Принимая во внимание значительно бо́льшую способность к диффузии мелких частиц свободных метаболитов, можно сделать вывод, что

* Сывороточный альбумин содержит 80% сульфгидрильных групп плазмы. При фракционировании плазмы, содержащей в качестве консервирующего вещества тиолат ртути, наибольшее количество ртути находят в фракции V, являющейся альбуминовой фракцией.

перенос их альбумином будет иметь значение только в том случае, если с альбумином будет связано более 99% метаболитов.

3. БЕЛКИ КАК ПЕРЕНОСЧИКИ МЕТАБОЛИТОВ

Явление переноса в том виде, в каком оно предполагалось для альбумина, становится *sina qua non* для дыхательных белков, являющихся переносчиками кислорода (см. гл. VI). Ограниченная кислородная емкость этих пигментов вызывает необходимость в особом изменении их физического состояния, для того чтобы избежать высоких осмотических давлений. Так, гемоцианины в растворах сильно ассоциированы и имеют молекулярные веса порядка 10^6 и более. В случае гемоглобинов с молекулярными весами порядка 68 000 осмотические эффекты предотвращаются благодаря переносу пигмента внутри специализированных клеток эритроцитов.

Сродство этих пигментов к кислороду изменяется от вида к виду таким образом, чтобы обеспечить наибольшую «буферную» емкость напряжения кислорода в тех окружающих условиях, в которых обитают данные виды животных [4]. Форма кривой диссоциации кислорода и зависимость сродства пигмента к кислороду от pH являются дальнейшим подтверждением существования приспособлений для обеспечения максимальной эффективности дыхательной функции пигментов [140]. Гемоглобины и гемоцианины, очевидно, не обладают экстраваскулярными функциями; об этом свидетельствует то, что они полностью находятся в кровеносной системе. Вследствие значительно большей проницаемости стенок капилляра, имеющих липоидный характер, по отношению к кислороду, чем к более полярным молекулам, экстраваскулярная транспортная функция пигментов, по-видимому, является излишней.

А. Железосодержащий глобулин—трансферрин

Железосодержащий глобулин—трансферрин (сидерофелин) является одним из белков плазмы и, как это точно установлено, несет особую транспортную функцию. В химическом отношении он имеет много общего с железосодержащим белком—кональбумином, находящимся в белке яйца. Этот белок был подробно рассмотрен Уорнером (гл. XI). Установлено, что кональбумин из белка куриного яйца и трансферрин из куриной плазмы иммунологически идентичны [40]. Химизм взаимодействия кональбумина с ионами металлов также рассмотрен в гл. XI и, как это установлено, имеет много общих черт с взаимодействием трансферрина (см. также т. II, гл. III). Содержание трансферрина составляет 2,5 *г/л** (3,3% от всех белков плаз-

* Лорелл и Ингелмен [141] нашли, что емкость связывания железа сывороткой составляет 310 *мг*% (или 0,05$_5$ *ммоль/л*). Предполагая, что на молекулу белка приходится 2 атома железа и что молекулярный вес белка 90 000, можно рассчитать, что в 1 *л* плазмы содержится 2,5 *г* железа.

мы); при электрофорезе этот белок перемещается как β-глобулин и составляет $^1/_3$ белков с такой подвижностью. При фракционировании солями [142] он появляется в глобулиновой фракции, при фракционировании же этиловым спиртом по Кону (метод 6) этот белок находится в фракции IV-4. Однако растворимость заметно зависит от наличия или отсутствия железа (Fe^{3+}) в белке; форма белка, содержащая железо, обладает значительно большей растворимостью [143]. Железо легко отщепляется кислотой, связь его с белком неустойчива даже при pH 6 [143]. Таким образом, применяемая техника фракционирования при pH ниже 6 относительно не зависит от концентрации железа, так как образующийся в результате диссоциации менее растворимый не содержащий железа белок выпадает в осадок. Однако при pH, близких к 7, фракционирование усложняется нормальным парциальным насыщением этого компонента по отношению к железу (обычно $^1/_3$ насыщения) [141].

Кёхлин [143] получил соединяющийся с железом глобулин в кристаллическом состоянии из водно-спиртовых растворов, после того как глобулин был сконцентрирован в фракции IV-7 [144]. Процесс кристаллизации плохо воспроизводим вследствие того, что он задерживается небольшими количествами примесей. Несмотря на это, Кёхлину удалось получить некоторое количество гомогенного препарата путем электрофореза в барбитуратном буфере при pH 8,6. Молекулярный вес, вычисленный из данных определения емкости связывания железа* и константы седиментации, оказался равным 90 000. Этот препарат все еще содержал 1,8% углевода**, но в нем нельзя было обнаружить сульфгидрильных групп. Трансферрин хорошо растворим в воде даже в изоэлектрическом состоянии (pH 5,8) [143]***. По сравнению с другими исследованными белками этот белок имеет наибольший диэлектрический инкремент (Онклей и Холлис, личное сообщение). Попытки получить комплекс, содержащий железо в кристаллическом состоянии, оказались безуспешными вследствие значительно меньшей растворимости белка, не содержащего железа, при pH 5,8. При более высоких значениях pH, при которых комплекс, содержащий железо, устойчив, растворимость становится настолько большой, что осаждение спиртом невозможно****.

---

* Минимальное значение молекулярного веса 45 000.

** Бейн и Дейч [145] получили кональбумин, не содержащий углевода.

*** В литературе имеются указания, что экстраполированное значение изоэлектрической точки для железосодержащего белка равно 4,4 [141].

**** Уорнер и Вебер [146] недавно получили в кристаллическом состоянии обе формы кональбумина—содержащую железо и без него. Значение изоэлектрической точки этого белка (pH 6,8) ближе к нейтральной точке, и это дает возможность получить железосодержащие кристаллы.

Б. Компоненты плазмы, содержащие цинк и медь. Церулоплазмин

В плазме также содержатся цинк и медь в количествах, приблизительно равных количеству железа ($\sim 10^{-6}$ ч.). Известно, что эти элементы соединяются с трансферрином; поскольку последний обычно только на $^1/_3$ насыщен железом, предполагают, что перенос цинка и меди осуществляется также трансферрином. Однако вследствие действительно ничтожной потребности организма в этих элементах перенос таких больших количеств с кровотоком кажется неправдоподобным.

Цинк, подобно железу, прочно соединяется с белком в нейтральной среде, но легко отщепляется при pH 5. В нейтральной среде цинк, связанный с белком, легко отличить от ионов цинка, прибавленных *in vitro*, по его малой скорости обмена с катионообменными смолами. Они могут замещаться *in vitro* количествами ионов меди, несколько превышающими стехиометрические*. Таким образом, наличие в плазме специфического белка, содержащего цинк, кажется весьма вероятным.

Медь, содержащаяся в плазме, была идентифицирована как специфический синий компонент—церулоплазмин, из которого медь нельзя удалить обратимо [147]. Этот белок, по-видимому, тождествен с «плазменным гемокупреином», о котором сообщали Манн и Кейлин [148], Леки [149] и Мак-Микин с сотрудниками [150]. Однако он в корне отличается от гемокупреина эритроцитов тем, что может обратимо восстанавливаться гидросульфитом [147], синяя окраска вновь появляется при встряхивании на воздухе. Гемокупреин, как полагают, гидросульфитом разрушается [148].

Церулоплазмин, по-видимому, энергично взаимодействует с другими белками плазмы; его растворимость в значительной степени зависит от чистоты препарата. Так, в процессе очистки сначала церулоплазмин увлекается вместе с глобулинами, осаждаемыми сульфатом аммония при 40—50% насыщения, но после очистки он становится растворимым при этих условиях. Дальнейшая очистка этого компонента по Манну и Кейлину [148], Холмбергу и Лореллу [147, 151] производится посредством селективной денатурации других глобулинов, находящихся в осадке, спиртом и хлороформом с последующим экстрагированием синего пигмента раствором соли. Недавно Коминц (личное сообщение) изолировал и получил этот белок в кристаллическом состоянии из фракции IV-1 (метод 6 Кона).

Холмберг и Лорелл нашли, что содержание меди в церулоплазмине равно 0,34%, т. е. примерно то же, что и в гемокупреине, однако молекулярный вес (определенный с помощью ультрацентрифуги)

---

* Неопубликованные данные Юэ, полученные при изучении удаления цинка из плазмы ионообменными смолами.

оказался равным 151 000, т. е. в 4 раза больше молекулярного веса гемокупреина. Из этих данных было вычислено, что в молекуле церулоплазмина содержится 8 атомов меди. Изоэлектрическая точка церулоплазмина в солевом растворе приблизительно равна 4,4, хотя при этом значении pH белок неустойчив. Подвижность его та же, что и у α-глобулина.

Церулоплазмин обладает ферментативной активностью лакказы, хотя он менее активен, чем растительная лакказа. Он катализирует окисление *п*-фенилендиамина (а также окисление аскорбиновой кислоты и ароматических диаминов и дифенолов) кислородом, причем его максимальная каталитическая активность проявляется при pH 5—6 [152].

В. Липопротеиды

Липиды дают очень наглядный пример веществ, для переноса которых плазмой необходим белковый носитель; в течение долгого времени липиды плазмы были известны в соединении с белками (это, конечно, относится к прозрачной плазме; капли жира и хиломикроны в непрозрачной плазме находятся в состоянии физической суспензии). Изучение этих липопротеидов проводилось в двух направлениях: 1) выделение из плазмы самих липидов при помощи наиболее мягких методов и последующее изучение выделенных липидов и белков и 2) выделение и изучение специфических липидопротеиновых комплексов. При разработке первого метода полагали, что липиды являются просто примесями (подобно соли), которые затрудняют изучение белков, так как их удаление, если оно проведено соответствующим образом [153, 154], заметно «стабилизирует» белки для последующего их исследования. Однако по мере накопления данных было установлено, что липиды образуют специфические соединения с относительно небольшими группами плазменных белков, которые могут быть выделены фракционированием совершенно неповрежденными.

Значительную часть липидов в плазме человека можно сконцентрировать путем увеличения плотности среды, до тех пор пока липопротеиды не всплывут на поверхность жидкости. Таким путем получают Х-белок Мак-Ферлана [155] и Педерсена [211], который, как было установлено, не представляет собой артефакта, поскольку при изменении растворителя добавлением различных солей или глицина при достижении требуемой плотности наблюдается аналогичное разделение (Онклей, личное сообщение). Одна из фракций (III-0), получаемая по методу Кона, содержит более 50% этого компонента [156].

Получение α- и β-липопротеидных компонентов может быть достигнуто электрофоретическим разделением [157]; разделение можно также производить фракционированием спиртом при низких тем-

пературах [75]. Аналогичные соотношения между липидами и белками, наблюдавшиеся в различных исследованиях, показывают, что избирательное взаимодействие между липидами и некоторыми плазменными белками должно происходить и в физиологических условиях.

В более ранних аналитических исследованиях были получены данные как о различных типах липидов (табл. 31), так и о их распределении в отдельных фракциях плазмы. Следует отметить значительные колебания в количествах найденных липидов. Однако отношение этерифицированного холестерина к «свободному» (неэтерифицированному) холестерину в плазме человека и ее фракциях обладает замечательным постоянством.

Весьма неожиданные данные получены Машбёфом для липопротеида (кенапсовая кислота) из крови лошади, в котором не обнаружено свободного холестерина [158, 159]. Эти данные не возбуждают сомнений, несмотря на то, что в лошадиной сыворотке более 20% содержащегося в ней холестерина находится в свободной форме [160].

Само собой напрашивается несколько объяснений приведенным выше фактам. Во-первых, Машбёф установил, что сыворотка собаки не дает кенапсовой кислоты при обработке по его методу [159]; поэтому различия могут быть связаны с видовыми особенностями. Однако Машбёф показал также, что добавление не более 7% спирта достаточно, для того чтобы связь между липидом и белком стала неустойчивой, так как при этом заметно возрастает скорость экстрагирования липида эфиром [161]. Таким образом, в смешанной человеческой плазме может происходить перераспределение липидов до или в течение процесса обработки.

Наиболее вероятное объяснение этого явления стало возможным после того, как Машбёф обнаружил, что количество и состав липопротеида зависят от времени хранения лошадиной сыворотки. Даже 3-дневное хранение сыворотки при 4° до фракционирования вызывает глубокие изменения; при этом содержание холестерина в кенапсовой кислоте повышается, а фосфолипида—понижается [162]. Это находится в соответствии с наблюдениями Вандендрисша, установившего, что при инкубации лошадиной сыворотки при 37° в стерильных условиях содержание в ней свободного холестерина и фосфолипида уменьшается, в то время как содержание неорганического фосфора увеличивается (неустойчивый фосфорный эфир?) [163]. Таким образом, наблюдавшееся Машбёфом отсутствие свободного холестерина могло быть связано с продолжительным периодом времени с момента взятия крови до анализа сыворотки. Интересно выяснить, могут ли наблюдения Вандендрисша объяснить наличие свободного и этерифицированного холестеринов *in vivo* представлением о равновесии между двумя процессами: гидролизом эфира холестерина и его образованием из фосфолипида.

Таблица 31

СОСТАВ ОЧИЩЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ [349]

Липопротеид (с указанием исследователя, получившего соответствующие данные)	Состав липопротеида, %					Молярное отношение		
	холестерин			фосфолипид	пептид	холестерин: фосфолипид	свободный холестерин: общий холестерин	холестерин: азот
	общий	свободный	эфир					
Машбёф и Рибейрот [162]								
Кенапсовая кислота (лошадь)	10,4	0	17,9	22,7	59,3	0,91	0	0,040
Бликс, Тизелиус и Свенссон [157]								
β-глобулин	8,6	—	—	10,0	—	1,7	—	—
α-глобулин	4,4	—	—	7,2	—	1,2	—	—
альбумин	1,1	—	—	2,2	—	1,0	—	—
γ-глобулин	0,4	—	—	1,0	—	0,8	—	—
Липопротеид Адера [165]	16,4	—	—	8,5[а]	40	3,8[а]	—	0,093
Х-белок Педерсена [212]	—	—	—	23,4	—	—	—	—
Гард, Онклей и Мелин [164]								
β-липопротеид	30,9	8,3	39,1	29,3	23,0	2,1	0,27	0,28
Кон, Стронг и Бланшар[б]								
α_1-липопротеид	12,0	3,3	15	21	57	1,36	0,27	0,053
Пэдж, Льюис и Грин [170]								
α_2-липопротеид	—	—	—	—	—	2,6	—	0,24
Гофман с сотрудниками [175]								
S_f 4	30	8	40	25	25	2,4	0,25	0,27

[а] Адер Дж. и Адер М. нашли в полученном ими липопротеиде 0,67% органического фосфора, что соответствует 16,7% фосфолипида при условии, что весь фосфор входит в состав фосфолипида. Однако в экстрактах, содержавших липид, была найдена только приблизительно половина этого количества. Определениями установлено, что 20,4% липопротеида составляет жирная кислота. Последняя цифра слишком высока, чтобы ее можно было объяснить, исходя из содержания эфира холестерина и фосфолипида. По-видимому, фракция, полученная Адером Дж. и Адером М., содержала некоторое количество свободного триглицерида, если только их данные о содержании фосфолипида не являются заниженными, как об этом упоминалось выше.

[б] Приведенные здесь данные получены Розенбергом при анализе их фракции IV-1,1, выделенной из плазмы здорового человека.

1) КЕНАПСОВАЯ КИСЛОТА

Кенапсовую кислоту Машбёфа получают из лошадиной сыворотки, которую полунасыщают сульфатом аммония, отфильтровывают и затем доводят pH до 3,9. Небольшой осадок, выпадающий при pH 3,9, растворяется при pH 7 и повторно переосаждается при pH 3,9 до тех пор, пока состав его не будет постоянным [158, 162].

Полученный липопротеид растворим при pH выше 6,5; при электрофорезе в фосфатном буфере с pH 7,7 выявляется только один компонент, подвижность которого почти идентична с подвижностью сывороточного альбумина [162]. В ультрацентрифуге этот липопротеид седиментируется медленнее (s=2,5—4), чем альбумин, но это объясняется его малой плотностью, обусловленной высоким содержанием в нем липида; его молекулярный вес, по вычислениям Машбёфа, равен 85 000 [162]. Кенапсовая кислота содержит приблизительно 18% эфиров холестерина и 23% лецитина (кенапсовая кислота, полученная от плохо питаемых лошадей, содержит только 12% лецитина и 4% эфиров холестерина) [162]. Если принять в соответствии с определениями Машбёфа, что концентрация этого компонента в сыворотке составляет 2,5 *г/л* [162], то отсюда следует, что на долю кенапсовой кислоты приходится приблизительно $^1/_3$ из $77^0/_{00}$ холестерина, содержащегося в лошадиной сыворотке [160].

Так как растворимость, свойственная кенапсовой кислоте (нерастворима при pH 6,5), подобна растворимости «измененных» сывороточных альбуминов, то Машбёф [158] рассмотрел в некоторых деталях возможность того, что кенапсовая кислота является артефактом, получающимся в результате довольно грубой обработки сыворотки при pH 3,9 в полунасыщенном растворе сульфата аммония. Однако Машбёфу удалось получить кенапсовую кислоту при значительно более мягких условиях осаждения: при pH 5,5 [162]. Более того, он установил, что кенапсовая кислота может «денатурироваться» при осаждении концентрированными растворами фосфата [161]. При этом образуется осадок, богатый липидами, и если последние не удалены, то осадок нерастворим даже при pH 8.

Белки, остающиеся в растворе после обработки фосфатом, являются гетерогенными, что можно установить путем электрофореза [161]. Машбёф обнаружил удивительную устойчивость изолированной кенапсовой кислоты по отношению к окислительным агентам, которыми липид плазмы легко окисляется. В противоположность этому Гард с сотрудниками нашел, что изолированный β_1-липопротеид подвергается быстрому автоокислению [164].

2) β_1-ЛИПОПРОТЕИД (Х-БЕЛОК)

β_1-Липопротеид, содержащийся в плазме человека, был получен в высокоочищенном состоянии при ультрацентрифугировании его концентрата (фракция III-0 по Кону) в среде с высокой плотностью

(1 *M* NaCl) [164]*, в которой он всплывает, отделяясь от других белков. Очищенный таким образом липопротеид гомогенен при исследовании в ультрацентрифуге. Его молекулы, по-видимому, имеют сферическую форму и сильно сольватированы. Молекулярный вес (в безводном состоянии) равен $1{,}3 \cdot 10^6$. В табл. 31 приведены данные о составе этого сложного белка, схематически представленного на рис. 24, из которого видно, какую незначительную часть составляют водорастворимые группы в этом белке. Несмотря на это молекулы β_1-липопротеида чрезвычайно сходны по физико-химическим свойствам с молекулами белка, будучи растворимыми в разбавленных солевых растворах при изоэлектрической точке. После экстрагирования липида на холоду остающийся белок растворим в дистиллированной воде [164].



Р и с. 24. Состав β_1-липопротеида (по Онклею).

Неустойчивость этого липопротеида создает значительные затруднения для его точного изучения: при замораживании или высушивании он денатурируется; липид легко окисляется, подходящие же антиоксиданты еще не найдены [165]. Окислению на воздухе, по-видимому, прежде всего подвергаются следы каротеноидов, находящиеся в липопротеиде, и возможно—эфиры ненасыщенных жирных кислот. Это окисление сопровождается заметным изменением спектра поглощения, увеличением молекулярной плотности и подвижности в электрическом поле (при pH 8,6).

Неустойчивость проявляется также при попытках измерения коллоидно-осмотического давления этого белка; получающиеся при этом высокие и непостоянные величины свидетельствуют о диссоциации липопротеида [61]. С аналогичными затруднениями встретились при исследовании кенапсовой кислоты Машбёфа [166]. В противоположность этому даже липемическая сыворотка не вызывает затруднений при определении ее осмотического давления [167]. Вопрос о том, объясняется ли эта неустойчивость только из-

* Адер Дж. и Адер М. [165] получили неочищенную липопротеидную фракцию, вероятно B_1, осаждением сульфатом аммония при концентрации последнего равной 50—60% насыщенного раствора.

менениями в результате окисления или связана с увеличением неустойчивости белка при предварительном фракционировании спиртом, нельзя решить до тех пор, пока не будут получены анаэробные препараты β_1-липопротеида.

Были установлены некоторые детали, касающиеся структуры β_1-липопротеида, по-видимому, важные для интерпретации его физико-химических свойств. Так, Мак-Ферлан показал, что белковоподобные свойства β_1-липопротеида нельзя объяснить тем, что ядро липида находится внутри белковой оболочки, так как для этого недостаточно белка [168]. Поэтому Гард, Онклей и Мелин предположили, что между неполярными участками липида и пептидными группировками имеется взаимодействие, осуществляемое главным образом силами Ван-дер-Ваальса; при этом заряженные группы фосфолипида на поверхности липопротеида остаются свободными [164].

Для β_1-липопротеида были получены специфические антитела. Однако явление преципитации указывает на наличие нескольких антигенов, не идентифицируемых с другими очищенными компонентами плазмы [169]. Следовательно, эта фракция может представлять собой смесь белков. Иммуногистохимические исследования (см. стр. 307) показали, что этот белок по сравнению с другими белками плазмы наиболее распространен внутри клеток; это дает возможность предположить, что он участвует в переносе липидов через клеточную мембрану. Нормальное его содержание в плазме составляет 1—2 *г/л*. Однако его концентрация изменяется в широких пределах у разных индивидуумов и зависит от возраста и пола [170, 171].

3) α-ЛИПОПРОТЕИДЫ

α-Липопротеиды, выделенные впервые электрофоретически Бликсом с сотрудниками [157], привлекли меньшее внимание, чем β-липопротеиды, по двум причинам: во-первых, их растворимость такова, что они осаждаются вместе с другими белками (включая альбумин), а во-вторых, их осаждение происходит при низких значениях pH (5,1 в методе 6), при которых могут происходить некоторые изменения белков. Последнее подтверждается тем, что в процессе повторного осаждения при pH 4 и ниже наблюдалось непрерывное и заметное уменьшение количества α-липопротеида. Белки, очищенные при этом значении pH, напоминают по растворимости кенапсовую кислоту Машбёфа. Эти белки вместе с альбуминами могут быть осаждены ионами цинка при pH 5,8 и выше. Этот метод оказался удовлетворительным для аналитических целей и может быть использован для определения содержания липидов в осадке [172]. В α-липопротеидах отношение холестерина к фосфолипиду значительно меньше (приблизительно эквимолярные количества), чем в β_1-липопротеиде (см. табл. 31). Холестерин находится в исключительно

лабильном состоянии и легко экстрагируется из плазмы при выдерживании последней с эфиром. Примечательно, что при «денатурации» α-липопротеидов нагреванием до 60° холестерин теряет способность экстрагироваться (Бетчелор, личное сообщение).

Согласно Пэджу [170], главным компонентом α-липопротеида является α_1-компонент. Обычно его содержание составляет 1—2 *г/л*; в зависимости от условий оно может изменяться так же значительно, как и концентрация β_1-липопротеида.

Липопротеидный компонент, промежуточный между β_1- и α_1-липопротеидами, получаемый по флотационному методу Гофмана, Пэдж назвал α_2-липопротеидом [191]. Он содержится в значительно меньших количествах: 0,1—0,2 *г/л* [173].

4) КОМПОНЕНТЫ ГОФМАНА; ПЕРЕНОС ЛИПИДОВ

Гофман с сотрудниками [174] обнаружили при ультрацентрифугальном анализе в растворах высокой плотности разновидности молекул с меньшими и бо́льшими скоростями всплывания, чем это свойственно молекулам β_1-липопротеида, и установили возможность изолирования α-липопротеидов также посредством метода всплывания. Такие методы должны давать значительно лучший материал для дальнейших химических исследований, хотя при этом следует учитывать возможность изменений вследствие высоких концентраций ионов, особенно если известно, что применяемые ионы энергично взаимодействуют с белками. Последнее может иметь место в случае бромидов, которые применялись Пэджем для получения растворов с плотностью 1,21 при отделении всех липопротеидов плазмы [170].

Более быстро всплывающие компоненты Гофмана, по-видимому, образуют группу частиц, прогрессивно увеличивающихся до видимых капелек жира, и содержат значительные количества нейтральных жиров [175]. Эти факты свидетельствуют о способности липопротеидов эмульгировать жиры и демонстрируют, таким образом, их транспортную функцию, как это постулировал Фрезер [176]. Небольшое, но все же заметное содержание в липопротеидах жирорастворимых витаминов и гормонов, а также быстрое установление равновесия между холестерином, содержащимся в липопротеидах, и клеточным холестерином, что было показано путем изучения равновесия между плазмой и эритроцитами, служит дальнейшим доказательством их участия в переносе [177].

4. ЗАЩИТНЫЕ (ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫЕ) ФУНКЦИИ; АНТИТЕЛА

Защита сосудистой системы от инвазии осуществляется главным образом внешними покровами. При повреждении последних, например при ранении, жидкость под действием кровяного давления вытес-

няется наружу, чем и предотвращается заражение. Однако проникновение даже небольших количеств микроорганизмов оказалось бы гибельным, если бы внутри сосудов не существовало особых средств борьбы. Организм развивает сложные механизмы борьбы с ними, в которых участвуют специализированные клетки (лейкоциты) и белки (антитела и комплемент). Более детальное обсуждение этого вопроса см. в гл. VII. Однако поскольку эти компоненты составляют значительную часть плазменных белков (только одни γ-глобулины составляют 11% белков плазмы), то их неиммунологические свойства рассматриваются здесь. (См. также обзоры Кэмпбелла и Ленни [178], Мэррека [179], Смита и Егера [180] и Гауровитца [181].)

А. Определение антител

Антитела появляются в ответ на раздражение, производимое соответствующим инородным веществом (антиген обычно представляет белок или полисахарид), введенным в организм позвоночного. Эти тела продуцируются определенными клетками ретикуло-эндотелия (в настоящее время кажется наиболее вероятным, что ими являются плазматические клетки) и могут быть обнаружены в кровотоке через неделю или более после введения антигена. Антитела обнаруживаются по их способности жадно соединяться с исходным антигеном; они обычно обладают исключительной специфичностью и не реагируют даже с весьма сходными с антигеном молекулами. Как показал Ландштейнер [182], эта специфичность, по-видимому, связана с особыми группировками, которые локализуются на поверхности антигена. Для того чтобы такие группировки могли вызывать иммунологические реакции, они должны обладать следующими существенными особенностями: 1) наличие одной или нескольких заряженных групп; 2) относительно постоянное пространственное взаимоотношение между различными частями антигенной группы; 3) наличие общей конфигурации, чуждой по отношению к клетке, продуцирующей антитело*.

Соединение антитела с антигеном может быть обнаружено различными способами (см. гл. VII), из которых наибольший интерес для химика представляют следующие: 1) изменение активности ан-

---

* Некоторые собственные особо изолированные белки животного, такие, как белок хрусталика глаза, могут также продуцировать антитела при их инъекции [183]. Более того, иммунными реакциями, вызываемыми собственными белками животного, пытались объяснить некоторые заболевания, такие, как ревматическая лихорадка, эритематозная волчанка и гломерулярные нефриты [184]. Повышенная чувствительность в этом случае может вызываться чужеродными антигенами, например компонентами стрептококков, которые продуцируют антитело, вступающее в перекрестную реакцию с собственными тканями пациента.

тигена (например, потеря ферментативной активности); 2) изменение заряда частиц антигена или антитела (электрофоретический анализ [185]); 3) изменение степени агрегации иммунных компонентов. Агрегация обычно обнаруживается по значительному уменьшению растворимости, т. е. по образованию осадка (реакция преципитации). Однако при обычно применяемых больших разведениях для такого осаждения может потребоваться значительное время; более ранние стадии агрегации можно проследить путем измерения светорассеяния [186] или посредством ультрацентрифугирования [187].

Ничтожная растворимость осадков, образовавшихся при соединении антигена с антителом, и их легкая растворимость при избытке антигена (а в некоторых случаях избытка антитела) послужили Гейдельбергеру и Кендаллу [188], Мэрреку [189], Паулингу [190] и другим авторам основанием для формулировки постулата о «двухвалентности» антител, которые, по их мнению, образуют цепи или решетки с попеременно чередующимися молекулами антигена и антитела*. (При избытке антигена такие цепи представляют собой небольшие растворимые единицы.) Часто антитела нейтрализуют антигенную активность без образования видимого осадка. Такие «неполноценные» антитела с точки зрения приведенной выше теории являются «одновалентными», поскольку они не могут принимать участие в образовании цепи. В свете имеющихся данных о растворимости белков, особенно о структуре комплекса в связи с нейтрализацией в нем групп, определяющих растворимость, невозможно предугадать, обладают ли небольшие агрегаты «одновалентного» антитела с антигеном в действительности настолько малой растворимостью, чтобы ею можно было объяснить реакцию преципитации. Наличие же даже небольшого числа «двухвалентных» молекул антитела, связывающих первичные агрегаты, могло бы объяснить эту реакцию.

В то время как поливалентность антитела еще не доказана, поливалентность антигена, по-видимому, является более реальной, так как некоторые специфические осадки могут содержать более 20 молей антитела на 1 моль антигена (см. гл. VII). Таким образом, если не делать допущения о наличии неспецифической адсорбции, то следует считать, что антиген обладает многочисленными активными центрами.

Вследствие того, что эти многочисленные активные центры на антигене, вероятно, имеют не одинаковую структуру, препараты антител, даже очищенные методом специфической преципитации до состояния чистого белка, все же могут содержать разновидности молекул антитела, направленных против различных группировок [178].

---

* Обзор работ по этому вопросу дан Паппенгеймером [191].

Б. Гетерогенность

Таким образом, антитела могут быть гетерогенными с точки зрения как природы их взаимодействия (валентности), так и особой конфигурации антигенов, против которой направлено их действие. Дальнейшее обсуждение гетерогенности антител на первый взгляд может показаться бесполезным, так как не вызывает сомнений, что физико-химические свойства антител, действие которых направлено против различных антигенных группировок, будут чрезвычайно разнообразны. Однако существует достаточное сходство между такими свойствами этих компонентов, как молекулярный вес, электрофоретическая подвижность, растворимость и состав, которые делают небесполезным рассмотрение вопроса о гомогенности фракций плазмы, в которых содержатся упомянутые компоненты.

Возможно, что все компоненты плазмы, классифицируемые при электрофоретических исследованиях как γ-глобулины, обладают функцией антител. Во всяком случае у новорожденных в первые недели после рождения уменьшение содержания плазменных антител и γ-глобулинов, полученных от матери, происходит параллельно, и последующее появление естественного иммунитета наблюдается вскоре после образования собственных для данного индивидуума γ-глобулинов [192, 193]. Кроме того, при некоторых патологических условиях отсутствие γ-глобулинов совпадает с отсутствием и антител [194]. Вопрос о том, является ли образование антитела «измененным» в присутствии антигена синтезом γ-глобулина, как это предполагает Гауровитц, или все γ-глобулины представляют собой антитела, все еще не решен. В то время как титры известных антител соответствуют только весьма малой части γ-глобулинов в нормальной сыворотке [195], число неизвестных в ней компонентов может быть неограниченно велико. Большой интерес представляет неспособность некоторых лиц, страдающих множественной миеломой, продуцировать антитела, тогда как очевидно нормальные γ-глобулины образуются у них в больших количествах [196].

Некоторые трудности возникают при попытке точного определения γ-глобулинов, так как более совершенные измерения электрофоретической подвижности по методу обратимого распределения на границе раздела (т. II, гл. IV) дают непрерывный спектр подвижностей компонентов, относительные количества которых приближенно выражаются кривой распределения Гаусса с средней изоэлектрической точкой для γ-глобулина человека, соответствующей pH 7,3 (т. II, гл. IV). Частичное разделение этих различно заряженных компонентов было достигнуто посредством фракционного осаждения, производимого при значениях pH, соответствующих крайним значениям изоэлектрической зоны*, а также при помощи

* Такого рода фракционирование имеет место в методе 9 Кона между фракциями II-1,2 и II-3 (см. работу [156]).

электрофоретического конвекционного прибора Кенна—Кирквуда [197].

Иногда в части электрофоретической диаграммы, приписываемой обычно γ-глобулинам, наблюдаются две гауссовские группы подвижностей. Соответствующие им белки были названы γ_1- и γ_2-глобулинами. Это явление обычно наблюдается в случае гипериммунной плазмы лошади, где более подвижный компонент (γ_1-глобулин) обозначается также как Т-глобулин. γ_1-Глобулин может также соответствовать фракции III-1 плазмы человека [156], содержащей изогемаглютинины и некоторые антитела, например тифоидный агглютинин О, который был обозначен Онклеем [195] как β_2-глобулин.

Наличие Т-глобулина в гипериммунной сыворотке рассматривалось в связи с: 1) природой введенного антигена (углевод или белок), 2) стадией иммунизации, 3) методом иммунизации—интравенозным или интрастициальным введением антигена—и, следовательно, с «внутриклеточным» или «гуморальным» продуцированием антитела и 4) природой образованного антитела, способного преципитироваться, или «неполного» одновалентного антитела [198]. Однако эти явления не происходят по правилу «все или ничего», и антитело для данного антигена обычно находят как в γ_1-, так и в γ_2-компоненте, так что приведенные выше обобщения имеют ограниченное значение [199—201]. Предположение о том, что эти два электрофоретических типа антитела возникают в различных участках тканей и что их продуцирование, таким образом, отражает свойства и, следовательно, «судьбу» антигена, может показаться интересным. Тем не менее γ_1- и γ_2-глобулины обнаруживают значительное сходство в химических свойствах и аминокислотном составе [202] (табл. 32), на основании чего можно предположить, что они ближе друг к другу, чем это следует из их различного электрофоретического поведения*.

В плазме млекопитающих все антитела в электрическом поле перемещаются в виде γ-глобулинов (или в виде менее подвижных β-глобулинов), тогда как в плазме цыплят встречаются антитела, имеющие значительно бо́льшие подвижности (α-глобулины) [204]. Особую способность специфических осадков антител [205], образующихся при физиологических значениях pH, растворяться только при высоких концентрациях соли (например, при 0,5 *M* NaCl), можно объяснить высоким зарядом, которые несут частицы антител. (Это значит, что образование специфического осадка при pH 7,5 с антителом цыпленка, изоэлектрическая точка которого находится при pH 5, может соответствовать образованию специфического осадка с антителом млекопитающего при pH 9.)

---

* Кенн с сотрудниками [203] обнаружили компонент с меньшей подвижностью, чем нормальный γ-глобулин, в сыворотке кролика, гипериммунизированного по отношению к *n*-азофенилрсонилокислому белку.

Таблица 32

СОСТАВ ИММУННЫХ БЕЛКОВ [180]

Количества компонентов указаны в *г* на 100 *г* безводного белка
Данные для бычьего γ_2-глобулина представляют средние величины для двух препаратов

Компонент	γ-Глобулин человека II-1 [101]	γ-Глобулин человека II-1, 2 [202]	γ-Глобулин человека II-3 [202]	γ_2-Глобулин быка [202]	T(γ1)-глобулин быка [202]	γ_2-Глобулин лошади [202]	T(γ1)-глобулин лошади [202]
Аргинин	4,8	5,1	3,7	5,8	4,8	3,8	2,8
Аспарагиновая кислота	8,8						
Цистин (+цистеин)	3,1	2,6	2,7	2,9	2,8	2,6	2,5
Глутаминовая кислота	11,8						
Глицин	4,2						
Гистидин	2,50	2,01	1,91	2,05	2,01	2,44	2,43
Изолейцин	2,7	2,8	2,0	3,2	3,0	4,4	3,3
Лейцин	9,3	9,3	9,5	7,4	8,6	9,0	7,5
Лизин	8,1	7,2	6,3	6,7	6,4	8,6	6,7
Метионин	1,06	1,12	0,87	1,18	1,00	0,95	0,72
Фенилаланин	4,6	4,5	4,7	3,2	4,5	4,4	4,1
Пролин	8,1						
Серин	11,4						
Треонин	8,4	8,8	7,4	10,0	9,5	11,1	8,7
Триптофан	2,86	2,6	2,8	2,6	2,6	2,7	2,8
Тирозин	6,75					6,8	6,8
Валин	9,7	9,7	9,7	10,0	9,5	10,1	10,4
Гексоза		2,3	2,3	2,1	2,5	2,5	2,6
Гексозамин		1,27	1,23	1,31	1,50	1,18	1,53

Молекулярные веса многих антител млекопитающих, по-видимому, лежат в области величин, близких к 150 000 ($s_{20}=7S$). Однако были обнаружены также и более тяжелые компоненты ($s_{20}=9$—$11\,S$ и $s_{20}=18$—$20\,S$). Так, Кебет [206] нашел, что молекулярный вес лошадиного антитела, регенерированного из специфического осадка его с антипневмококком, равен 10^6 ($s_{20}=20S$). Петерман и Паппенгеймер [207, 208] получили антитело с молекулярным весом того же порядка и показали, что оно при переваривании пепсином «деполимеризуется» до компонентов с $s_{20}=5{,}2\ S$. Половина полученного при этом материала неактивна (т. е. не осаждается антигеном); специфическая активность второй половины в 2 раза больше активности исходного антитела. Кебет [206] также установил, что антитело, полученное из специфических осадков при помощи $Ba(OH)_2$, «деполимеризовалось» без потери активности.

Таким образом, создается представление, что антитела состоят из единиц с молекулярным весом 150 000 или их полимеров. (Небольшие единицы с $s=5{,}2\ S$ обнаружены только в продуктах переваривания пепсином.) Некоторые из полимеров могли быть и артефактами. Так, Гейдельбергер с сотрудниками показал, что антитела лошади, вырабатываемые против γ-глобулина кролика, настолько изменяются в процессе химического фракционирования, что при использовании очищенных фракций в специфический осадок переходит в несколько раз больше неспецифического азота, чем при употреблении исходной сыворотки [209]. Также и γ-глобулин человека, полученный в чистом состоянии в виде фракции II, содержит до 25% тяжелых компонентов ($s_{20}=9$—$20\ S$) [61], тогда как Кенн с сотрудниками [210] показал, что γ-глобулин человека, выделенный посредством конвекционного электрофореза, почти не содержит таких компонентов. (Дальнейшее рассмотрение этого вопроса см. в разделе 4 Г.)

В отношении артефактов следует иметь в виду, что препараты антител часто подвергаются такой обработке, которая не способствует сохранению белка в неизменном состоянии. Так, например, для разрушения комплемента (см. гл. VII) часто производят нагревание (при 56° в течение 30 мин.), а для ускорения флоккуляции специфические осадки обычно подвергают инкубации при 37° (или при более высокой температуре). Более того, вследствие трудности получения сильнодействующих антисывороток часто приходится работать с препаратами, которые хранились в течение нескольких месяцев (и даже лет).

Тем не менее результаты некоторых исследований трудно объяснить, если не допустить существования нативных антител—глобулинов с более крупными частицами, чем частицы основного ($s_{20}=7\ S$) компонента. Так, Педерсен и Гейдельбергер [211, 212] показали, что лошадиная антисыворотка против пневмококков типа I теряет часть тяжелых компонентов ($s_{20}=10$—$20\ S$) при обработке специфическим полисахаридом. Кебет же [213] утверждает, что в одном случае из лошадиной сыворотки можно было целиком удалить осаждаемое антитело на препаративной ультрацентрифуге при такой продолжительности седиментации, которая как раз достаточна для удаления компонента, имеющего константу седиментации, равную 18 S. Однако продолжительность хранения и предыстория этой сыворотки не были указаны. Антитела, полученные диссоциацией солью специфических осадков из сывороток лошади и свиньи, представляют собой преимущественно «гомогенный» компонент с константой седиментации s_{20}, равной 18 S, а не ряд компонентов с различными подвижностями. Эту «гомогенность» антител, по-видимому, трудно объяснить как артефакт, возникающий в процессе хранения или очистки препаратов. Таким образом, антипневмококковые сыворотки копытных животных, очевидно, отличаются как от антипневмококковых

сывороток других животных, так и от других антисывороток копытных [214]. (Меньшее значение парциального удельного объема— 0,715 наблюдалось и для антипневмококкового антитела лошади [213]; см. также табл. 34.)

Взаимосвязь различных антител с общей γ-глобулиновой фракцией особенно убедительно доказал Портер [215], который, применяя динитрофеноловый метод Сангера (см. т. I, гл. II), показал, что антиовальбумин кролика, изолированный в виде специфического осадка, имеет ту же последовательность концевых аминокислот, что и γ-глобулин кролика, а именно аланил—лейцил—валил—аспарагил. Эти результаты находятся в соответствии с постулатом Паулинга о специфических антителах, возникающих из одного и того же «неспециализированного» глобулина за счет специфической упаковки полипептидной цепи, являющейся дополнительной к поверхности антигена [190]. Однако Портер [215], возможно, упрощает истинное положение дел, так как γ-глобулин человека, по литературным данным, содержит не менее 7 различных концевых аминогрупп в дробных количествах, откуда следует, что антитела человека могут быть неоднородными в отношении концевых групп [216].

В. Получение антител в чистом состоянии

Наиболее изящным методом очистки антитела является специфическое осаждение его соответствующим антигеном. Для этой цели предварительными опытами определяют количество антигена, необходимое для полного осаждения антитела. Затем смесь антисыворотки (или плазмы) с антигеном часто инкубируют в течение нескольких минут (или часов) при 37° для ускорения агрегации специфического осадка, после чего для полноты флоккуляции смесь иногда выдерживают в течение одного или нескольких дней при 0°. Специфический осадок обычно так мало растворим, что его можно повторно промыть без потери антитела. Промытые таким образом осадки, по-видимому, состоят только из белка антитела и антигена (возможно, также и комплемента). Однако отделение антигена от антитела представляет собой основную задачу, которая была разрешена только в некоторых особых случаях. Детальное изложение этого вопроса см. у Кэмпбелла и Ленни [178].

Поскольку любая антисыворотка содержит целый набор антител с различной реакционной способностью по отношению к данному антигену, можно получить часть антигена посредством адсорбции в условиях, при которых связывание его происходит наиболее прочно, с последующей элюцией в таких условиях, когда связь его с адсорбентом ослаблена. Так, например, для получения небольших порций антитела адсорбцию часто проводят при 0°, а последующую элюцию—при 40—60°. Более эффективные методы, с помощью которых извлекается до 25% активного антипневмококкового гло-

булина, разработали Гейдельбергер и Кендалл [217], применявшие в качестве элюирующего агента 15-процентный раствор NaCl. Очевидно, что этими методами нельзя изолировать истинное «репрезентативное» антитело, а только лишь фракцию с наиболее слабым сродством к антигену. Однако эти методы обладают тем преимуществом, что они просты: антиген, находящийся в нерастворимом состоянии, будучи соединен с антителом, может быть легко удален.

Если найдены условия, при которых диссоциированный специфический осадок может быть химически фракционирован, то антитело можно извлечь с большей полнотой. Однако для диссоциации обычно необходимы предельные значения pH, при которых антитело отделяется от денатурированного антигена, как это имеет место при очистке антиовальбумина по методу Кэмпбелла инкубацией специфического осадка при комнатной температуре и pH 3 с последующим отделением денатурированного антигена фильтрованием. Выход и чистота антитела, полученного по этому методу, согласно сообщению Кэмпбелла и Ленни [178], достигают 90%. Однако белок подвергается при этом довольно грубому воздействию.

Если специфичность антитела направлена против известных гаптеновых групп, как в случае антител против искусственных антигенов, то специфический осадок может быть диссоциирован при более мягких условиях высококонцентрированными растворами веществ с небольшими молекулами, содержащими гаптеновые группы. Комплекс гаптен-антитело может быть отделен от антигена при помощи подходящих осадителей и затем диссоциирован отщеплением небольших молекул гаптена путем диализа. Этот метод успешно применял Кэмпбелл с сотрудниками [218] для получения антитела против *n*-азофениларсоновой кислоты из сыворотки кролика. Выход антитела превышал 90%, причем 98% антитела осаждалось антигеном*.

Более перспективный общий метод заключается в необратимой фиксации антигена на подходящей твердой поверхности и адсорбции на ней антитела с последующим его элюированием из специфического комплекса. Преимущество этого метода состоит в том, что реакция проходит более быстро (так как при этом нет необходимости в агрегации) и что при наличии не изменяющейся твердой фазы диссоциация комплекса антитело-антиген автоматически приводит к отделению антитела. Кроме того, этот метод можно применять для очистки неосаждаемых антител. Присоединение бычьего сывороточного альбумина к целлюлозе осуществлялось путем взаимодействия целлюлозы с *n*-нитробензилхлоридом, последующего восста-

* Каруш [219] разработал более совершенный метод, применяя менее растворимый антиген (диазотированный фибриноген), с помощью которого производится полное выделение антигена в нейтральной среде осаждением сульфатом аммония.

новления и диазотирования ароматического амина и соединения последнего с сывороточным альбумином [220]. Сывороточный альбумин человека присоединялся к синтетической смоле, содержащей анионы хлора [221]. Полученный таким образом порошкообразный антиген применяли для адсорбции антитела; для этого его или суспендировали в антисыворотке, или изготовляли из него хроматографическую колонку.

В этих случаях частичное элюирование антитела из специфического адсорбента производили кислотой. Однако в несколько сходном случае адсорбции изогемагглютининов на поверхности эритроцитов элюирование осуществляли при более мягких условиях с помощью углеводных компонентов вещества, определяющего группу крови. Так, например, Излайкер [221, 222] получал до 60% изогемагглютининов, адсорбированных на строме эритроцитов, путем элюирования их галактозой или лактозой при 37°.

Антитела как особый класс белков (т. е. γ-глобулины) отделяли от других компонентов плазмы различными методами. Поскольку γ-глобулины составляют только 11% от общего количества белков человеческой плазмы, то для увеличения чистоты антител требуется удаление 5—10-кратного количества балластных веществ, а также веществ, менее устойчивых в процессе их получения (т. е. липопротеидов) или обладающих другими неблагоприятными свойствами. В случае гипериммунной сыворотки, в которой основная часть иммунного белка может представлять собой специфическое антитело, были достигнуты относительно высокие концентрации осаждаемых антител [223].

Впервые электрофоретическое отделение γ-глобулинов от других белков плазмы осуществили Бликс с сотрудниками; в большом масштабе оно было выполнено Кенном, Киркудом и др. [197], применявшими прибор для конвекционного электрофореза (см. т. II, гл. IV). По этому методу при первом прохождении бычьей сыворотки через прибор выход γ_2-глобулинов достигал 85% и чистота их в полученном препарате составляла 50% [224]. Примеси удаляли повторным электрофорезом, при этом выход достигал 75% и чистота γ_2-глобулинов составляла 88%.

Если очищаемые компоненты представляли собой смесь белков, обладавших близкими по величине подвижностями, то дальнейшее их разделение было возможно путем более длительного электрофореза. Так, например, фракция II, полученная из плазмы человека, иммунизированного против коклюша (чистота γ_2-глобулина свыше 95%, средняя изоэлектрическая точка 7,5), была разделена на ряд фракций, средние изоэлектрические точки которых лежали в пределах 7,0—7,9 [225]. При этом наблюдалось также соответствующее разделение иммунной активности фракций: наибольшим защитным действием обладала фракция с наивысшей изоэлектрической точкой.

В связи с тем, что изоэлектрические точки γ-глобулинов имеют наиболее высокие значения по сравнению с соответствующими величинами для других белков плазмы, а растворимость белка быстро возрастает при удалении от изоэлектрического состояния, отделение γ-глобулинов от остальных белковых компонентов плазмы, основанное на их растворимости, является относительно легкой задачей; для этой цели было предложено несколько удовлетворительных методов. Диализ против воды (или разбавление водой), при котором происходит осаждение эуглобулина, и высаливание сульфатом аммония [226] являются далеко не идеальными методами и представляют только исторический интерес. При использовании первого метода отделение происходит в условиях, благоприятствующих взаимодействию белков друг с другом вследствие очень низкой ионной силы раствора. Кроме того, осаждается только часть γ-глобулинов, обладающих достаточной нерастворимостью; γ-псевдоглобулин остается при этом в растворе. По второму методу операции производятся в таких условиях, при которых зависимость растворимости от pH минимальна, и поэтому выделение белка, основанное на понижении его заряда, почти не происходит. Кроме того, при использовании второго метода большие количества находящихся в белках солей могут быть удалены только в результате длительного диализа. Несмотря на это, при помощи этого метода были получены хорошие выходы γ-глобулина высокой степени чистоты [227].

Получение очень чистого глобулина с хорошими выходами обстоятельно исследовали Кон с сотрудниками; это заключительная часть предложенной им системы фракционирования белков. Подробности по этому вопросу можно найти в работе Онклея с сотрудниками [156]. Описание метода 9 дано также в конце этой главы. Найдено, что при первичном осаждении белков из плазмы достаточно полное отделение γ-глобулина от β-липопротеида не достигается. Поэтому фракция II+III, содержащая, как предполагают, весь γ-глобулин (за исключением небольшого количества, удержанного первичным осадком фибриногена—фракцией I, и следов, остающихся в фракции IV), и основная масса β-липопротеида осаждалась при pH 6,9 и 0,09 Г/2 25-процентным этиловым спиртом при —5°. Полученную таким образом более простую белковую систему подвергали дальнейшему фракционированию (см. рис. 31); β-липопротеид экстрагировали, понижая ионную силу системы до очень низких значений; γ-глобулин отделяли от остальных белков, имеющих более низкое значение изоэлектрических точек, например от изогемагглютининов, экстрагированием при pH 5,2, и 0,015 Г/2 17-процентным спиртом. После этого γ-глобулин вновь осаждали при pH 7,4 25-процентным этиловым спиртом. Этим методом были получены препараты γ-глобулина, содержавшие 95% этого белка [подвижность γ_2-глобулина в вероналовом буфере с pH 8,6 и 0,1 Г/2 составляет $(0{,}8—1{,}5)\,10^{-5}$], причем выход белка достигал 80% от его содержания в плаз-

ме. В остатке от γ-глобулинового экстракта находились дополнительные антитела, главным образом некоторые типы агглютининов. Эти агглютинины Дейч с сотрудниками [228] назвал γ_2-глобулинами и разработал метод их отделения от β-глобулинов и остатков неэкстрагированного γ_2-глобулина. Полученные таким образом препараты обладают иммунологическими свойствами фракции III-1 (метод 9), но при электрофорезе обнаруживают бо́льшую гомогенность (до 95% γ_1-глобулина).

Были изучены условия применения методов 6 и 9 разработанной Коном схемы фракционирования спиртом к нормальной и гипериммунной плазме других видов животных. Так, Смит фракционировал бычью плазму и получил совершенно чистые γ_1- и γ_2-глобулины [229]. Как уже указывалось, эти белки обладают весьма сходным химическим составом и отличаются только по содержанию фенилаланина*. В случае плазмы эмбриона быка γ-глобулинов не было; они появляются только после рождения и приема молозива.

При изучении плазмы лошадей, гипериммунных по отношению к токсину столбняка, методом 6 было обнаружено широкое распределение антитоксической активности среди отдельных фракций. Значительная часть активности связана с фракцией IV, которая, как показал электрофоретический анализ, содержала только следы γ-глобулина. Наименьшая подвижность компонента, содержащегося в этой фракции в значительном количестве (21%), составляла $3{,}1 \times \times 10^{-5}$ [232].

Кункель [233] предложил применять для осаждения γ-глобулинов ионы цинка и на этой основе разработал аналитический метод определения этих белков. Однако применимость этого метода доказывалась главным образом путем сравнения выходов осадка с выходами, полученными другими аналитическими методами. Более обстоятельное изучение этой системы показало, что ионы цинка, обладая более специфическим действием, уступают спирту, применение которого уже было рассмотрено, и что полное выделение γ-глобулинов достигается только в результате многоступенчатого процесса [172].

Более надежными реагентами для фракционирования, по-видимому, являются некоторые органические анионы [172, 234]. Так, например, бифталат применялся в простом методе выделения лошадиного антитела против полисахаридов пневмококков типа I [235]. В этом процессе лошадиную антисыворотку сначала (по Фелтону [226]) разбавляли водой. Осадок (осаждаемый на 60% специфическим полисахаридом) растворяли в таком количестве

* Поразительное различие между γ_1- и γ_2-глобулинами быка в отношении поглощения ультрафиолетовых лучей [230] заслуживает дальнейшего изучения. Бивен и Холидэй [231] полагают, что это различие объясняется скорее содержанием тирозина, а не фенилаланина, как это предполагал Смит.

0,9-процентного раствора NaCl, чтобы получить 3-процентный раствор белка. Инертные белки осаждали добавлением 0,2 *М* раствора бифталата калия (pH 3,6) при 20°. Необходимые для этого количества раствора бифталата варьировали от 0,4 до 0,7 объемных частей для различных партий сыворотки. Выход антитела (осаждаемого на 98%) по этому методу достигал 90%. Наиболее растворимая часть полученного антитела, осаждаемая при концентрациях сульфата аммония выше 0,17 *М*, могла кристаллизоваться, но образовавшиеся при этом кристаллы имели неправильную форму и при перекристаллизации становились еще хуже. Хотя эта часть антитела полностью осаждается полисахаридом пневмококков типа I, она обнаруживает меньшее защитное действие *in vivo*, чем антитело, полученное из специфического осадка. Эта часть антитела оказалась также неустойчивой, в процессе кристаллизации непрерывно образовывался денатурированный белок. Возможно, что это связано с низким pH (3,6) при применении бифталатного метода выделения.

Г. Физические и химические свойства

Физико-химические свойства антител особенно обстоятельно исследовались в случае γ-глобулинов (фракция II), полученных из смешанной нормальной человеческой плазмы. Как уже указывалось, главный компонент этих глобулинов имеет константу седиментации, равную $s_{20}=7{,}2$ *S*. Исходя из этого значения s_{20} и допуская, что внутренняя вязкость равна 0,06, а парциальный удельный объем 0,739, был вычислен молекулярный вес γ-глобулина, который оказался равным 150 000. (На основании измерений осмотического давления для молекулярного веса было получено значение 156 000. Однако это значение слишком велико для того количества компонента с $s_{20}=10$, которое содержалось в исследуемом растворе.) На основании полученных данных были рассчитаны длина молекулы γ-глобулина и отношение главных осей, которые оказались равными 230 Å и 6 : 1 соответственно [65]. Изоэлектрическая точка γ-глобулинов человека в среднем равна 7,3 в буфере какодилат—NaCl с 0,1 Г/2 [236].

При исследовании растворимости фракции II оказалось, что она чрезвычайно гетерогенна. Растворимости подфракций, выделенных путем повторного частичного осаждения, различаются между собой в тысячи раз [234]. Эта полидисперсность обнаружена также при диализе против дистиллированной воды, в результате которого часть белка осаждается (эуглобулиновая фракция), а часть остается в растворе (псевдоглобулин). Однако при фракционировании не установлено резких границ, так как дальнейший диализ псевдоглобулиновой фракции обычно приводит к дополнительному выделению эуглобулина. Большее количество эуглобулина можно также получить, подвергая сначала псевдоглобулиновую фракцию обработке

каким-либо другим методом фракционирования (спиртовой метод или высаливание), а затем диализируя полученную фракцию. Таким образом, чрезвычайно трудно разграничить эти компоненты по растворимости. Они проявляют обычную растворимость белков: высаливаются при низких (от 0 до 0,1) и при высоких (например, более 2) значениях ионной силы; в изоэлектрическом или близком к нему состоянии их растворимость минимальна. Поскольку все осадки состоят из молекул, имеющих различные в определенном интервале изоэлектрические точки, они содержат, вероятно, как изоэлектрические молекулы, так и солевые комплексы из противоположно заряженных белков.

Устойчивость иммунных белков в значительной мере зависит от метода испытания. Некоторая специфическая активность часто остается в таких препаратах, которые в других отношениях следовало бы рассматривать как полностью денатурированные. Однако незначительные изменения иммунологических свойств часто являются первыми изменениями, которые происходят в таких препаратах. Так, например, «жадность» антител (скорость вторичной реакции флоккуляции) обнаруживает чрезвычайную чувствительность при неблагоприятной обработке. Осаждающее действие антитела может быть уничтожено до того, как будет изменено его защитное действие *in vivo*.

Устойчивость антител заметно изменяется в присутствии других белков. Так, нагревание цельной сыворотки оказывает значительно большее влияние на реакцию преципитации лошадиной антисыворотки против пневмококков типа I, чем аналогичная тепловая обработка эуглобулиновой фракции (содержащей антитело), выделенной из сыворотки [237]. Тепловая обработка смесей казеина и антипневмококкового эуглобулина также оказывает большее воздействие на реакцию преципитации, чем аналогичная тепловая обработка отдельных фракций. Утрата способности к осаждению идет параллельно появлению нового электрофоретического компонента, подвижность которого имеет промежуточное значение между подвижностями казеина и γ-глобулина. Более того, антитело (γ-глобулин), выделенное электрофоретически из частично инактивированных смесей, обладает исходной реакционной способностью [238].

При денатурации кроличьей антисыворотки против овальбумина мочевиной (8*M*) получается препарат, дающий большие осадки с овальбумином, чем исходная сыворотка, тогда как при обработке мочевиной очищенного антитела подобный эффект не наблюдается [239]. Кроличья антисыворотка против пневмококков, подвергнутая действию кислой среды (pH 4 или ниже), также дает большие количества специфического осадка [240], чем лошадиная антисыворотка против кроличьего γ-глобулина в условиях, которые часто применяются для очистки этого антитела. Возникает сомнение, не является ли высокая «чистота» некоторых препаратов антител артефактом,

возникающим в результате присоединения примесей к антителу, которые определяются вместе с ним.

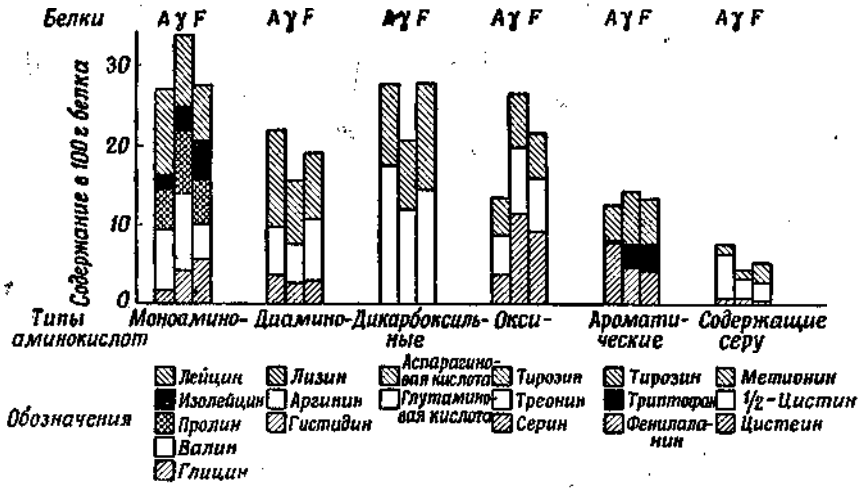
Антитела, по-видимому, обладают значительной способностью полимеризоваться с другими белками, хотя при этом способность вызывать осаждение может изменяться. Этот факт можно объяснить изменением суммарного электрического заряда молекулы антитела, в результате чего меняется растворимость специфического осадка в физиологической области значений pH. С этой точки зрения допустимо образование комплексов при взаимодействии молекул антитела друг с другом, однако образование этих комплексов не будет выявляться, так как суммарный заряд частиц и, следовательно, растворимость и электрофоретические характеристики не изменяются при этом сколько-нибудь существенно. Таким образом, многие высокомолекулярные вещества могут быть артефактами в указанном выше смысле. Интересно выяснить, связана ли подобная полимеризация с обменом групп —SH на S—S, как это было установлено в случае альбумина [98], поскольку γ-глобулин также содержит небольшое количество сульфгидрильных групп.

Устойчивость концентрированных растворов γ-глобулинов (фракция II) изучали по изменению их мутности или вязкости, так как изменение этих свойств, предшествует измеримым изменениям иммунологических титров. (Это может просто обозначать, что количество (%) денатурированного вещества, измеренное физико-химическими методами, слишком мало для изменения иммунного титра.) Таким образом, было найдено, что оптимум устойчивости γ-глобулинов в изотонических солевых растворах находится при значениях pH, близких к 7. γ-Глобулины устойчивы в течение нескольких часов при 50°, причем устойчивость их заметно возрастает при добавлении различных веществ, из которых наиболее эффективными оказались сахара, например лактоза, и аминокислоты, например глицин (Гросс, личное сообщение). Применяемые для этой цели сахара не должны быть восстанавливающими, так как последние вызывают реакцию, в результате которой раствор становится коричневым. Большие органические анионы, весьма эффективные при стабилизации альбуминов, оказывают незначительное действие на γ-глобулины.

Антитела весьма устойчивы (подтверждено определениями специфической реакционной способности) к изменению pH, на что указывают результаты, полученные различными методами, применяемыми для их очистки. Так, кроличий антиовальбумин и лошадиные антипневмококковые глобулины устойчивы в средах с pH 2,5 и 3,7 соответственно [178, 208]. При значениях pH выше 12 физические свойства кроличьего γ-глобулина изменяются (заметно увеличивается вязкость раствора), но его специфическая активность как антитела не претерпевает значительных изменений [241]. Аналогично сохраняется активность лошадиного антипневмококкового антитела после обработки гидроокисью бария [206]. Из этих данных сле-

дует, что солевые связи не являются определяющими в сохранении специфических активных центров на поверхности молекулы антитела.

Устойчивость лошадиного антитела по отношению к высоким концентрациям гуанидинхлорида [242] и кроличьего антитела по отношению к 8 *М* раствору мочевины [239] наводит на мысль, что у этих белков пептидная цепь может «раскручиваться» обратимо, как у сывороточных альбуминов.



Р и с. 25. Аминокислотный состав некоторых белков (сывороточного альбумина, γ-глобулина и фибриногена), полученных из плазмы человека (по Брэнду).

γ-Глобулины особенно чувствительны к поверхностной денатурации. Полная денатурация γ-глобулина достигалась неоднократным погружением стеклянной палочки в раствор этого белка (Лонти, личное сообщение). Это может служить объяснением того факта, что пленки антител (в противоположность пленкам антигенов) обычно не обладают специфической активностью [243].

Химический состав иммунных γ-глобулинов приведен в табл. 32*. Эти белки, по-видимому, состоят исключительно из аминокислот и углеводов. Сахара и аминосахара содержатся в небольших, но постоянных количествах; обычно на 2 моля гексозы приходится 1 моль аминосахара (см. раздел 8). γ-Глобулины содержат значительно больше оксиаминокислот, чем большинство белков, но, с другой стороны, их состав не является особенно характерным (рис. 25).

Реакционная способность этих компонентов, отличная от их специфической активности, исследовалась недостаточно. Это обстоя-

* Данные, приведенные в табл. 32, взяты из работы Смита и Егера [180].

тельство находится в резком контрасте с огромным количеством исследований химических изменений антигенов [182] (см. гл. VII).

Как уже упоминалось при рассмотрении устойчивости, солевые связи, по-видимому, не являются определяющими для сохранения иммунологически специфической конфигурации молекулы антитела, однако они играют важную роль в специфических реакциях. Так, например, диссоциацию специфических осадков для препаративных целей производят с помощью кислот и оснований (см. выше). Полную диссоциацию следует отличать от растворимости специфических осадков, которая может наблюдаться при более умеренных значениях pH и связана с возникновением достаточно большого электрического заряда у частиц комплекса антиген-антитело. Однако оба явления могут представлять собой различные стадии реакции одного и того же типа. При снятии электрического заряда аминогрупп антипневмококков типа I обработкой кетеном специфическая реакция может быть ослаблена или полностью предотвращена [244].

Введение в молекулу антитела одной или двух молекул некоторых изоцианатов, вероятно реагирующих с аминогруппами [245, 246], не отражается на специфической реакции*. Это является основой метода приготовления флуоресцентных антител по Куну, применяющихся как гистологические красители для изучения распределения антигена в тканях.

Нингидрин, обычно применяемый для определения α-аминогрупп [247], заметно увеличивает скорость флоккуляции кроличьей антисыворотки [248]. Поскольку в антителе кролика содержится небольшое количество α-аминогрупп (одна группа в молекуле, молекулярный вес 150 000) [215], то, по-видимому, нингидрин должен взаимодействовать и с другими группировками, находящимися в молекуле антитела.

Иодирование оказывает заметное действие на специфическую активность антител. Иод, вероятно, реагирует с тирозильными группами, о чем можно судить по изменению относительной химической активности тирозильных остатков в различных белках [249]; было бы желательно получить прямое доказательство такого течения реакции. В общем было найдено, что в молекулу кроличьего антитела можно ввести до 20 атомов иода без заметного изменения его специфической активности [250, 251]. Введение больших количеств иода приводит к уменьшению количества специфического осадка [252]. Эти факты объясняются или тем, что только часть тирозильных групп необходима для проявления специфической активности антитела, или тем, что тирозильные группы не являются существенными, и иодирование некоторых других групп (напри-

* Эти исследования [28] проводились с неочищенным кроличьим антителом против пневмококков типа III. Однако это не изменяет выводов, если только флуоресцеин не связывается преимущественно с антителом.

мер, имидазольных), которое происходит при введении больших количеств иода, производит заметное действие.

При сочетании антитела с соединениями диазония также наблюдается прогрессивное изменение по мере увеличения количества реагента. Эти группы, вероятно, также реагируют с имидазольными и тирозильными остатками [253]. Однако производимые при этом изменения, по-видимому, неспецифичны, поскольку при использовании этого метода для введения в молекулу антитела электрически заряженных группировок агглютинирующая или преципитирующая способность антитела исчезает прежде специфической способности к соединению с антигеном или эффективности *in vivo* [254, 255]. Отсюда следует, что наблюдаемый эффект может быть результатом изменения суммарного заряда молекулы антитела.

Перспективный метод для изучения прямого или непрямого действия при изменении специфических группировок антител был предложен Прессменом и Стернбергером [252] в работе по иодированию антитела при наличии и в отсутствие его антигена. Они установили, что кроличьи антитела против *n*-азобензоларсоната овальбумина и против *n*-азобензоата овальбумина при иодировании в присутствии их гаптенов (бензоларсонат натрия и бензоат натрия соответственно) требуют гораздо большие количества иода для инактивации.

Функция антитела* заключается не только в его соединении с антигеном, поскольку в плазме часто происходят дальнейшие изменения, протекающие под действием комплемента (например, если антиген бактериальной природы, то наблюдается лизис бактериальных клеток, внесенных в плазму). В настоящее время мало известно о химических свойствах комплемента**, кроме того, что он состоит из нескольких белковых компонентов, заметно отличающихся по устойчивости и растворимости; поэтому в данной главе он подробно не рассматривается (см., однако, гл. VII и обзоры Гейдельбергера и Майера [258] и Пиллимера [259]). Гейдельбергер показал, что по крайней мере некоторые компоненты комплемента соединяются в «стехиометрических» количествах с осадками антиген-антитело. Возможно, что эти данные следует рассматривать в свете неспецифических реакций соединения, свойственных антителу, о которых упоминалось выше.

5. КОМПОНЕНТЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

В силу необходимости кровь обладает способностью свертываться. Наиболее простой механизм для выполнения этой функ-

* Наличие в сыворотке «неиммунного» бактериального вещества было установлено Пиллимером, Блумом, Леповым, Россом, Тоддом и Уордлоу [256].

** См. недавно проведенные работы по активации комплемента металлами [257].

ции может состоять в том, что клетки крови закупоривают течь. Такой механизм преобладает у более простых организмов. Однако, начиная с ракообразных, появляются более сложные системы, в которых существенную роль играют белки плазмы [260]. У человека участие клеток заменяется инициирующим действием кровяных пластинок, и структура кровяного сгустка определяется одним из главных белковых компонентов плазмы—фибриногеном (см. также т. III, ч. 2).

А. Фибриноген

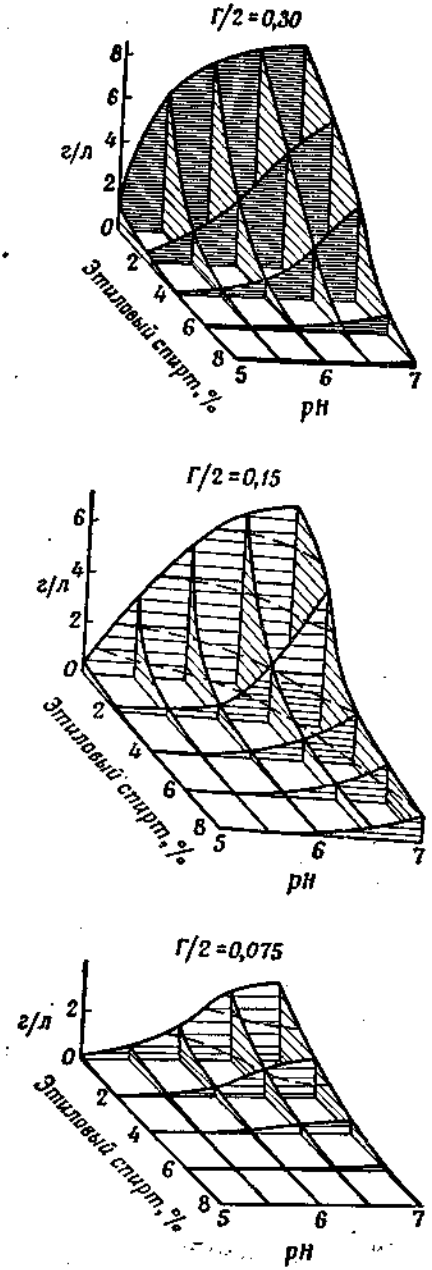
Фибриноген, содержание которого составляет 3—4 *г/л* человеческой плазмы, представляет собой один из наименее растворимых белков плазмы, благодаря чему он легко выделяется избирательным осаждением солью или спиртом при небольших их концентрациях. В классическом методе Хаммарстена [261] в качестве осадителя применяется полунасыщенный раствор NaCl*. В настоящее время предпочитают применять 8-процентный раствор этилового спирта при pH 7 и при 0° (фракция I) [75]. В более кислой среде можно применять менее концентрированные растворы этилового спирта, но осадок фибриногена при этом не становится чище и более подвержен самопроизвольному свертыванию при дальнейшем фракционировании. При применении спиртового метода дальнейшая очистка заключается в растворении полученного осадка в цитратном буфере (для предотвращения свертывания, вызываемого действием ионов кальция или протромбина, которые могут находиться в некоторых количествах в осадке) с последующим фракционированным осаждением фибриногена при двух различных значениях pH, при которых происходит его отделение от менее растворимых и более растворимых, чем сам фибриноген, примесей. Наилучшие условия для применения этого метода можно выбрать, пользуясь диаграммой растворимости (рис. 26). Таким путем были получены [264] препараты, содержащие свыше 98% свертываемого азота**.

Фракцию I из бычьей плазмы, которая лучше всего осаждается при несколько более низких концентрациях этилового спирта, очищали для недавно проводившихся физико-химических исследований [265] фракционированием сульфатом аммония. Фракционирование проводили следующим образом: сухую бычью фракцию I

* Аналогичное действие оказывает 1 *М* раствор сульфата аммония [262].

** Чтобы учесть отщепление небольшого количества пептидов от фибриногена (3—4% азота фибриногена), происходящего в процессе свертывания (см. ниже), опубликованные прежде данные о «проценте свертываемого азота», по предложению Шульмана [268], были увеличены на 3%.

Определение содержания фибриногена посредством измерения количества свертываемого азота вследствие окклюзии примесей может быть весьма неточным, если не принять соответствующие предосторожности [263].



растворяли в 0,1 *М* фосфатном буфере с pH 6,4, затем разбавляли равным объемом воды и оставляли стоять на ночь при 0° [266]. Осаждавшиеся примеси отфильтровывали, и фибриноген осаждали добавлением насыщенного сульфата аммония ($^1/_3$ объема). Для удаления сульфата аммония и приготовления препаратов, пригодных для физико-химических исследований, полученный продукт подвергали диализу против 0,3 *М* раствора KCl. В результате тщательных исследований, проведенных висконсинской группой исследователей [267, 268], молекулярный вес фибриногена был определен заново и оказался равным 330 000. Определение фибриногена затруднялось его неустойчивостью. Агрегация (начало свертывания), которая обычно происходит в различной степени в процессе очистки, может быть причиной завышенных значений молекулярного веса. Поэтому новые исследования, давшие наиболее низкие и полностью совпадающие значения молекулярного веса несмотря на различную технику определения (метод светорассеяния и метод седиментации и диффузии), по-видимому, являются наиболее надежными. (Низкое значение вязкости — 0,25, полученное этими исследователями, также свидетель-

Р и с. 26. Зависимость растворимости фибриногена человека от концентрации этилового спирта и pH при 0° (по Моррисону [264]).

Таблица 33

ФИЗИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ ФИБРИНОГЕНА
В—фибриноген быка, Н—фибриноген человека

Характеристика	Наиболее достоверное значение	Другие значения
Константа седиментации $s_{20,w}$	7,9 В [268]	8,5—9 Н [269]; 9 Н [61]; 8,4—8,6В [270]; 8,4 В [271]; 7,3—7,9 В [272]
Константа диффузии, $см^2/сек \times \times 10^7$	2,02 В [268]	1,1 Н [269]
Парциальный удельный объем	0,72	0,725 Н [18]; 0,723 Н [274]; 0,706 В [275]; 0,717 В [273]
Внутренняя вязкость H_0	0,25	0,25 Н [61]; 0,25 В [268]; 0,34 В [271]; 0,25 В [273]
Константа вращательной диффузии θ_{20}, $сек^{-1}$	39 000 В [276]	35 000 Н [277]
Молекулярный вес по данным седиментации и диффузии	330 000 В [268]	700 000 Н [269]
осмотического давления		580 000 Н [61]
светорассеяния	340 000 В [267]	440 000 Н [278]; 407 000 [276]
Длина молекулы, Å	700	700 Н [61, 277]; 670 В [276]
Отношение осей	20 : 1	От 19 : 1 до 30 : 1[а] В

[а] Значение 30 : 1 вычислено Шульманом из результатов измерений s_{20} и D_{20} [268].

ствует о том, что их препараты не содержали агрегатов, как и наилучшие препараты, описанные прежде [61].)

Физические константы бычьего фибриногена приведены в табл. 33. Кроме наиболее достоверных значений, во второй колонке даны и другие значения, полученные как для человеческого, так и для бычьего фибриногена, поскольку эти два белка, по-видимому, настолько сходны, что различия между ними, о которых сообщалось в литературе, очевидно, связаны с техническими трудностями получения этих белков.

На основании физико-химических исследований можно сделать вывод, что частицы фибриногена должны быть палочкообразными (приблизительно 700×40 Å) и иметь молекулярный вес 330 000. Электронная микрография фибриногена также подтверждает пало-

чкообразную форму его молекул и указывает на их более тонкую структуру, согласно которой каждая палочка состоит из частиц с молекулярным весом приблизительно 100 000 [279, 280]*. В связи с этим следует вспомнить работу Холмберга, установившего, что плазмин расщепляет фибриноген на субъединицы приблизительно той же самой величины. Шульман использовал эту модель сегментированной палочкообразной молекулы для объяснения расхождений в численных значениях коэффициента дисимметрии, вычисленных из полученных им данных по седиментации и диффузии, а также из данных по вязкости.

Фибриноген является одним из наименее устойчивых белков плазмы, он легко коагулирует при нагревании плазмы при 56° (как это имеет место при инактивации комплемента). Однако обычно наблюдаемая неустойчивость связана с его превращением в фибрин под действием тромбина. В литературе появлялись сообщения и о других веществах, обладающих способностью свертывать фибриноген [282]. Однако трудно исключить возможность, что их действие связано с присутствием следов тромбина.

Ферментативная природа тромбина признана давно, однако при получении его из сгустков встретились с затруднениями, которые, очевидно, связаны с тем, что фермент прочно удерживается сгустком. Определенно известно, что он проявляет действие в очень малых количествах и способен превращать в фибрин весовые количества фибриногена, превышающие его количество не менее чем в 10^6 раз.

Реакция, которую катализирует этот фермент, как теперь известно, заключается в отщеплении от фибриногена пептидов [283] в количествах, соответствующих 3—4% общего азота [284]. Таким образом, становится понятным свертывающее действие некоторых протеолитических ферментов, таких, как папаин [282]. Шерри и Тролл [285] открыли синтетические субстраты, на которые действует тромбин, представляющие собой некоторые эфиры аргинила. Тромбин очень быстро действует на метиловый эфир тозиларгинина, в результате чего выделяется метиловый спирт. Эта активность тромбина, как было установлено на различных его препаратах, находится в настолько полном соответствии с его свертывающей активностью, что, по мнению авторов, может служить количественной мерой последней. Протеолитическое действие тромбина сводится к изменению N-концевых аминокислот от глутамила и тирозила (в бычьем фибриногене) к глицилу и тирозилу (в фибрине) в количествах, подтверждающих, что две концевые глицильные группы замещают концевой остаток глутамила [286, 287]. Однако процесс может быть более сложным, так как в жидкости, отделяю-

* Совсем другую интерпретацию электронномикроскопических данных дают Портер и Хэвн [281]

щейся из сгустка, было получено по крайней мере два различных пептида [287].

«Свертывание» фибриногена под действием тромбина предотвращается, если превращение проводить в 0,4 *М* растворе гексаметиленгликоля. В этой среде агрегация ограничивается образованием растворимых палочкообразных частиц, каждая из которых содержит приблизительно 15 фибриногеновых единиц [288]*. Агрегация фибрина, по-видимому, происходит в две стадии, причем первая обратима, так как сгустки очищенного фибриногена могут растворяться в 3,5 *М* растворе мочевины. При этом растворенный белок имеет такой же молекулярный вес, как и фибриноген, что подтверждено измерениями вязкости [290], светорассеяния [291] и скорости седиментации в ультрацентрифуге [292]. При разбавлении такого раствора, содержащего мочевину, снова образуются сгустки фибрина [292, 293].

Однако сгустки в таком виде, в каком они обычно получаются из плазмы, нерастворимы в растворе мочевины [293]. Возможно, что это связано с образованием «необратимых» дисульфидных связей между молекулами (аналогичных связям, возникающим при застудневании альбумина в растворах мочевины), так как необратимость может быть предотвращена добавлением к плазме меркуриала или иодацетамида, после чего сгустки становятся растворимыми в мочевине [294].

Б. Протромбин

Тромбин получается активацией своего предшественника—протромбина, находящегося в плазме. Этот компонент, содержание которого в плазме достигает 70 *мг/л*, неоднократно выделяли в очищенном виде методом фракционирования спиртом. Он был выделен в фракции III-2 , что указывает на относительную нерастворимость этого компонента, имеющего изоэлектрическую точку в кислотной области [156]. Однако в настоящее время разработаны более совершенные адсорбционные методы, позволяющие получать более чистые препараты.

Так, Сиджерс с сотрудниками, сочетая изоэлектрическое осаждение с адсорбцией на гидроокиси магния и солевым фракционированием, получил препараты бычьего протромбина, активность которых в 700 раз больше активности исходной плазмы. Александер и Лендвер нашли, что сульфат бария является более специфичным адсорбентом для протромбина [295]**; применяя его, уда-

* Шульман [289] описал разновидности молекул, которые задерживают свертывание фибриногена в концентрациях, меньших 0,5 *М*. К ним относятся, кроме гликолей, амиды, солянокислые амины и некоторые большие анионы.

** Борде и Деланж [296] применяли сульфат бария для предотвращения коагуляции крови.

лось получить протромбин из человеческой плазмы в очень чистом состоянии посредством только адсорбции с последующим элюированием. Изучение различных реагентов показало, что для элюирования протромбина эффективен только цитрат, тогда как другие вещества, связывающие кальций, удаляют инертные белки. Следовательно, для адсорбционной стадии очистки необходимо применять оксалатную, но не цитратную плазму (или плазму, лишенную кальция при помощи ионообменных смол).

Сиджерс с сотрудниками на основании правила фаз (растворимость не зависит от избытка насыщающего вещества) установил, что лучший их препарат протромбина состоял из одного компонента [297]. Препарат, обладающий $^4/_5$ активности лучшего препарата Сиджерса, был, как показали электрофоретические испытания, на 80—90% гомогенным и имел изоэлектрическую точку ниже 5,0 (по определению 4,8) [298]. Этот препарат содержал 4,6% тирозина, 3,3% триптофана, 0,96% серы и 4,3% углевода (реакция с орцинолом) [297]. Леки с сотрудниками недавно определили полный аминокислотный состав бычьего протромбина [299].

Леми и Во [300] опубликовали физико-химические характеристики очищенного Сиджерсом бычьего протромбина; они получили следующие данные: константа седиментации 4,84S, константа диффузии $6{,}24 \cdot 10^{-7}$, вязкость 0,041, парциальный удельный объем 0,70. На основании этих данных они вычислили молекулярный вес, оказавшийся равным 62 700, и отношение осей 3,7 (из данных по седиментации и диффузии) и 3,4 (из данных по вязкости). Таким образом, молекулы этого белка очень похожи по размерам, форме и величине изоэлектрической точки на молекулы альбумина.

Относительно специфическая адсорбция протромбина на солях щелочноземельных металлов, возможно, как-то связана с каталитическим действием кальция на процесс превращения протромбина в тромбин. Однако элюирующее действие цитрата, несоизмеримое с его способностью связывать кальций, делает возможным предположение об образовании цитратом комплекса непосредственно с протромбином. Сиджерс также придерживается этой точки зрения, но на основании совсем других данных; он установил, что при высоких концентрациях цитрата происходило превращение в тромбин его лучших препаратов протромбина [301]*.

Механизм превращения протромбина в тромбин до сих пор не выяснен, хотя и были разработаны теории, включающие более дюжины дополнительных компонентов. Краткий обзор некоторых из них дан в работе Олбриттона [302].

* Предполагают, что автокаталитическое превращение в тромбин в 25-процентных растворах цитрата натрия имеет протеолитический механизм, так как Леми и Во [300] наблюдали образование из гомогенного протромбина небольших неактивных и больших активных фрагментов.

В. Плазминоген

Фибрин легко переваривается различными протеолитическими ферментами. На этом основании делались попытки применять трипсин для растворения тромбов *in vivo* [303]. Плазма после соответствующей обработки содержит активный фибринолитический фермент (фибринолизин), который называется также плазмином, так как он обладает протеолитической активностью и по отношению к другим белкам, например к казеину [304]. Наиболее простой метод активации заключается в простом встряхивании плазмы с хлороформом, однако более активные препараты получаются при обработке плазмы бактериальным ферментом стрептокиназой [304].

Плазмин, подобно трипсину, обнаруживает оптимальную активность при pH, близких к 7. Однако он обладает, по-видимому, более специфическим действием, так как субстрат, на который этот фермент перестает действовать, далее расщепляется трипсином, но не наоборот [304].

Предшественник плазмина—плазминоген является одним из наименее растворимых белков плазмы и содержится в остатках после экстрагирования других компонентов, составляющих, по Кону, фракции I и II+III. Его изоэлектрическая точка, по-видимому, лежит в кислой области, так как он легче всего осаждается при pH, близких к 5. Поэтому его можно очистить после осаждения вместе с фибриногеном путем избирательного экстрагирования фибрина уксусной кислотой. Низкой растворимостью этого белка можно объяснить его хорошую адсорбируемость на бентоните и каолине [305], которая, к сожалению, не очень специфична.

Чрезвычайную устойчивость плазминогена по отношению к щелочам и кислотам (свойство, которым не обладает активированный фермент [304]) использовали для приготовления фракций с очень высокой активностью (в 425 раз больше активности сыворотки) посредством избирательной денатурации примесей [306]. Такие препараты, которые могут кристаллизоваться, впервые были получены экстракцией фракции III, по Кону, 0,05 *M* раствором H_2SO_4 с доведением pH до 11 в течение 3 мин. После нейтрализации до pH 5,3 и доведения pH до 2 главная масса белка удаляется из раствора в виде геля. Частично очищенный материал далее легко очищается фракционным осаждением при pH 6. Полученный таким образом материал обладает упомянутой выше активностью, которая не повышается при дальнейшей кристаллизации, осуществляемой в растворе, не содержащем солей, при pH 8 [306].

Функция плазминогена как литического агента по отношению к фибрину еще не доказана, и физиологический механизм активации не известен. Однако тот факт, что сгустки фибрина медленно

и самопроизвольно растворяются, создает уверенность в правильности предположения о наличии литической функции у этого белка.

6. ФЕРМЕНТЫ

Имеются сообщения [307] о наличии в плазме большого числа других ферментов, функция которых (в плазме) не известна*. Количества этих ферментов настолько незначительны, что Юз считает, что они в основном поступают из клеток, попадающих в кровь или непосредственно, или через лимфатическую систему. Действительно, если учесть непрерывно происходящее отмирание клеток, проницаемость клеток по отношению к плазменным белкам (см. раздел 1) и относительно небольшую величину молекул многих ферментов, то кажется удивительным, что в плазме не обнаружено большего количества ферментов. Имеются основания предполагать, что соответствующими аналитическими методами можно определить в плазме любой клеточный компонент и что необычайная чувствительность аналитических реакций на многие ферменты дает возможность положить начало такого рода определениям.

Не следует недооценивать важности исследований ферментов плазмы, так как необычные количества соответствующим образом выбранных компонентов плазмы приходится приписывать патологическим изменениям в клетках, которые являются источником этих компонентов и поэтому могут иметь большое значение для диагностики заболеваний. Связь между высоким содержанием в сыворотке кислой фосфатазы и карциномой предстательной железы может служить примером сказанного [308].

7. ГОРМОНЫ

Белки с гормональной функцией (гл. VIII) являются преходящими компонентами плазмы, молекулами на пути от места их образования (или хранения) к месту их использования. Классический способ демонстрации гормонального действия состоит в соединении кровотока двух индивидуумов и в наблюдении появления характерных реакций у одного животного при возбуждении другого**. Содержание гормонов в крови очень мало, и кровь является крайне бедным источником для их получения, и даже количественное определение их в крови может быть невозможным вследствие

---

* Церулоплазмин, рассмотренный выше, вероятно, является плазменным ферментом, как и некоторые компоненты комплемента. Следовательно, белки с ферментативными функциями могут находиться как среди компонентов защитных белков, так и среди компонентов, обусловливающих свертывание крови.

** Эту технику недавно использовал Вильямс [309] для демонстрации гормональной регуляции метаморфоза, наблюдаемого у насекомых.

неспецифических эффектов, обусловленных очень большими дозами, которые необходимо применять для этой цели.

Гормоны должны легко входить в кровоток и легко покидать его. Поэтому изучение размеров их молекул полезно для выяснения пористости капилляров. Молекулярные веса многих очищенных гормонов оказались значительно ниже молекулярных весов плазменных белков (см. гл. VIII), что находится в соответствии с приведенными выше рассуждениями.

Даже в случае инсулина, молекулярный вес которого вначале принимали равным 48 000, в дальнейшем было показано, что он с большой скоростью диссоциирует на частицы с молекулярным весом 12 000, причем каждая из них в действительности представляет димер из частиц с молекулярным весом 6000. Следовательно, в плазме, в которой содержание инсулина настолько мало, что не поддается количественному определению, едва ли происходит его агрегация. Другие осложнения, возникающие при использовании гормонов для исследования пористости капилляров, связаны с методами их получения в условиях, которые часто способствуют сильному гидролизу. Вследствие этого некоторые исследователи рассматривают изолированное вещество как «активный фрагмент». Можно сказать с уверенностью, что размеры частиц гормонов в кровотоке могут быть гораздо больше, чем это принято считать.

8. КОМПОНЕНТЫ, ФУНКЦИЯ КОТОРЫХ НЕИЗВЕСТНА

Кроме уже рассмотренных компонентов, из плазмы были выделены некоторые белки, функция которых еще не выяснена. Наиболее распространенными среди них являются гликопротеиды или мукопротеиды*. Дифференциация плазменных белков на основе содержания в них углеводов не очень удачна, так как все очищенные белки, за исключением альбумина, содержат гексозы, и большинство из них содержат также гексозамины**. Однако одни плазменные белки содержат значительно большие количества углевода, чем другие, так что фракционирование часто можно проследить, определяя содержание углевода.

---

* По Мейеру [310], гликопротеиды представляют белки, содержащие мукополисахариды, связанные с ними прочной химической связью, и менее 4% гексозамина. Мукопротеиды, обладая сходным составом, содержат более 4% гексозамина. Мейер полагает, что такая классификация условна, но все же отражает заметное увеличение растворимости в спирте с увеличением содержания углевода.

** В основе этого утверждения лежат следующие химические реакции: 1) при нагревании испытуемых веществ с кислотой получается фурфурол (эту реакцию дают пентозы и гексозы, что подтверждается известными реакциями с орцинолом и карбазолом) [311, 312]; 2) исследуемые вещества окрашиваются ацетилацетоном [313].

А. Альбумин, содержащий углевод (Мак-Микин [314])

Применяя сульфат аммония, Мак-Микин [314] выделил из сыворотки лошади «альбумин», содержащий углевод. Он назвал его альбумином, так как этот сложный белок при фракционировании находится с альбуминами, т. е. он растворим в 2 *M* $(NH_4)_2SO_4$. В этом отношении он подобен углеводсодержащим «альбуминам» Хевитта [315] и Кеквика [316] и отличается от серомукоида — истинного глобулиноподобного компонента. Альбумин Мак-Микина был выделен из маточных растворов, образующихся при кристаллизации альбуминов, и в окончательной стадии был получен в кристаллической форме (гексагональные пластинки), совершенно отличной от формы кристаллов альбумина лошади (длинные тонкие призмы). При электрофорезе в фосфатном буфере (pH 7,7 и Г/20,2) он ведет себя как гомогенный белок с подвижностью 5,0, что типично для α-глобулина. Этот компонент содержит 15,1% азота и 5,5% углевода и должен составлять значительную долю плазменных белков; возможно, что его содержание в несколько раз превышает количество (1% от общего белка), о котором сообщалось в литературе, вследствие неизбежных потерь, связанных с трудностью его выделения. Подобно серомукоиду, этот белок не коагулирует при нагревании при pH 4,8, но отличается от него тем, что осаждается 2-процентным раствором трихлоруксусной кислоты.

Б. Серомукоид (Раймингтон [318])

Многие мукопротеиды обладают замечательным свойством: они не коагулируют при нагревании в водных растворах. Это может объясняться или их необычной термостабильностью, или просто тем, что денатурированная форма их также растворима в воде. Последнее явление может быть следствием большого содержания углевода и сопутствующего ему большого числа кислотных групп, которые могут быть или остатками эфиров серной либо фосфорной кислоты углеводной части белка. (Диш установил, что гексуроновые кислоты не содержатся в плазме [317].)

Тепловая коагуляция белков плазмы является одним из первых методов изолирования сывороточных мукопротеидов и была детально исследована в некоторых отношениях Раймингтоном [318]. Он показал, что в плазме содержится по крайней мере два типа этих сложных белков: более растворимый (в водно-спиртовых растворах), содержащий большее количество углеводов, и менее растворимый (серомукоид), содержащий 11% углеводов, из которых половина

---

* Это отношение равно 1 молекуле глюкозамина на 2 молекулы гексозы (в яичном альбумине 2 молекулы глюкозамина на 4 молекулы маннозы) [319] и, по-видимому, является основной структурной единицей многих мукопротеидов [310].

приходится на долю глюкозамина*. Серомукоид (оптическое вращение $[\alpha] = -54°$), вероятно, является серогликоидом, изолированным Хевиттом [320].

В. Кислый гликопротеин (М1 по Винцлеру и Мелю)

Белки, остающиеся растворимыми после тепловой обработки, состоят из нескольких компонентов. Наиболее растворимый из них можно получить после удаления основной массы сывороточных белков с помощью менее сильно действующих осадителей, например 2,7 *М* раствора сульфата аммония при 4° [321] или 0,02 *М* раствора ацетата цинка в 19-процентном этиловом спирте при —5° [322]; при этом осаждается основная масса плазменных белков.

При использовании сульфата аммония очистка заключается в последовательном подкислении раствора, содержащего 2,7 *М* $(NH_4)_2SO_4$, до тех пор пока pH не достигнет значения 3,7, и соответствующем удалении образующихся осадков. Мукопротеид, остающийся при этих условиях в растворе, осаждают добавлением сульфата аммония до насыщения. Дальнейшая очистка состоит в повторном фракционировании сульфатом аммония при pH 3,7 [321].

По второму методу после осаждения основной массы белковых компонентов 0,02 *М* раствором ацетата цинка в 19-процентном этиловом спирте при pH 5,8 и температуре —5° остающиеся в растворе белки адсорбируются на гидроокиси цинка. Дальнейшая очистка заключается в растворении гидроокиси цинка водно-спиртовым раствором уксусной кислоты (pH 5,8) и осаждении примесей α_2- и β_1-глобулинов небольшими количествами ацетата бария. После этой процедуры белок получают в кристаллической форме в виде свинцовой соли [322].

Белки, изолированные обоими методами с выходами 0,5 *г/л* плазмы, по-видимому, идентичны во многих отношениях. При исследовании свойств этих белков две группы исследователей обменялись образцами. Эти свойства, по данным работ [321—323], указаны в табл. 34. Наблюдавшиеся различия в значениях констант седиментации, вероятно, обусловлены тем, что применялись разные ультрацентрифуги, а различия в изоэлектрических точках, возможно, объясняются неодинаковыми буферами, в которых производилось их определение; при этом было отмечено значительное специфическое влияние солей [322].

Белок М1 содержит приблизительно 30% углевода, который определяли в виде гексозы и гексозамина [321, 322]; в литературе имеются также данные о его полном аминокислотном составе. Однако крайне важный вопрос о том, с чем связаны

Таблица 34

СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМЫ

все данные, кроме особо отмеченных, относятся к плазме человека

Компонент	Концентрация в плазме, *г/л*	Молекулярный вес $\times 10^{-3}$	Длина молекулы, Å	Отношение осей	Удельный объем	$s_{20,w}$	Изоэлектрическая точка
Альбумины, $\mu = -5{,}9$[а] . .	43						
кристаллические альбумины	43	65	150	4 : 1	0,73	4,3	5,26
α_1-Глобулины, $\mu = -5{,}1$ . .	3						
α_1-мукопротеид	0,5	45		8 : 1	0,67	3,5	3
α_1-липопротеид	2	(200)	(300)		(0,84)	(5)	(5,2)
α_2-Глобулины, $\mu = -4{,}1$ . .	7						
Церулоплазмин	0,3	150					4,4
α_2-липопротеид	0,2						
фетуин (теленка) . . .		35					
(комплементы C_1 и C_2)							
β-Глобулины, $\mu = -2{,}8 \div -3{,}5$	11						
трансферрин	2,5	90	190	5 : 1	0,72		5,8
β-липопротеид	4	1300	185	1 : 1	0,95	7	5,4
протромбин (бычий) .	0,1	63		35 : 1	0,70		4,2
Ф и γ_1-Глобулины, $\mu = -2{,}1$	5						
фибриноген	3	330	700	20 : 1	0,72	8	(5)
(антигемофилический глобулин)							
изогемагглютинины . .		(500)				9	(6)
γ_2-Глобулины, $\mu = -1{,}0$ . .	9	150	240	6 : 1	0,74[в]	7	6,5—8
дифтерийный антитоксин	10^{-3}						
Общий белок плазмы . . .	78						

[а] Электрофоретические подвижности [67] и электрофоретические концентрации [344] найдены при проведении электрофореза в вероналовом буфере (pH 8,6, Г/2 0,1).

[б] Изоэлектрическая точка определена после «высаливания» и удаления жирных кислот при помощи ионообменных смол или посредством диализа и экстракции эфиром [68]. Вследствие связывания ионов изоэлектрическая точка заметно смещается солями (pH 4,7 в ацетатном буфере, Г/2 0,15).

[в] Парциальный удельный объем бычьего γ-глобулина 0,720 [343].

Примечание. Для этой таблицы взяты данные Перлмен и Кауфмана [344], поскольку они исследовали зависимость между концентрацией белка (степень разведения плазмы) и определяемыми количествами компонентов.

кислотные группы—с фосфором или серой,—остается нерешенным*. И, далее, если кислотные группы находятся в белке, то достаточно ли их число, для того чтобы объяснить крайне малое значение изоэлектрической точки белка; это кажется невозможным, если иметь в виду большое число основных групп в белке (30 на молекулу). Другое объяснение можно дать, исходя из явно выраженного сильного сродства молекул этого белка к анионам, о чем свидетельствует влияние солей на изоэлектрическую точку [322].

Этот мукопротеид, который обычно имеет подвижность α_1-глобулина [322, 327], может быть изолирован электрофоретически при pH 4,5; в этих условиях он несет заряд, противоположный по знаку остальным находящимся в растворе плазменным белкам [327]. Количества этого мукопротеида в плазме, определяемое электрофоретически, приблизительно соответствуют значениям, полученным химическими методами**.

Г. Фетуин

Возможность применения электрофореза как метода разделения белков с различным содержанием углеводов была изучена Бликсом с сотрудниками [157]. Полученные ими данные (содержание углеводов: 7% в α- и β-глобулинах против 3% в γ-глобулине и 1% в альбумине) указывают на наличие значительно большего количества гликопротеида в плазме, чем принималось ранее (действительно, пик, соответствующий кислому мукопротеиду, рассмотренному выше, мог перекрываться пиком, соответствующим альбумину, и не был принят во внимание при расчете общего углевода в плазме). Возможно, что наиболее интересным является распределение в широком интервале углеводов, найденных во всех изученных фракциях, за исключением альбумина.

Из сыворотки эмбриона быка, в которой белки с подвижностью

---

* Недавно было установлено [324], что кислотные группы этого белка не содержат ни фосфора, ни серы, а связаны с сиаликовой кислотой $C_{14}H_{24}NO_{11}$ [325], представляющей собой кристаллический углевод с эквивалентным весом 382, содержащий кислотные группы, полученный из муцина подчелюстной железы [325]. Эта кислота, идентифицируемая с помощью цветной реакции [326], содержится в белке в большом количестве.

** На электрофореграмме мукопротеидов, полученных путем осаждения кислотой основной массы плазменных белков, обнаруживаются два дополнительных компонента с более высокой изоэлектрической точкой, чем у изолированного α_1-мукопротеида. Этим объясняются затруднения, с которыми встретились Райминтон и Хевитт при получении гомогенных фракций после тепловой коагуляции основной массы белка.

Хох и Чанутин [328] обнаружили в недиализированной плазме компонент с большей подвижностью, чем у альбумина в 0,15-*M* растворе NaCl при pH 8 (или выше), в количествах 0,2—0,5% от общего количества белков плазмы

α-глобулинов являются главной составной частью [232], можно легко выделить такие компоненты. Педерсен [329] осаждал эти компоненты сульфатом аммония при 40—45% насыщения. При ультрацентрифугировании эта фракция оказалась относительно гомогенной, но обнаруженная существенная концентрационная зависимость указывает на значительную асимметрию частиц. Молекулярный вес этой фракции, по вычислениям Педерсена, равен 50 000, хотя Дейч недавно нашел меньшее значение, а именно 35 000 [330]. Эта фракция находилась в изоэлектрическом состоянии при pH 3,5 и содержала 12,5% азота и 0,6% фосфата [329]. По более новым данным, она содержит 9% углевода и 9% глюкозамина [330]. Эта фракция, по-видимому, не является кислым мукопротеидом (M1), но представляет собой M2 компонент Меля (анионная ветвь при электрофорезе сывороточного альбумина при pH 4,5). Эта фракция может быть также серомукоидом Раймингтона [318] и серогликоидом Хевитта [320].

Присутствие фетуина в крови эмбриона предполагает наличие значительного барьера в плаценте между кровотоком матери и эмбриона. Дальнейшим доказательством этого являются очень низкая концентрация альбумина [232] и отсутствие антител [331, 332]* в крови эмбриона быка. Существует значительное различие в сравнительной анатомии коровьей и женской плаценты [335, 336]. Барьер коровьей плаценты состоит из многих слоев клеток, а барьер женской плаценты представляет собой единичный слой клеток между кровотоками матери и эмбриона. Поэтому можно предполагать, что здесь наблюдаются те же явления проницаемости, которые можно ожидать в общей системе капилляров. В соответствии с этим у человека кровь матери и кровь эмбриона сходны по составу не только в отношении главных компонентов, как это подтверждается электрофоретически [337, 338], но даже в отношении содержания некоторых антител [339]. Такого рода проницаемость объясняет также чувствительность человеческих эмбрионов к Rh-фактору. Поскольку об относительной проницаемости белков через мембраны капилляров известно еще очень мало, нет необходимости подробно рассматривать здесь механизм активного переноса через мембрану плаценты.

У людей были отмечены некоторые различия в белковом составе плазмы крови матери и эмбриона. Так, концентрации α- и β-глобулинов нормально повышены у женщины в конце беременности и являются более высокими, чем у плода. Объясняется это наличием больших молекул у α- и β-глобулинов. Например, β_1-липопротеид имеет молекулярный вес 1 300 000 (см. стр. 339)

* Новорожденный теленок получает антитела из молозива, содержащего антиферменты, под действием которых абсорбция антител происходит до их переваривания [334] (абсорбцию γ-глобулина из молозива установили Гансен и Филлипс [333]).

и s_{20}-компонент плазмы обладает подвижностью α-глобулина. Ни один из этих белков не может проходить через мембрану плаценты.

Аналогичная картина наблюдается в случае распределения антител. Содержание антител с небольшими молекулами (молекулярный вес 150 000) в общем одинаково как в материнской плазме, так и в плазме плода в момент родов; антитела с большими молекулами, например изогемагглютинины (молекулярный вес 500 000), содержатся в значительно меньших количествах в плазме плода. Валквист [339] установил, что скорость перемещения белков в кровоток эмбриона может значительно изменяться на разных стадиях беременности: она возрастает по мере протекания беременности и, возможно, затем снова снижается к моменту окончания плодоношения. Это может объяснить некоторые противоречия в рассмотренной выше общей картине. Однако в кровоток эмбриона могут поступать антитела, синтезированные в ретикуло-эндотелиальной системе плаценты. Интересны исследования, проведенные с кроликами, показавшие, что гомологичные антитела быстро переносятся к эмбрионам [340]. Те же исследователи установили, что гетерологичный γ-глобулин переносится к эмбрионам значительно медленнее. Однако эти равновесия изучались при помощи реакции преципитации, и авторы не доказали специфичности применяемого ими гетерологичного белка по отношению к γ-глобулину. Гетерологичный белок исчезает из материнской крови чрезвычайно быстро; считают, что при этом он фагоцитизируется. Это предполагает большой молекулярный вес; поэтому применяемое для изучения распределения антитело может быть направлено против некоторых примесей, содержащихся в инъецированной γ-глобулиновой фракции*.

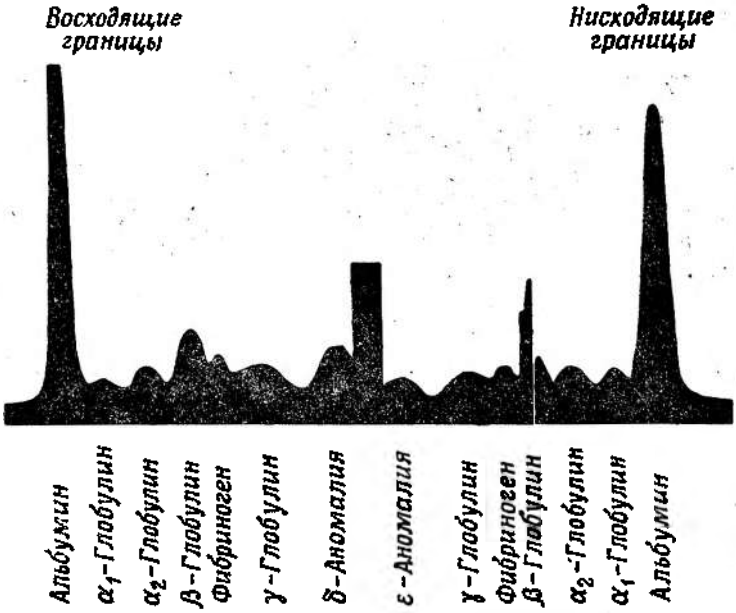
Д. Электрофоретические компоненты; теневая диаграмма

Со времени развития Тизелиусом электрофоретического анализа как количественного аналитического метода многие исследователи применяли этот метод для изучения плазмы и получили в общем согласующиеся между собой результаты [67] (см. также т. II, гл. IV). Ряд исследователей в настоящее время предпочитает проводить электрофорез в вероналовом (диэтилбарбитурат натрия) буфере с ионной силой 0,1 и pH 8,6, так как в этом случае осуществляется полное отделение α_1-глобулина от альбумина (рис. 27)**. Однако Хох показал, что удовлетворительные результаты получаются также и с фосфатным буфером, имеющим pH 8,8 и ионную силу 0,15. Отметим, что фибриноген (Ф) фиксируется на электрофореграмме между

* На более ранних стадиях беременности могут иметь место и другие пути распределения белков между кровотоками матери и эмбриона [341].

** См. также т. II, гл. IV

β- и γ-глобулинами, маскируя тем самым β_2- или γ_1-компонент. Для некоторых видов млекопитающих появляются дополнительные компоненты, из которых были уже упомянуты Т (γ_1)-глобулин гипериммунной лошадиной сыворотки и менее подвижный γ-компонент гипериммунной кроличьей сыворотки [203]. Другими компонентами, проявляющимися при электрофорезе, являются α_3-глобулины плазмы обезьяны, кошки, морской свинки [342] и теленка



Р и с. 27. Электрофореграмма плазмы здорового человека (вероналовый буфер, pH 8,6, ионная сила 0,1).

[229] и компонент, содержащийся в плазме человека в небольших количествах (менее 0,5% от общего количества белка), имеющий большую подвижность, чем альбумин.

В этом разделе уместно суммировать имеющиеся данные о белковых компонентах плазмы, распознаваемых химическими методами, и сопоставить с электрофоретическими подвижностями, чтобы установить, какие белки соответствуют электрофоретическим компонентам и какие из последних все еще не идентифицированы химически. Из табл. 34 можно сделать следующие выводы:

1. Очевидно, весь альбуминовый компонент (43 *г/л*) соответствует кристаллическим альбуминам (или настолько родственным им веществам, что они дают перекрестные иммунологические реакции). Однако в случае других компонентов подобные перекрестные

реакции с антиальбуминовой сывороткой не наблюдались [199]. Компоненты, содержащиеся только в виде следов, например компонент Хоха, конечно, можно легко потерять вследствие несовершенства экспериментальной методики.

2. Основная масса α_1-компонента (3 *г/л*) может представлять собой α_1-липопротеид плюс α_1-мукопротеид. Величина для α_1-липопротеида 2 *г/л* была вычислена Юзом по данным Пэйджа, Льюиса и Грина [170] с точностью до 50% вследствие значительных отклонений отдельных числовых значений, полученных указанными авторами.

3. α_2-Протеины (7 *г/л*) в большинстве своем не идентифицированы; известные компоненты составляют менее 1 *г/л*. α_2-Глобулины, по-видимому, содержат значительное количество углевода, а гликоили мукопротеиды, вероятно, представляют собой средние члены этой группы белков.

4. β_1-Глобулины (11 *г/л*) состоят в значительной части из β-липопротеида и трансферрина, хотя часть компонентов (приблизительно 4 *г/л*) все еще не идентифицирована.

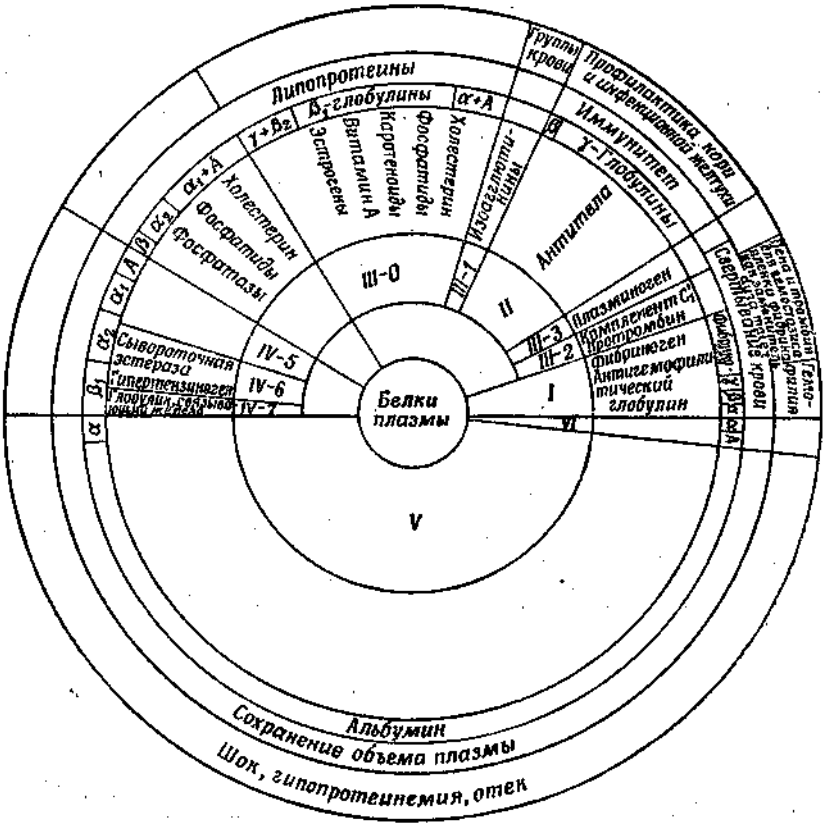
5. Фибриноген нельзя отделить (электрофоретически) от γ_1- (или β_2-) глобулинов. Однако γ_1-глобулин можно обнаружить [228] после свертывания фибриногена. Этот компонент, подобно γ_2-глобулину, содержит антитела. От γ_2-глобулина он отличается содержанием преимущественно агглютинирующих антител, таких, как изогемагглютинины и тиофоидный О агглютинин [156].

6. γ_2-Глобулины (γ-глобулины) (9 *г/л*) содержат подавляющее большинство антител плазмы, и понятно, что в эту электрофоретическую группу глобулинов в основном входят иммунные белки. Однако компоненты, идентифицированные таким образом, например дифтерийный антитоксин (10^{-3} *г/л*), составляют ничтожно малую часть γ_2-глобулинов.

9. ПРИЛОЖЕНИЕ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ПЛАЗМЫ

Большинство технических приемов, применяемых для изолирования белков, предназначено для получения одного какого-либо белка. Однако особый интерес представляют систематические методы, дающие возможность выделять одновременно несколько компонентов. Наряду с экономией материала такие методы, при которых особое внимание обращается на выходы (или сохранение специфической активности) и степень достигаемого разделения компонентов, являются особенно полезными для разработки оптимальных условий фракционирования. Изучение взаимодействия белков друг с другом, необходимое при разработке таких методов, может также пролить свет на природу взаимодействия белков *in vivo*.

Но даже в том случае, когда требуется получить какой-либо один компонент, необходимо изучать сопровождающие компоненты, поскольку чистоту получаемого белка можно определить, только установив отсутствие специфических примесей. Кроме того, вследствие сложности и лабильности белков следует всегда принимать



Р и с. 28. Белки плазмы: их естественные функции, клинические применения и разделение на фракции.

меры предосторожности против возможных тонких структурных изменений, могущих происходить в процессе выделения белка. Вследствие ограниченных данных о структуре белков доказательства отсутствия структурных изменений должны выводиться главным образом на основании косвенных данных. Лучше всего основываться на количественном сохранении всех свойств компонента, которые могут быть определены. Заключение будет более надежным,

если при этом установлено, что активность других лабильных компонентов также не изменилась в процессе фракционирования.

Несмотря на указанные выше преимущества, систематическое фракционирование такой сложной системы, как плазма, является настолько трудоемким, что попытки его осуществления предпринимались редко, до тех пор пока экономические соображения не побудили заняться фракционированием человеческой плазмы в больших масштабах. В настоящее время из плазмы крови человека можно получать альбумин для лечения шока и альбуминовой недостаточности, γ-глобулин—для предотвращения и профилактики

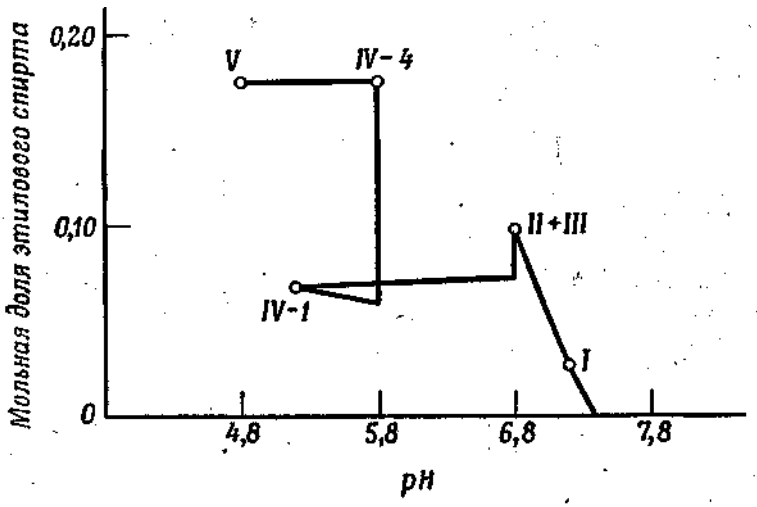


Рис. 29. Метод 6.

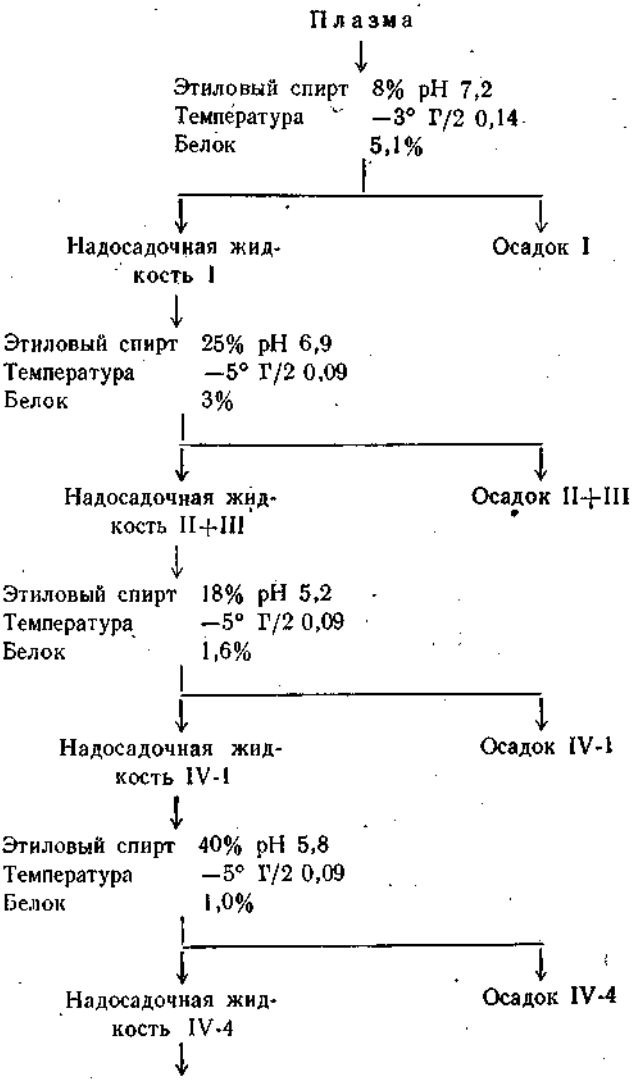
некоторых инфекционных заболеваний, изогемагглютинины—для определения типа крови, тромбин—для ускорения свертывания крови в открытых ранах, фибриноген—для лечения гемофилии (вероятно, его эффективность обусловлена примесью «антигемофильного глобулина») и для приготовления сгустков фибрина, которые обладают полезными для хирургии пластическими свойствами, а также ряд других клинически полезных компонентов [345] (рис. 28).

Систематическое фракционирование плазмы производится в области высаливания белков при помощи концентрированных растворов солей и вне области высаливания при помощи органических растворителей или некоторых осаждающих ионов, таких, как ионы тяжелых металлов, и больших анионов. Для краткости рассмотрим здесь наиболее детализированный метод (методы 6 и 9 в схеме фракционирования по Кону), который представлен на схемах 1 и 2 и на рис. 29, а затем обсудим кратко преимущества и недо-

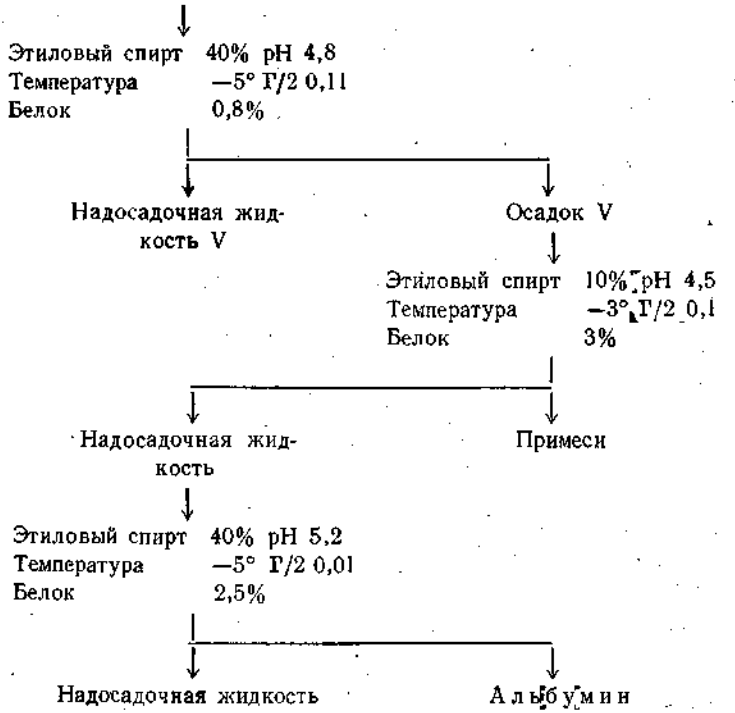
статки других методов по сравнению с этой основной схемой фракционирования. Эта задача упрощается тем, что большинство компонентов плазмы обнаруживает сходные относительные растворимости при различных схемах фракционирования, поэтому при обсуждении этих методов можно сосредоточить внимание главным образом на выходах и сохранении биологической активности.

Таблица 35а

СХЕМАТИЧЕСКОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ МЕТОДА 6 (СХЕМА 1)



Продолжение



Первоначальная схема фракционирования спиртом, по Кону, заключалась в разделении ряда белковых фракций с последовательно понижающимися изоэлектрическими точками путем соответствующего понижения pH среды, начиная от нейтральной точки (схема 1). Для достижения наилучших условий фракционирования на каждой стадии должны изменяться соответствующим образом концентрация спирта и ионная сила. Фракционирование следует проводить после электрофоретического анализа (который характеризует белковую систему с точки зрения суммарного заряда составляющих ее компонентов и, следовательно, дает возможность идентифицировать компоненты по их изоэлектрическим точкам). При этом методе фракционирования взаимодействие между белками, которое наиболее сильно выражено, когда белки несут противоположные электрические заряды, должно сводиться к минимуму, так как все белки в этом случае отрицательно заряжены, за исключением осаждаемого белка, который имеет нулевой заряд.

Эффективность этого метода зависит, конечно, от того, насколько отчетливо выражена последовательность минимумов растворимости различных компонентов при изменении pH; эта последовательность, как видно из схемы 1, не выдерживается для первой фракции; входящий в ее состав фибриноген с относительно низкой изоэлектрической точкой вследствие очень низкой его растворимости осаждается прежде всего даже при наличии на его частицах электрических зарядов. Остальные фракции осаждаются в ожидаемом порядке, хотя полное разделение электрофоретических компонентов при этом не достигается. Значительные количества β-глобулинов осаждаются с γ-глобулином в фракциях II+III, остальные β-глобулины осаждаются с α-глобулинами в фракциях IV-1 и IV-4.

Таким образом, схема фракционирования по методу 6 в окончательном варианте приспособлена для осаждения: в фракции I — по возможности всего фибриногена и минимальных количеств антител; в фракциях II+III—главным образом всех антител (включая изогемагглютинины), эта фракция содержит также β_1-липопротеид; в фракции IV-1—остальных липопротеидов (в основном α-глобулинов). Следует отметить, что здесь правило ступенчатообразного повышения кислотности нарушается: следующую фракцию IV-4 осаждают при более высоком значении pH. Такое отклонение объясняется тем, что α-липопротеиды осаждаются в более щелочной среде только при таких концентрациях спирта, при которых этот липопротеид сильно денатурируется. Для удаления остающихся глобулинов при минимальном осаждении альбумина введена фракция IV-4; фракция V содержала основную массу альбумина и некоторое количество мукопротеида (α_1- и α_2-мукопротеиды).

А. Метод 6

Плазму, для которой был разработан этот метод, получали из крови человека, собираемой при кровотечениях; при этом 500 *мл* крови смешивают с 50 *мл* 4-процентного раствора цитрата натрия. Можно применять и другие разбавители. Плазму осторожно, но тщательно перемешивают и по возможности быстро охлаждают до 0°; при этом следует избегать образования льда. Перемешивание продолжают до тех пор, пока не будет добавлено достаточное количество ацетатного буфера в 53,3-процентном (измерено при 25°) водном растворе этилового спирта. Этот раствор добавляют тонкими струйками из капиллярных насадок до тех пор, пока pH не достигнет значения $7{,}2 \pm 0{,}2$, а конечная концентрация этилового спирта в системе — 8%. Буферную смесь добавляют со скоростью 80—100 *мл/мин* на капиллярный спуск; в целом вся операция должна продолжаться около полутора часов. В процессе прибавления буферной смеси температура должна опускаться так, чтобы система находилась около точки замерзания, а по окончании про-

цесса ее температура лежала между —2,5 и —3°. В первой стадии процесса требуется 0,177 *л* (измерено при —5°) 53,3-процентного этилового спирта на каждый литр плазмы (измеренной при 0°). Для достижения необходимого значения pH на каждый литр плазмы достаточно прибавить 1 *мл* 0,8 *М* раствора ацетата натрия, pH которого доведен до 4,0 уксусной кислотой. Отношения числа молей ацетата к числу молей уксусной кислоты в этом буфере равно 0,2. Его готовят разбавлением смеси 200 *мл* 4 *М* раствора ацетата натрия и 400 *мл* 10 *М* раствора уксусной кислоты водой до 1 *л*. При разбавлении полученного раствора водой в 8 раз буферный раствор должен иметь pH, равный $4{,}00 \pm 0{,}02$, если измерения производить стеклянным электродом при 25°.

Осадок I состоит главным образом из фибриногена; его удаляют центрифугированием при температуре между —2 и —3°.

Затем к надосадочной жидкости I добавляют холодный 53,3-процентный этиловый спирт, содержащий ацетатный буфер, до тех пор пока содержание спирта в системе не достигнет 25%, а pH не станет равным приблизительно 6,9. Как и раньше, применяют капиллярные насадки; скорость прибавления должна быть равна приблизительно 100 *мл/мин* на насадку; выполнение всей операции занимает около 5 час. В процессе добавления спиртового раствора температуру системы поддерживают вблизи точки замерзания и, как только она достигает —5°, поддерживают на этом уровне до тех пор, пока не будет добавлено все необходимое количество спиртового раствора. На этой стадии фракционирования к надосадочной жидкости I добавляют спиртовую буферную смесь, приготовленную смешиванием 601 *мл* 53,3-процентного этилового спирта при —5°, 0,88 *мл* 10 *М* раствора уксусной кислоты при 25°, 0,44 *мл* 4 *М* раствора ацетата натрия при 25°, 2,30 *мл* 95-процентного этилового спирта на каждый литр. Молярное отношение ацетата натрия к уксусной кислоте в буфере, применяемом на этой стадии процесса, равно 0,2. Если до прибавления 53,3-процентного этилового спирта этот буферный раствор разбавляют водой в 80 раз, то он должен иметь pH, равный $4{,}00 \pm 0{,}02$ при 25°. Не делалось никаких попыток изменять состав буфера так, чтобы приводить систему к точному значению pH и в действительности в результате изменений концентрации двуокиси углерода реакция системы изменялась на несколько десятых единицы pH. В результате добавления буфера на двух стадиях процесса в систему вносилось 14 *мэкв* уксусной кислоты на каждый литр плазмы.

Осадок II+III отделяется от надосадочной жидкости I центрифугированием при —5°. Как показывают электрофоретические измерения, он содержит главным образом β- и γ-глобулины. В его состав входят почти все иммунные глобулины и изоагглютинины. Почти весь протромбин и плазминоген осаждаются в этой фракции. Осадок II+III содержит также большое количество

холестерина и других липидных веществ. Дальнейшее фракционирование осадка II+III рассмотрено в следующем разделе (метод 9).

pH надосадочной жидкости II+III доводится до значения 5,2± ±0,1, а содержание в ней этилового спирта—до 18% добавлением воды и ацетатного буфера. Эту процедуру производят в две стадии: 1) на каждый литр надосадочной жидкости II+III добавляют 311 *мл* воды (измерено при 0°) со скоростью 400 *мл/мин* на насадку и поддерживают температуру жидкости постоянной при —5°; 2) добавляют 78 *мл* воды (измерено при 0°) на каждый литр надосадочной жидкости II+III и такое количество ацетатного буфера, которое необходимо для понижения pH до 5,1±0,2; молярное отношение ацетата натрия к уксусной кислоте в этом буфере равно 0,2. Необходимое количество буфера определяют предварительным титрованием. Скорость добавления 100 *мл/мин* на насадку. Температуру поддерживают при —5°.

После окончания этой операции систему перемешивают в течение часа и оставляют стоять при —5° на 6—8 час. для более полного осаждения.

Осадок IV-1 отделяют от надосадочной жидкости II+III центрифугированием при —5°; как показывают электрофоретические измерения, она состоит главным образом из α-глобулина и значительного количества липидного вещества. Этот богатый липидом α-глобулин легко денатурируется при хранении системы при низких значениях pH и высокой концентрации спирта даже при низких температурах. Если эту фракцию желательно хранить в растворимой форме, то ее следует разбавить водой приблизительно в 4 раза при pH 6, затем заморозить и тотчас высушить в замороженном состоянии. Хотя эта фракция богата липопротеидами, она может растворяться в воде при pH ~6 и высушенная из замороженного состояния дает легко растворимый в воде материал. Однако если эту фракцию сохраняют в течение длительного времени при низкой температуре в виде пасты или в виде замороженного раствора, то часть белка становится нерастворимой.

После отделения осадка pH надосадочной жидкости IV-1 доводят до 5,80±0,05, ионную силу—до значения 0,09 *М*, а концентрацию этилового спирта—до 40% при —5°. Буфер добавляют в течение 30 мин. или более, причем все время поддерживается температура —5°. (На каждый литр надосадочной жидкости добавляют смесь, содержащую 1,14 *г* бикарбоната натрия, 7,90 *мл* 4 *М* раствора ацетата натрия и такое количество воды, чтобы объем раствора был равен 77 *мл*. Если предварительным титрованием установлено, что эта смесь непригодна для получения соответствующего значения pH, то следует изменить определенным образом отношение концентрации бикарбонатных ионов к концентрации ацетатных ионов, сохраняя неизменной общую концентрацию ионов натрия.

Если осаждение фракции производят при pH 6,2, то выход альбумина в осадке V несколько возрастает, но чистота и устойчивость его уменьшаются.) После этого концентрацию этилового спирта в системе доводят до 40% прибавлением 456 *мл* холодного 95-процентного спирта на каждый литр надосадочной жидкости IV-1; температуру поддерживают постоянной (—5°).

Осадок IV-4 отделяют от надосадочной жидкости IV-1 центрифугированием при —5°. Электрофоретическими измерениями установлено, что он состоит главным образом из α- и β-глобулинов и некоторого количества альбумина. Эстеразная активность плазмы в основном связана с этой фракцией, как и некоторая гипертензиногенная активность. Гипертензиногенная активность, обнаруживаемая в осадке IV-4, представляет собой часть активности, которая не уничтожается 40-процентным этиловым спиртом при —5°. Осадок можно растворить в холодной воде и высушить в замороженном состоянии.

Предварительные опыты показали, что количественное осаждение гипертензиногена из надосадочной жидкости IV-1 может быть достигнуто при концентрации этилового спирта 25% и pH 4,8. Осадок IV-4, образовавшийся при этих условиях, содержит весь альбумин, обычно находимый в осадке V. Проводится экспериментальная работа по подбору условий, при которых можно разделить альбуминовую и глобулиновую фракции.

Надосадочная жидкость после центрифугирования содержала небольшое количество суспендированного материала, и поэтому ее очищали фильтрованием. Для этого в надосадочной жидкости суспендировали промытую стандартную Super-Cel (в количестве 0,5%), суспензию фильтровали при —5° через специальные фильтры (Republic S-1), предварительно покрытые стандартным Super-Cel, после чего их промывали. Для устойчивости получаемого альбумина существенно, чтобы фильтрат был прозрачным и давал только слабый конус Тиндаля.

После осветления все фильтраты и промывные жидкости соединяли и pH полученного раствора понижали до 4,8 добавлением ацетатного буфера, при постоянных температуре (—5°) и концентрации этилового спирта (40%). Буфер добавляли в течение приблизительно 2 час., после чего систему оставляли стоять по крайней мере на 3 часа. При добавлении буфера температуру поддерживали между —5 и —6°. Буфер готовили следующим образом: на каждый литр прозрачной жидкости брали 5,0 *мл* 10 н. уксусной кислоты, 2,5 *мл* 4 н. ацетата натрия, 10,5 *мл* 95-процентного этилового спирта и добавляли воду до объема 25 *мл*.

Осадок V содержит основную массу альбумина, находящегося в плазме человека. По электрофоретическим измерениям (pH 8,6, барбитуратный буфер с ионной силой 0,1) в осадке содержится менее 3% α-глобулина и менее 0,5% β-глобулина. Осажденный

белок отделяют центрифугированием или фильтрованием при температуре между —5 и —6°. Надосадочная жидкость V должна быть почти прозрачной и содержать не более 1% плазменного белка в виде альбумина.

Для некоторых клинических применений полезно уменьшать содержание электролитов в альбумине до минимума и удалять примеси, понижающие его стабильность. В противном случае конечный продукт в виде 25-процентного раствора мутнеет при нагревании при 50° и в нем образуются видимые частицы.

Осадок V, полученный центрифугированием, представляет собой пасту, в 1 *л* которой содержится около 250 *г* белка, 0,045 моля ацетата натрия, 0,075 моля уксусной кислоты и 0,035 моля солей из плазмы, 85% которых составляет NaCl.

Очистку производят удалением веществ, нерастворимых в 10-процентном этиловом спирте при концентрации соли 0,01 *М*, температуре (—2°)—(—3°), pH 4,5—4,7 и концентрации белка 3%. Осадок V растворяют в 6 объемн. ч. воды при 0° и к раствору прибавляют 1 объемн. ч. 53,3-процентного спирта в течение ~2 час. При этом температуру понижают до (—2°)—(—3°). Получающийся мутноватый раствор осторожно, но тщательно перемешивают в течение ~2 час., после чего фильтруют.

Для сохранения и использования альбумина, полученного из некоторых загрязненных плазм или из плазм, содержащих значительное количество неустойчивых примесей, желательна его дальнейшая очистка. В этом случае концентрацию этилового спирта следует повысить от 10 до 15%, а температуру понизить до —5°. Образующийся при этом осадок удаляют, раствор фильтруют и альбумин осаждают, как обычно. При этой процедуре некоторое количество альбумина теряется, но конечный продукт получается значительно более чистым. Если с бросовым осадком снова повторить описанную выше процедуру, то можно до некоторой степени уменьшить потери.

Альбумин осаждается из фильтрата при повышении концентрации этилового спирта до 40% и понижении температуры до —5°; чтобы свести к минимуму абсорбцию уксусной кислоты осадком, повышают pH до значения 5,2 добавлением бикарбоната натрия в количестве, достаточном для повышения pH до 5,0—5,2; затем прибавляют к каждому литру фильтрата 545 *мл* холодного 95-процентного этилового спирта в течение 2 час. при —5°.

Неблагоприятные условия создаются также в том случае, если осаждение альбумина происходит при концентрации соли ниже 0,001 *М*. Добавление этилового спирта при pH 4,8 приводит к образованию коллоидально-диспергированного осадка, который плохо отделяется центрифугированием. Прибавление электролита для усиления агрегации в этом случае оказывается менее эффективным, чем добавление его до повышения концентрации спирта.

Альбумин отделяют центрифугированием или фильтрованием при температуре от —5 до —6° и высушивают из замороженного состояния при возможно более низкой температуре. Электрофоретический анализ при pH 8,6 показал, что альбумин, полученный по этому методу, содержит менее 3% примесей глобулинов. Растворы альбумина в 0,04 *М* растворе ацетилтриптофана, содержащие до 25% белка, pH которых доведен до 6,8 добавлением бикарбоната натрия, выдерживают нагревание при 50° в течение нескольких месяцев без образования частичек или заметного усиления мутности. Это испытание очень чувствительно на наличие неустойчивых примесей и поэтому отражает качество фракционирования. При температуре 57° растворы альбумина теряют свою прозрачность только после 100-часового нагревания. Это испытание является наиболее чувствительным для оценки устойчивости самого альбумина и поэтому показывает, насколько осторожно проводился весь процесс фракционирования. При нагревании раствора в течение 10 час. при 60° не происходит видимых изменений. В 25-процентном растворе альбумина, приготовленном, как описано выше, содержание натрия должно быть менее 0,33 *г* на 100 *мл* раствора.

Если в исходной системе все белки заряжены положительно, то фракционное осаждение можно проводить путем постепенного снижения pH до значений, соответствующих нейтральной среде. Однако низкие значения pH (ниже 4,5), необходимые вначале при фракционировании плазмы, вероятно, вредны для многих белков и для фракций плазмы (например, II и III, содержащих белки с более ограниченной областью изоэлектрических точек), для выделения которых требуются более высокие значения pH, можно разработать совершенно другую схему фракционирования. Дальнейшее разделение производится при низких ионных силах, которые могут быть достигнуты в отсутствие плазменных солей.

Так, по окончательно разработанному варианту метода 9 (схема 2) фракции II+III, получаемые по методу 6, экстрагируются сначала при очень низкой ионной силе в нейтральной среде для отделения β_1-липопротеида (фракция III-0); остающиеся в растворе β-глобулины затем осаждаются при pH 5,2 из 17-процентного раствора этилового спирта при $\Gamma/2$ 0,015; очищенные γ-глобулины осаждаются в нейтральной среде этиловым спиртом.

Б. Метод 9

В качестве исходного материала в этом случае применяют осадок II+III, полученный по методу 6. Каждый килограмм этого осадка суспендируется в 2 *кг* воды, содержащей лед (приблизительно $^1/_4$ объема воды должна быть заморожена и находиться в виде очень мелких кристаллов льда). Если эта суспензия достаточно однородна, то прибавляют 3 *кг* воды, охлажденной до 0°,

к которой приливают 112 *мл* 0,5 *М* раствора Na_2HPO_4 (pH 9,2). Эту суспензию медленно перемешивают и выдерживают при температуре 0° до полного растворения всех комочков и образования почти прозрачного раствора. После этого суспензию вливают в 20 *кг* охлажденной до 0° воды и медленно перемешивают при 0° в течение 30—60 мин. Полученная суспензия должна иметь pH 7,2±±0,2. К суспензии добавляют при возможно более низкой (до —5°) температуре 15 *л* 53,3-процентного этилового спирта; при этом концентрация его во всей системе достигает 20%. Эту суспензию до центрифугирования осторожно помешивают в течение нескольких часов при —5°. Центрифугирование проводят со скоростью 30 *л/час*.

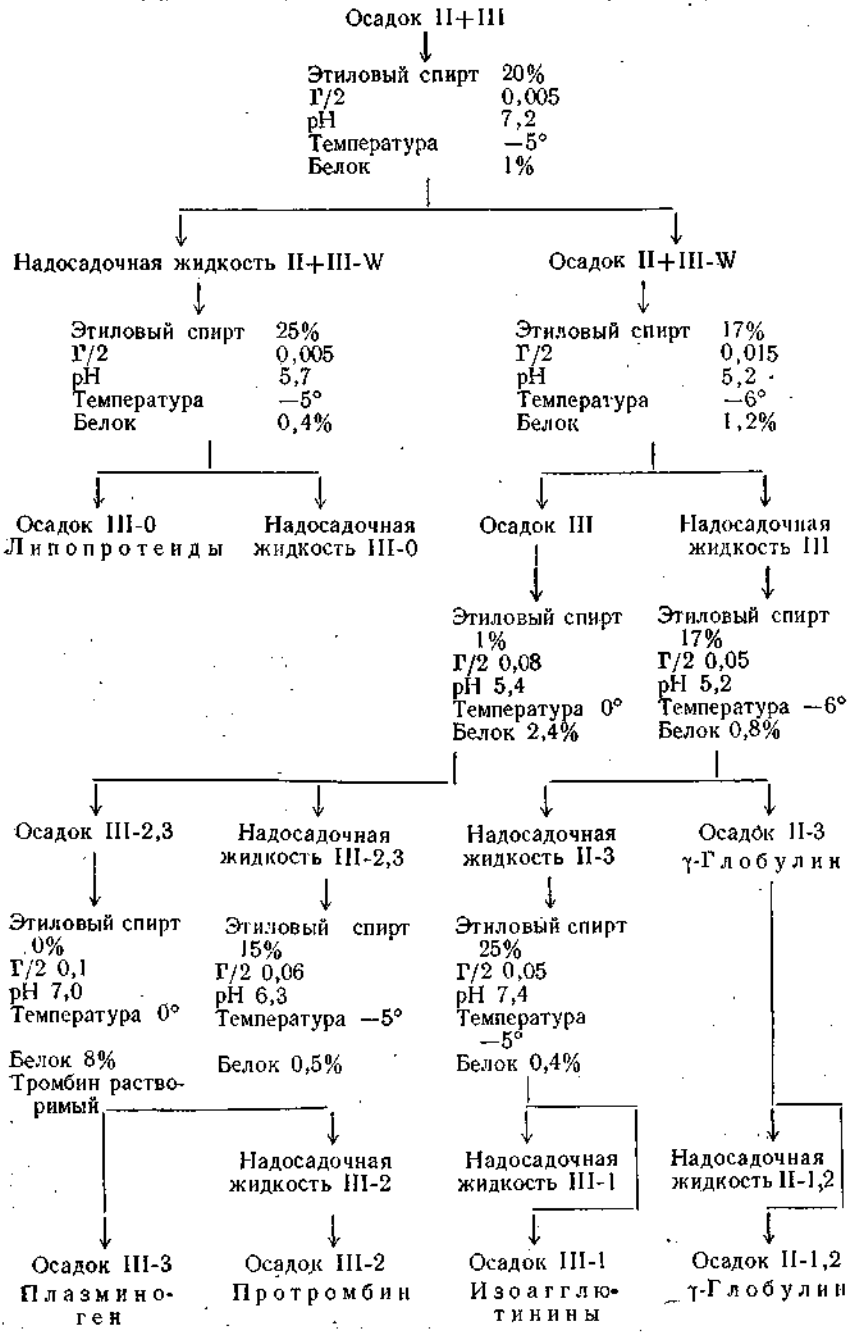
Осадок III-0 содержит основную массу липоида и каротиноидного пигмента, первоначально находившихся в осадке II+III. Он осаждается из надосадочной жидкости II+III-W при доведении ее pH приблизительно до 5,7 добавлением кальциевого ацетатного буфера (pH 4,0) и увеличением содержания этилового спирта до 25%. Буфер (разбавленный в 80 раз) тот же, что и применяемый для фракционирования плазмы, но ацетат натрия заменен ацетатом кальция. Его готовят из 0,4 *М* раствора уксусной кислоты и 0,4 *М* раствора ацетата кальция. Эту суспензию выдерживают в течение приблизительно 48 час. при —5°, после чего ее центрифугируют со скоростью около 20 *л/час*. В настоящее время мало известно об условиях хранения этой фракции или ее возможном применении, поэтому надосадочную жидкость II+III-W приходится отбрасывать; можно надеяться, что в дальнейшем будут разработаны способы ее использования.

Осадок II+III-W содержит практически все γ-глобулины, изоагглютинины, плазминоген и протромбин, находившиеся первоначально в осадке II+III. Содержание в нем холестерина и каротиноидного пигмента очень невелико; бóльшая часть компонента, обусловливающего депрессорную активность, удалена. Осадок должен составлять приблизительно 60% исходной пасты II+III, получаемой из нормальной плазмы, и содержать, как показывает электрофорез, при pH 8,6 50—55% γ-глобулина.

Осадок II+III-W вновь суспендируют в ацетатном буфере и доводят pH суспензии до 5,2, ионную силу—до 0,015, а концентрацию этилового спирта—до 17%. Это достигается суспендированием осадка II+III-W в воде со льдом (на каждый килограмм осадка II+III-W 2 *кг* воды и льда) и затем добавлением 2 *кг* холодной воды, содержащей 0,35 моля ацетата натрия. К готовой суспензии приливают необходимое количество ацетатного буфера (pH 4), разбавленного холодной водой (1 *л* на каждый килограмм осадка II+III-W), для снижения pH суспензии до 5,2±0,1. Суспензию перемешивают в течение нескольких часов. Затем прибавляют 13,5 *л* холодной воды и после этого 8,66 *л* 53,3-процентного

Таблица 35б

СХЕМАТИЧЕСКОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ МЕТОДА 9 (СХЕМА 2)



этилового спирта на 1 *кг* осадка II+III-W для повышения концентрации спирта до 17%. При добавлении спирта температуру следует понижать так, чтобы она была близка к точке замерзания суспензии, но не ниже —6°. Осадок отделяют центрифугированием со скоростью приблизительно 30 *л/час* при температуре —6,0±0,5°. Надосадочная жидкость III, полученная в результате этого центрифугирования, после фильтрования при —6,0±0,5° становится прозрачной.

Осадок III содержит изоагглютинины, плазминоген и протромбин. Он сохраняется при —5° в течение 2 недель без заметной потери протромбина, но его следует подвергать дальнейшей обработке по возможности быстро, чтобы превратить протромбин в тромбин для предотвращения потери активности, свойственной тромбину.

Осадок III суспендируют в смеси воды и льда (2 *кг* воды на 1 *кг* осадка) и затем разбавляют 2 *кг* ацетатного буфера, охлажденного до 0° и имеющего pH 5,4 и ионную силу 0,5. Эту суспензию перемешивают до однородного состояния и затем разбавляют 7,5 *кг* холодной (0°) воды. Суспензия должна иметь pH 5,4, ионную силу 0,08 и температуру от 0 до +1°; ее следует перемешивать в течение нескольких часов. Осадок отделяют центрифугированием при относительно малом числе оборотов при температуре от 0 до +1°.

Осадок III-2,3 содержит протромбин, плазминоген и небольшие количества фибриногена, который не был удален с осадком I. Этот осадок следует суспендировать по возможности быстро в воде при 0° (1 *кг* осадка на 1 *л* воды) и довести pH суспензии до 6,7—7,0 при помощи глицинового буфера. (Глициновый буфер готовят из раствора глицина, который на 50% нейтрализуется гидроокисью натрия. В 1 *л* применяемого раствора содержатся 1 моль глицина и 0,5 моля гидроокиси натрия. Он имеет pH ~9,5. Преимущества этого раствора заключаются в том, что при его применении pH смещается при аэрации в меньшей степени, чем в том случае, когда для увеличения щелочности раствора применяют бикарбонат натрия.) Затем прибавляют 1 *л* воды (0°), содержащей такое количество NaCl, чтобы ионная сила всей системы составляла 0,1. После перемешивания в течение 1—2 час. испытывают раствор на образование тромбина и берут пробу, чтобы удостовериться, свернулся ли фибриноген. Для этого центрифугируют небольшое количество суспензии, к центрифугату добавляют тромбин и наблюдают, не образуется ли дополнительное количество фибрина. Если свернулся весь фибриноген, то дополнительное количество тромбина не добавляют. Если же в растворе еще имеется фибриноген, то добавляют столько тромбина, чтобы общее его количество (включая уже добавленное) составляло 10 000 единиц на 1 *кг* осадка III-2,3. Перемешивают суспензию еще в течение часа и центрифугируют при 0° в течение приблизительно часа в периодически действующей цен-

трифуге; если необходимо непрерывное центрифугирование, то последнее производят при очень малых скоростях.

Надосадочную жидкость III-2 можно непосредственно высушить, если желательно получить протромбин, или немедленно, до сушки, протромбин превращают в тромбин. Для этого превращения к системе добавляют хлорид кальция и тромбопластин и повышают температуру до 20—25°. Раствор осветляют, стерилизуют и высушивают.

Осадок III-3, получаемый при центрифугировании раствора, отделенного от осадка III-2,3, после добавления тромбина представляет собой волокнистый материал, содержащий значительные количества плазминогена. Его суспендируют в растворе NaCl и $NaHCO_3$ так, чтобы суспензия имела ионную силу 0,15 и pH $7{,}1 \pm 0{,}1$. Полученную суспензию выдерживают при 0° до тех пор, пока весь фибрин не подвергнется лизису. После осветления и стерилизации этот материал может быть высушен в замороженном состоянии.

pH надосадочной жидкости III-2,3 доводят до значения 6,3 добавлением бикарбоната натрия (для этого требуется приблизительно 20 *мл* 1 *М* раствора бикарбоната натрия на 1 *кг* надосадочной жидкости), после чего добавляют равный объем 30-процентного этилового спирта (концентрация спирта во всей системе будет равна 15%); при этом температура системы должна быть близка к точке замерзания; после понижения температуры до —5° необходимо ее поддерживать на этом уровне.

Затем осадок III-1 можно отделить центрифугированием при —5° со скоростью приблизительно 80 *л/час*. Если плазма, примененная для этой цели, не является специфической в отношении какой-либо группы крови, то концентрация в ней изоагглютинина слишком мала, чтобы использовать ее для получения глобулинов, специфических для отдельных групп крови. Поскольку в настоящее время неизвестно о содержании других полезных компонентов в этой фракции, то надосадочную жидкость III-1 можно отбрасывать; в дальнейшем, возможно, будут найдены пути ее использования.

Осадок III-1 содержит изоагглютинины. Его можно высушить в замороженном состоянии и использовать для получения приблизительно 5-процентного раствора белка в изотоническом солевом растворе с pH 7, специфического для данной группы крови, если исходная плазма была специфичной в групповом отношении и имела достаточно высокий титр.

Ионную силу надосадочной жидкости III доводят до значения 0,05 добавлением 50 миллимолей NaCl на каждый килограмм; при этом pH должен быть равен 5,2, концентрация этилового спирта—17% и температура—приблизительно —6°.

Осадок II-3 состоит главным образом из γ-глобулина (иммунологические титры изученных антител в этом осадке почти иден-

тичны с титрами антител в осадке II-1,2, за исключением тифоидного О агглютинина).

Осадок II-3 отделяют центрифугированием надосадочной жидкости III со скоростью приблизительно 50 *л/час* при температуре —6°. Его можно высушить в замороженном состоянии, лучше без добавления хлористого натрия или глицина.

pH надосадочной жидкости II-3 доводят до значения 7,4±0,2 добавлением приблизительно 15 *миллимолей* бикарбоната натрия (на каждый килограмм), а концентрацию спирта—до 20—25% прибавлением 40—114 *мл* 95-процентного этилового спирта. Температуру поддерживают около —5°.

Осадок II-1,2 состоит главным образом из более растворимой части γ-глобулина. Этот материал используется в клиниках при лечении кори и инфекционной желтухи. Из этого осадка готовят раствор, содержащий 16,5 *г* γ-глобулина в 100 *мл*, и подвергают его стерилизации. Осадок II-1,2 отделяют от надосадочной жидкости II-3 центрифугированием со скоростью приблизительно 50 *л/час* при —5°. Его можно высушить в замороженном состоянии, лучше без добавления хлористого натрия или глицина.

Аналогичный, но несколько сокращенный метод фракционирования разработали Пиллимер и Хатчинсон [346], которые в качестве осадителя применяли не этиловый, а метиловый спирт. При тех же объемных отношениях реагентов, по-видимому, должны получаться приблизительно одинаковые фракции. Считают, что при использовании метилового спирта возможность денатурации уменьшается и процесс можно проводить при более высоких температурах (при 0° вместо —5°). Было бы интересно ознакомиться с объективными данными об относительном денатурирующем действии этих двух реагентов. Возможности рассмотренного выше этанолового метода ограничиваются до некоторой степени точкой замерзания системы; Юз считает, что действительные преимущества применения метилового спирта состоят в том, что фракционирование можно проводить при более низких температурах, так как для эквивалентного осаждения требуются бо́льшие мольные доли метилового спирта по сравнению с этиловым спиртом.

Как установил Кеквик с сотрудниками [347], частичное фракционирование человеческой плазмы можно производить при помощи этилового эфира в качестве осадителя. Вследствие ограниченной растворимости эфира могут быть осаждены только фибриноген и γ-глобулин.

В литературе имеются сообщения о дальнейшем изучении этанолового метода с целью подбора более мягких условий фракционирования. Для ускорения осаждения при мягких условиях [172] изучалось осаждение ионами металлов, такими, как Zn^{2+}, а также использовалось взаимодействие между белками. Однако лучших методов разделения пока не получено, и, к сожалению, нет данных

о том, что новые условия в действительности являются более мягкими. Ионы цинка (при pH 6—6,5) осаждают фракцию, которая грубо соответствует фракциям I+II+III. (При более высоких температурах наблюдается образование большого количества осадка, что, возможно, связано с денатурацией.) Максимальное осаждение происходит при концентрации ионов Zn^{2+} ~0,02 *M*, при более высоких концентрациях белки снова растворяются (солевой эффект). После удаления осадка остающийся белок, обозначаемый как SPP (устойчивые плазменные белки), осаждают добавлением этилового спирта (достаточно 15—20% по объему) или подщелачиванием раствора до осаждения $Zn(OH)_2$; при этом основная масса остающегося белка увлекается вместе с осадком $Zn(OH)_2$. Ионы цинка можно легко удалить на ионообменных смолах, и, таким образом, в случае получения терапевтических препаратов отпадает необходимость в лиофилизации.

Высаливание, один из наиболее старых методов фракционирования белков, часто применялось для получения отдельных белков плазмы. Кон с сотрудниками [150] и Свенссон [348] пытались использовать этот метод в различных системах разделения белков. Их исследования, проводившиеся при комнатной температуре и pH 6 и при температуре «холодной комнаты» и pH крови соответственно, показали, что фракционирование белков является функцией концентрации сульфата аммония. При добавлении сульфата аммония до концентрации, соответствующей $^1/_3$ насыщения, осаждается наибольшее количество γ-глобулина. Остающуюся часть γ-глобулина можно осаждать сульфатом аммония (до 0,4 насыщения), хотя при этом происходит соосаждение значительных количеств α- и β-глобулинов. Большинство последних может быть затем осаждено при полунасыщении сульфатом аммония, все альбумины в основном остаются в надосадочной жидкости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Warburg O., Biochem. Z., **142**, 317, 1923.
2. Gerard R. W., Am. J. Physiol., **82**, 381, 1927.
3. Prosser C. L., Comparative Animal Physiology, Chap. 15, Saunders W. B., Phila., 1950.
4. Флоркен М., Биохимическая эволюция, Издатинлит, М., 1947.
5. Walter C., Surg. Forum. Proc. 36th Congr. Am. Coll. Surgeons. 1950 (Publ. 1951), p. 483.
6. Rochow E. G., An Introduction to the Chemistry of the Silicones, Wiley & Sons, New York, 1951.
7. Pekelharing G. A., Beitr. wissensch. Med., **1**, 433, 1891.
8. Lewisohn R., Med. Record., **87**, 141, 1915.
9. Schwarzenbach G., Helv. Chim. Acta, **30**, 1798, 1947; Proescher F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **76**, 619, 1951.
10. Steinberg A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **56**, 124, 1944.

11. Riggs D. S., New Engl. J. Med., **242**, 179, 216, 1950; Burstein M., Compt. rend. soc. biol., **144**, 750, 1338, 1952.
12. Hewson W., An Experimental Inquiry into the Properties of the Blood, T. Codell, London, 1771.
13. Vallee B. L., Hughes W. L., Jr., Gibson J. G., 2d, Blood, **1**, 82, 1947.
14. Ferrebee J. W., Geiman Q. M., J. Infections Diseases, **78**, 173, 1946.
15. Fawcett D. W., Vallee B. L., J. Lab. Clin. Med., **39**, 354, 1952.
16. Buckley E. S., Jr. Gibson J. G., 2d, Proc. Univ. Lab. Phys. Chem. Related Med. and Public Health, **1**, 45, 1950.
17. Krejci L. E., Sweeney L., Sanigar E. B., J. Biol. Chem., **158**, 693, 1945.
18. Van Slyke D. D., Hiller A., Phillips R. A., Hamilton P. B., Dole V. P., Archibald R. M., Eder H. A., J. Biol. Chem., **183**, 331, 1950.
19. Armstrong S. H., Jr., Budka M. J. E., Morrison K. C., Hasson M., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1747, 1947.
20. Landis E. M., Physiol. Revs., **14**, 404, 1934.
21. Seligman A. M., J. Clin. Invest., **23**, 720, 1944; Sterling K., ibid., **30**, 1228, 1951.
22. Deichmiller M. P., Dixon F. J., Maurer P. H., Federation Proc., **12**, 386, 1953.
23. Gitlin D., Janeway C. A., Science, **118**, 301, 1953.
24. Gamble J. L., Jr., Robertson J. S., Am. J. Physiol., **171**, 659, 1952; Gaudino M., Schwartz I. L., Levitt M. F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **68**, 507, 1948,
25. Drinker C. K., Yoffey J. M., Lymphatics, Lymph, and Lymphoid Tissue, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1941.
26. Landis E. M., Am. J. Physiol., **82**, 217, 1927; **83**, 528, 1928.
27. Pappenheimer J. R., Renkin E. M., Borrero L. M., Am. J. Physiol., **167**, 13, 1951.
28. Coons A. H., Kaplan M. H., J. Exptl. Med., **91**, 1, 1950.
29. Coons A. H., Leduc E. H., Kaplan M. H., J. Exptl. Med., **93**, 173, 1951.
30. Crampton C. F., Haurowitz F., Science, **111**, 300, 1950; Haurowitz F., Crampton C. F., J. Immunol., **68**, 73, 1951.
31. Bowin A., Delaunay A., Phagocytose et Infections, Herman & Co., Paris, 1947.
32. Gitlin D., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **74**, 138, 1950.
33. Gitlin D., Landing B. H., Whipple A., J. Exptl. Med., **97**, 163, 1953.
34. Schoenheimer R., Rittenberg D., Ratner S., Heidelberger M., J. Biol. Chem., **144**, 545, 1942.
35. Whipple G. H., Madden S. C., Medicine, **23**, 215, 1944.
36. Pappenheimer J. R., Physiol. Revs., **33**, 387, 1953.
37. Christensen H. N., Riggs T. R., Ray N. E., J. Biol. Chem., **194**, 41, 1952.
38. Perlmann G. E., Lipmann F., Arch. Biochem., **7**, 159, 1945.
39. Smith E. L., Cartwright G. E., Tyler F. H., Wintrobe M. M., J. Biol. Chem., **185**, 59, 1950.
40. Marshall M. E., Deutsch H. F., J. Biol. Chem., **189**, 1, 1951.
41. McCarty M., J. Exptl. Med., **85**, 491, 1947.
42. Gutman A. B., Advances in Protein Chem., **4**, 156, 1948.
43. Scatchard G., Gibson S. T., Woodruff L. M., Batchelder A. C., Brown A., J. Clin. Invest., **23**, 445, 1944.

44. Boyer P. D., Ballou G. A., Luck J. M., J. Biol. Chem., **162**, 199, 1946.
45. Peters T., Anfinsen C. B., J. Biol. Chem., **186**, 805, 1950.
46. Fagraeus A., Antibody Production in Relation to the Development of Plasma Cells, Esselts Aktoebolag, Stockholm, 1948.
47. Miller L. L., Bale W. F., Bly C. G., J. Exptl. Med., **99**, 125, 133, 1954.
48. Starling E. H., J. Physiol., **19**, 312, 1896.
49. Krogh A., Landis E. M., Turner A. H., J. Clin. Invest., **11**, 63, 1932.
50. Meyer P., Compt. rend. soc. biol., **120**, 305, 1935.
51. Muntwyler E., Mellors R. C., Mautz F. R., Mangun G. H., J. Biol. Chem., **134**, 389, 1940.
52. Krogh A., J. Physiol., **52**, 409, 1919.
53. Elford W. J., Ferry J. D., Brit. J. Exptl. Path., **16**, 1, 1935.
54. Hall B. V., Federation Proc., **12**, 467, 1953.
55. Richards A. N., Bott P. A., J. Biol. Chem., **141**, 291, 1941.
56. Yuile C. L., Physiol. Revs., **22**, 19, 1942.
57. Dock W., New England J. Med., **227**, 633, 1942.
58. Tamm I., Horsfall F. L., Jr, J. Exptl. Med., **95**, 171, 1952.
59. Scatchard G., Batchelder A. C., Brown A., J. Clin. Invest., **23**, 458, 1944.
60. Scatchard G., Batchelder A. C., Brown A., J. Am. Chem. Soc., **68**, 2320, 1946.
61. Oncley J. L., Scatchard G., Brown A., J. Phys. Chem., **51**, 184, 1947.
62. Heyl J. T., Gibson J. G., 2d, Janeway C. A., J. Clin. Invest., **22**, 763, 1943.
63. Panum P., Virchow's Arch. pathol. Anat. Physiol., **4**, 419, 1852; Kauder, Arch. exptl. Path. Pharmakol., **26**, Denis P. S., Memoir sur le Sang, Paris, 1859.
64. Cohn E. J., Physiol. Revs., **5**, 349, 1925.
65. Gürber A., Sitzber. physik. med. Ges., 1894, Würzburg, p. 143, 1895.
66. Tiselius A., Trans. Faraday Soc., **33**, 524, 1937.
67. Armstrong S. H., Yr, Budka M. J. E., Morrison K. C., J. Am. Chem. Soc., **69**, 416, 1947.
68. Cohn E. J., Hughes W. L., Jr, Weare J. H., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1753, 1947.
69. Leutscher J. A., J. Am. Chem. Soc., **61**, 2888, 1939.
70. Alberty R. A., Baldwin R. L., Laughton P. M., J. Phys. Chem., **55**, 111, 1951.
71. McMeekin T. L., J. Am. Chem. Soc., **61**, 2884, 1939.
72. Kendall F. E., J. Biol. Chem., **138**, 97, 1941.
73. Northrop J. H., Herriot R. M., Desreux V., J. Gen. Physiol., **24**, 213, 1940.
74. Hughes W. L., Jr., J. Am. Chem. Soc., **69**, 1836, 1947.
75. Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L., Jr, Mulford D. J. Ashworth J. N., Melin M., Taylor H. L., J. Am. Chem. Soc., **68**, 459, 1946.
76. Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, **18**, No. 5, 1, 1930.
77. Hewitt L. F., Biochem. J., **30**, 2229, 1936.
78. Adair M. E., Taylor G. L., Nature, **135**, 307, 1935.
79. Lewin J., J. Am. Chem. Soc., 73, 3906—3911, 1951.
80. Dintzis H., Doctor's Dissertation, Harvard University, Cambridge, Mass, 1952.
81. Low B. W., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4830, 1952.
82. Creeth J. M., Biochem. J., **51**, 10, 1952.

83. Koenigs V. L., Perring J. D., Arch. Biochem. Biophys., **41**, 367, 1952.
84. Shulman S., Arch. Biochem. Biophys., **44**, 230, 1953.
85. Waugh D. F., Yphantis D. F., Rev. Sci. Instruments, **23**, 609, 1952.
86. Svedberg T., Nature, **139**, 1051, 1937.
87. Weber G., Biochem. J., **51**, 155, 1952; Discussions Faraday Soc., **13**, 33, 1953.
88. Van Vunakis H., Brand E., Abst. 119th meeting Am. Chem. Soc., p. 28c., 1951.
89. Desnuelle P., Rovery M., Fabre C., Compt. rend., **233**, 987, 1951.
90. Mittelman D., in Cohn E. J., Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953, p. 24.
91. Morawetz H., Hughes W. L., J. Phys. Chem., **56**, 64, 1952.
92. Cohn E. J., Enzymes and Enzyme Systems, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass, 1951.
93. Waugh D. F., J. Am. Chem. Soc., **68**, 247, 1946.
94. Scatchard G., Strong L. E., Hughes W. L., Jr., Ashworth J. N., Sparrow A. H., J. Clin. Invest., **24**, 671, 1945.
95. Simpson R. B., Kauzmann W., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5139, 1953.
96. Kauzmann W., in McElroy and Glass, The Mechanism of Enzyme Action, Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, 1954.
97. Neurath H., Cooper G. R., Erickson J. O., J. Biol. Chem., **142**, 249, 1942.
98. Huggins C., Tapley D. F., Jensen E. V., Nature, **167**, 592, 1951.
99. Erickson J. O., Neurath H., J. Exptl. Med., **78**, 1, 1943.
100. Gitlin D., J. Immunol., **62**, 437, 1949.
101. Brand E., Ann. N. Y. Acad. Sci., **47**, 187, 1946.
102. Brand E., Kassel B., Saidel L. J., J. Clin. Invest., **23**, 437, 1944.
103. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **178**, 53, 1949.
104. Shemin D., J. Biol. Chem., **159**, 439, 1945.
105. Spies J. R., Chambers D. C., Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **21**, 1249, 1949.
106. Hughes W. L., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 79, 1950.
107. Tanford C., J. Am. Chem. Soc., **72**, 441, 1950.
108. Scatchard G., Ann. N. Y. Acad. Sci., **51**, 660, 1949.
109. Gutfreund H., Discussions Faraday Soc., **13**, 1952.
110. Straessle R., J. Am. Chem. Soc., **73**, 504, 1951.
111. Edelhoch H., Katchalski E., Maybury R., Hughes W. L., Edsall J. T., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5058, 1953.
112. Bjerrum J., Chem. Revs., **46**, 381, 1950.
113. Gurd F. R. N., Goodman D. S., J. Am. Chem. Soc., **74**, 670, 1952.
114. Tanford C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 211, 1952.
115. Saroff H. A., Mark H. J., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1420, 1953.
116. Klotz I. M., Urquhart J. M., Fiess H. A., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5537, 1952.
117. Hughes W. L., Jr., Saroff H. A., Carney A. L., J. Am. Chem. Soc., **71**, 2476, 1949.
118. Fraenkel-Conrat H., Bean R. S., Lineweaver H., J. Biol. Chem., **177**, 385, 1949.
119. Klotz I. M., Urquhart J. M., J. Am. Chem. Soc., **71**, 1603, 1949.
120. Crammer J. L., Neuberger A., Biochem. J., **37**, 302, 1943.

121. Hughes W. L., Straessle R., J. Am. Chem. Soc., 72, 452, 1950.
122. Li C. H., J. Am. Chem. Soc., 67, 1065, 1945.
123. Bonot A., Bull. soc. chim. biol., 21, 1422, 1939.
124. Muus J., Coons A. H., Salter W. T., J. Biol. Chem., 139, 135, 1941.
125. Shakrokh B. K., J. Biol. Chem., 151, 659, 1943.
126. Pitt-Rivers R., Biochem. J., 43, 223, 1948.
127. Gross J., Pitt-Rivers R., Biochem. J., 53, 645, 652, 1953.
128. Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S., J. Biol. Chem., 161, 259, 1945.
129. Fraenkel-Conrat H., J. Biol. Chem., 154, 227, 1944.
130. Wilcox P. E., Abstracts 12th Intern. Congr. Pure and Appl. Chem., New York, 1951, p. 60.
131. Fraenkel-Conrat H. in Greenberg D., Amino Acids and Proteins, 2nd ed., Thomas C. C. Publ. Co., Springfield, Ill., 1951, p. 532.
132. Reitz H. C., Ferell R. E., Fraenkel-Conrat H., J. Am. Chem. Soc., 68, 1024, 1946.
133. Steinhardt J., Fugitt C. H., Harris M., J. Res. Natl. Bur. Standards, 26, 293, 1941; 28, 201, 1942.
134. Scatchard G., Scheinberg I. H., Armstrong S. H., Jr., J. Am. Chem. Soc., 72, 535, 540, 1950.
135. Schellman J., J. Phys. Chem., 57, 472, 1953; Laurence D. J. R., Biochem. J., 51, 168, 1952.
136. Linderstrøm-Lang K., Jacobsen C. F., Nature, 164, 411, 1949.
137. Bennhold H., Kylin E., Rusznyak St., Die Eiwisskörper des Blutplasmas, Steinkopf T., Dresden, 1938.
138. Davis B., in C. M. McLeod's Evaluation of Chemotherapeutic Agents, Columbia Univ. Press, New York, 1949, p. 44.
139. Mustakallio K. K., Telkkä A., Science, 118, 320, 1953.
140. Henderson L. J., Blood—A Study in General Physiology, Yale Univ. Press, New Haven, 1928.
141. Laurell C. B., Ingelman B., Acta Chem. Scand., 1, 770, 1947.
142. Barkan G., Schales O., Z. physiol. Chem., 248, 96, 1937.
143. Koechlin B. A., J. Am. Chem. Soc., 74, 2649, 1952.
144. Surgenor D. M., Strong L. E., Taylor H. L., Gordon R. S., Jr., Gibson D. M., J. Am. Chem. Soc., 71, 1223, 1949.
145. Bain, Deutsch, J. Biol. Chem., 172, 547, 1948.
146. Warner R. C., Weber I., J. Biol. Chem., 191, 173, 1951.
147. Holmberg C. G., Laurell C. B., Acta Chem. Scand., 2, 550, 1948.
148. Mann T., Keilin D., Proc. Roy. Soc. (London), B126, 303, 1948.
149. Laki K., Abst. commun. 17th Intern. Physiol. Congr., Oxford, p. 373, 1947.
150. McMeekin T. L., Cohn E. J., Oncley J. L., Newell J. M., Hughes W. L., J. Am. Chem. 62, 3386, 1940.
151. Holmberg C. G., Laurell C. B., Acta Chem. Scand., 1, 944, 1947.
152. Holmberg C. G., Laurell C. B., Acta Chem. Scand., 5, 476, 921, 1951.
153. Hardy W. B., Gardiner S., J. Physil., 40, LXVIII, 1910.
154. McFarlane A. S., Nature, 149, 439, 1942.
155. McFarlane A. S., Biochem. J., 29, 407, 660, 1175, 1202, 1935.
156. Oncley J. L., Melin M., Richert D. A., Cameron J. W., Gross P. M., Jr, J. Am. Chem. Soc., 71, 541, 1949.
157. Blix G., Tiselius A., Svensson H., J. Biol. Chem., 137, 485, 1941.

158. Macheboeuf M., Bull. soc. chim. biol., **11**, 268, 485, 1929.
159. Macheboeuf M., Rebeyrotte P., «Lipoproteins», Disc. Faraday Soc., **6**, 92, 1949.
160. Muhlbock O., Acta Brevia Neerland. Physiol. Pharmacol. Microbiol., 7, 76, 1937; C.A., **31**, 6302, 1937.
161. Macheboeuf M., in Tullis J. L., Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953, p. 358.
162. Macheboeuf M., Rebeyrotte P., «Lipoproteins», Disc. Faraday Soc., No. 6, 62, 1949.
163. Vandendriessche L., Natuurw. Tijdschr. (Belg.), **26**, 62, 1944; C.A., **40**, 6510, 1946.
164. Gurd F. R. N., Oncley J. L., Melin M., J. Am. Chem. Soc., **72**, 458, 1950.
165. Adair G. S., Adair M. E., J. Physiol, **102**, 17, 1943.
166. Macheboeuf M., Sandor G., Bull. soc. chim. biol., **13**, 745, 1931.
167. Popjak G., McCarthy E. F., «Lipoproteins», Disc. Faraday Soc., No. 6, 97, 1949.
168. McFarlane A. S., Disc. Faraday Soc., **6**, 74, 1949.
169. Gitlin D., Science, **117**, 591, 1953.
170. Page I. H., Lewis L. A., Green A. A., Am. J. Physiol., **171** 391, 1952.
171. Barr D. P., Russ E. M., Eder H. A., in Tullis J., Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953.
172. Lever W. F., Gurd F. R. N., Uroma E., Brown R. K., Barnes B. A., Schmid K., Schultz E. L., J. Chem. Invest., **30**, 99, 1951.
173. Page I. H., Lewis L. A., Circulation, **7**, 707, 1953.
174. Gofman J. W., Lindgren F. T., Elliott H. A., J. Biol. Chem., **179**, 973, 1949.
175. Gofman J. W., Jones H. B., Lindgren F. T., Lyon T. P., Graham D. M., Strisower B., Nichols A. V., Am. J. Med. **11**, 358, 1951.
176. Frazer A. C., Physiol. Revs., **26**, 103, 1946; Disc. Faraday Soc., **6**, 81, 1949.
177. Hagerman J. A. S., Gould R. G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **78**, 329, 1951.
178. Campbell D. H., Lanni F., in Greenberg D. M., Amino Acids and Proteins, 2nd ed., Thomas C. C., Springfield, 1951, p. 649.
179. Marrack J. R., Ann. Repts. Progr. Chem. (Chem. Soc. London), **48**, 2, 1951.
180. Smith E. L., Jäger B. V., Ann. Rev. Microbiol., **6**, 207, 1952.
181. Haurowitz F., Biol. Revs., Cambridge Phil. Soc., **26**, 247, 1952.
182. Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, 2nd ed. Harvard University Press, Cambridge, 1945.
183. Wells Gideon H., The Chemical Aspects of Immunity, The Chemical Catalog Co., New York, 1929, p. 31, 71, 72; Hektoen L., J. Infectious Diseases, **31**, 72, 1922.
184. Rich A. R., Harvey Lectures, **42**, 106, 1947.
185. Marrack J. R., Hoch H., Johns R. G. S., Brit. J. Exptl. Pathol., 32, 212, 1951.
186. Gitlin D., Edelhoch H., J. Immunol., **66**, 67, 1951.
187. Singer S. J., Campbell D. H., J. Am. Chem. Soc., **73**, 3543, 1951; Oncley J. L., Ellenbogen E., Gitlin D., Gurd F. R. N., J. Phys. Chem., **56**, 85, 1952.
188. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., **61**, 563, 1935.

189. Marrack J. R., Ghemistry of Antigens and Antibodies, 2nd ed., Great Britain Medical Research Council, Spec. Rept., Series No. 230, 1938.
190. Pauling L., in Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, 2nd ed., Harvard Univ. Press, Cambridge, 1945; Pauling L., J. Am. Chem. Soc., **62**, 2643, 1940.
191. Pappenheimer A. M., Jr., The Nature and Significance of the Antibody Response, Columbia University Press, New York, 1953, p. 111.
192. Wiener A.S., J. Exptl. Med., **94**, 213, 1951.
193. McGirr J. L., Vet. J., **103**, 345, 1947.
194. Schick B., Greenbaum K. W., J. Pediat., **27**, **241**, 1945; Krebs E. G., J. Lab. Clin. Med., **31**, 851, 1946.
195. Oncley J. L., in Tullis J. L., ed., Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953, p. 180.
196. Larson D. L., Tomlinson L. J., J. Lab. Clin. Med., **39**, 129, 1952.
197. Cann J. R., Kirkwood J. G., Brown R. A., Plescia O. J., J. Am. Chem. Soc., **71**, 1603, 1949.
198. Edsall G., In Pappenheimer A. M., Jr., The Nature and Significance of the Antibody Response, Columbia Univ. Press, New York, 1953, p. 69.
199. Gitlin D., Davidson C. S., Wetterlow L. H., J. Immunol., **63**, 415, 1949.
200. Faure M., Larny R., Coulon M. H., Ann. inst. Pasteur, **74**, 19, 1948.
201. Perez J. J., Mazureké C., Compt. rend. soc. biol., **144**, 1639, 1950.
202. Smith E. L., Greene R. D., Bartner E., J. Biol. Chem., **164**, 359, 1946; Smith E. L., Greene R. D., J. Biol. Chem., **171**, 355, 1947.
203. Cann J. R., Campbell D. H., Brown R. A., Kirkwood J. G., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4611, 1951.
204. Deutsch H. F., Nichol J. C., Cohn M., J. Immunol., **63**, 195, 1949.
205. Wolfe H. R., Dilks E., J. Immunol., **61**, 251, 1949; Goodman M., Wolfe H. R., Norton S., J. Immunol., **66**, 225, 1951.
206. Kabat E. A., J. Exptl. Med., **69**, 103, 1939.
207. Petermann M. L., Pappenheimer A. M., J. Phys. Chem., **45**, 1, 1941.
208. Pappenheimer A. M., Jr., ed., The Nature and Significance of the Antibody Response, Columbia Univ. Press., New York, 1953, p. 111.
209. Heidelberger M., Krueger R. C., Deutsch H. F., Arch. Biochem. Biophys., **34**, 135, 146, 1951.
210. Cann J. R., Brown R. A., Singer S. J., Shumaker J. B., Jr., Kirkwood J. G., Science, **114**, 30, 1951.
211. Pedersen K. O., Heidelberger M., J. Exptl. Med., **65**, 393, 1937.
212. Pedersen K. O., Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions, Almquist and Wikesells Boktryckeri, Uppsala, 1945.
213. Kabat E. A., J. Exptl. Med., **69**, 103, 1939.
214. Kekwick R. A., Record B. R., Brit. J. Expt. Pathol., **22**, 29, 1941.
215. Porter R. R., Biochem. J., **46**, 473, 1950.
216. Van Vunakis H., Ph. D., Dissertation, Columbia Univ., New York, 1951; Microfilm Abstracts (University Microfilms), Ann. Arbor, Mich., 1951, vol. 11, p. 822.

217. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., **64**, 161, 1936; see also: Goebel W. F., Olitsky P. J., Saenz A. C., J. Exptl. Med., **87**, 445, 1948.
218. Campbell D., Blaker R. H., Pardee A. B., J. Am. Chem. Soc., **70**, 2496, 1948.
219. Karush F., Federation Proc., **12**, 448, 1953.
220. Campbell D., Luescher E., Lermann S. G., Proc., Natl. Acad. Sci. U.S., **37**, 575, 1951.
221. Isliker H., Ann. N. Y., Acad. Sci., **57**, 225, 1953.
222. Isliker H., Intern. Congr. Biochem. Abstr. of Communs. 2nd Congr., p. 393.
223. Chow B., Goebel W. F., J. Exptl. Med., **62**, 179, 1935.
224. Cann J. R., Brown R. A., Kirkwood J. G., J. Am. Chem. Soc., **71**, 1609, 1949.
225. Cann J. R., Brown R. A., Kirkwood J. G., Hink J. H., Jr., J. Biol. Chem., **185**, 663, 1950.
226. Felton L. D., J. Infectious Diseases, **43**, 543, 1928.
227. Svensson H., J. Biol. Chem., **139**, 805, 1941.
228. Deutsch H. F., Alberty R. A., Gosting L. J., J. Biol. Chem., **165**, 21, 1946.
229. Smith E. L., J. Dairy Sci., **31**, 127, 1948; J. Biol. Chem., **164**, 345, 1946.
230. Smith E. L., Coy N. H., J. Biol. Chem., **164**, 367, 1946.
231. Beaven, Holiday, Advances in Protein Chem., **7**, 382, 1952.
232. Smith E. L., Gerlough T. D., J. Biol. Chem., **167**, 679, 1947.
233. Kunkel H. G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **66**, 217, 1947.
234. Oncley J. L., Gordon F. H., Gurd F. R. N., Lontie R. A., Abstract of paper presented at the Division of Biological Chemistry, 119th Meeting of the American Chemical Society, Boston, Mass., April 1—5, 1951, p. 250.
235. Northrop J. H., Goebel W. F., J. Gen. Physiol., **32**, 705, 1948.
236. Alberty R. A., Anderson E. A., Williams J. W., J. Phys. Coll. Chem., **52**, 217, 1948.
237. Jennings R. K., Smith L. D., J. Immunol., **45**, 108, 1942.
238. Krejci L. E., Jennings R. K., Smith L. D., J. Immunol., **45**, 111, 1942.
239. Wright G. G., J. Exptl. Med., **81**, 647, 1945.
240. Weil A. J., Moos A. M., Clapp F. L., J. Immunol., **37**, 413, 1939.
241. Sternberger L. A., Petermann M. L., J. Immunol., **67**, 207, 1951.
242. Erickson J. O., Neurath H., J. Gen. Physiol., **28**, 421, 1945.
243. Rothen A., Advances in Protein Chem., **3**, 123, 1947.
244. Chow B. F., Goebel W. F., J. Exptl. Med., **62**, 179, 1935.
245. Hopkins S. J., Wormall A., Biochem. J., **27**, 740, 1706, 1933.
246. Fraenkel-Conrat H., J. Biol. Chem., **152**, 385, 1934.
247. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **176**, 367, 1948.
248. Tayeau F., Pautrizel R., Leglise F., Abstr. 2nd Intern. Congr. Biochem. Abstr. of Communs., 1952, p. 108.
249. Li C. H., J. Am. Chem. Soc., **67**, 1065, 1945.
250. Pressman D., Sternberger L. A., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2226, 1950.
251. Cohen S., J. Immunol., **67**, 339, 1951.
252. Pressman D., Sternberger L. A., J. Immunol., **66**, 609, 1951.
253. Pauly H., Z. physiol. Chem., **42**, 508, 1904.
254. Eagle H., Smith D. E., Vichess P., J. Exptl. Med., **63**, 617, 1936.

255. Coombs R., Mynors L. S., Weber G., Brit. J. Exptl. Path., **31**, 640, 1950.
256. Pillemer L., Blum L., Lepow I. H., Ross O. A., Todd E. W., Wardlaw A. C., Science, **120**, 279, 1954.
257. Levine L., Cowan K. M., Osler A. G., Mayer M. M., J. Immunol., **71**, 359, 1953.
258. Heidelberger M., Mayer M. M., Advances in Enzymol., **8**, 71, 1948.
259. Pillemer L., Chem. Revs., **33**, 1, 1943.
260. Hardy W. B., J. Physiol., **13**, 165, 1892.
261. Hammarsten O., Pflügers Arch. ges. Physiol., **19**, 563, 1879.
262. Nanninga L., Arch. Neerland physiol., **28**, 241, 1946.
263. Morrison P. R., J. Am. Chem. Soc., **69**, 2723, 1947.
264. Morrison P. R., Edsall J. T., Miller S. G., J. Am. Chem. Soc., 70, 3103, 1948.
265. Morrison P. R., Shulman S., Blatt W. F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **78**, 653, 1951.
266. Laki K., Arch. Biochem. Biophys., 32, 317, 1951.
267. Katz S., Gutfreund K., Shulman S., Ferry J. D., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5706, 1952.
268. Shulman S., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5846, 1953.
269. Holmberg C. G., Arkiv. Kemi, Mineral Geol., **17A**, No. 28, 1944.
270. Koenig V. L., Pedersen K. O., Arch. Biochem., **25**, 97, 1950.
271. Shulman S., Ferry J. D., J. Phys. Chem., **55**, 135, 1951.
272. Koenig V. L., Perrings J. D., Arch. Biochem., **36**, 147, 1952; **40**, 218, 1952.
273. Bailey K., Sanger F., Ann. Rev. Biochem., 20, 118, 1951.
274. McMeekin T. L., Marshall K., Science, **116**, 142, 1952.
275. Koenig V. L., Arch. Biochem., **25**, 241, 1950.
276. Hocking C. S., Laskowski M., Jr., Scheraga H. A., J. Am. Chem. Soc., **74**, 775, 1952.
277. Edsall J. T., Foster J. F., Scheinberg H., J. Am. Chem. Soc., **69**, 2731, 1947.
278. Morrison P. R., Lontie R., quoted by Edsall J. T. in Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953, p. 123.
279. Hall C. E., J. Biol. Chem., **179**, 857, 1949.
280. Kaesberg P., Shulman S., J. Biol. Chem., **200**, 293, 1953.
281. Porter K. R., Hawn C. v. Z., J. Exptl. Med., **90**, 225, 1949.
282. Ferguson J. H., Ralph P. H., Am. J. Physiol., **138**, 648, 1948.
283. Bailey K., Bettelheim F. R., Lorand L., Middlebrook W. R., Nature, **167**, 233, 1951.
284. Lorand L., Nature, **167**, 992, 1951; Laki K., Science, **114**, 435, 1951.
285. Sherry S., Troll W., J. Biol. Chem., **208**, 95, 1954.
286. Lorand L., Middlebrook W. R., Biochem. J., **52**, 196, 1952.
287. Bettelheim F. R., Bailey K., Biochim. Biophys. Acta, **9**, 578, 1952.
288. Shulman S., Ferry J. D., J. Phys. Chem., **55**, 135, 1951.
289. Shulman S., Disc. Faraday Soc., **13**, 109, 1953.
290. Mihalyi E., Acta Chem. Scand., **4**, 344, 1950.
291. Steiner R. F., Laki K., Arch. Biochem. Biophys., **34**, 24, 1951.
292. Shulman S., Ehrlich P., Ferry J. D., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1388, 1951.
293. Lorand L., Nature, **166**, 694, 1951, Laki K., Lorand L., Science, **108**, 280, 1948.
294. Loewy A. G., quoted by Edsall in Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953, p. 133.

295. Alexander B., Landwehr G., Am. J. Physiol., **159**, 322, 1949.
296. Bordet J., Delange L., Ann. inst. Pasteur, **26**, 657, 1912.
297. Seegers W. H., Loomis E. C., Vandenbelt J. M., Arch. Biochem., **6**, 85, 1945.
298. Seegers W. H., Loomis E. C., Vandenbelt J. M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **56**, 70, 1947.
299. Laki K., Kominz D. R., Symonds P., Lorand L., Seegers W. H., Arch. Biochem. Biophys., **49**, 276, 1954.
300. Lamy F., Waugh D. F., J. Biol. Chem., 203, 491, 1953.
301. Seegers W. H., McClaughry R. T., Fahey J. L., Blood, **5**, 421, 1950.
302. Albritton E. C., Standard Values in Blood, Saunders W. B. Co., Phila., 1952.
303. Innerfeld I., Schwartz A. W., Angrist A. A., Bull. N. Y. Acad. Med., **28**, 537, 1952; Reiser H. G., Roettig L. C., Curtis G. M., Surg. Forum, Proc. 36th Clin. Congr. Am. Coll. Surgeons, 1950, 17 (Publ. 1951).
304. Christensen L. R., McLeod C. M., J. Gen. Physiol., **28**, 363, 559, 1945.
305. Remmert L. F., Cohen P. P., J. Biol. Chem., **181**, 431, 1949.
306. Kline D. L., J. Biol. Chem., **204**, 949, 1953.
307. Cohn E. J., Experientia, **3**, 125, 1947.
308. Sullivan T. J., Gutman E. B., Gutman A. B., J. Urol., **48**, 426, 1942.
309. Williams C. M., Federation Proc., **10**, 546—552, 1951.
310. Meyer K., Advances in Protein. Chem., **2**, 249, 1945.
311. Sørensen M., Haugaard G., Biochem. Z., **360**, 247, 1933.
312. Seibert F. B., Atno J., J. Biol. Chem., **163**, 511, 1946.
313. Palmer J. W., Smyth E. M., Meyer K., J. Biol. Chem., **119**, 491, 1937.
314. McMeekin T. L., J. Am. Chem. Soc., **62**, 3393, 1940.
315. Hewitt L. F., Biochem. J., **31**, 360, 1047, 1534, 1937.
316. Kekwick R. A., Biochem. J., **32**, 552, 1938.
317. Dische Z., J. Biol. Chem., **167**, 189, 1947.
318. Rimington C., Biochem. J., **34**, 931, 1940.
319. Neuberger A., Biochem. J., **32**, 1435, 1938.
320. Hewitt L. F., Biochem. J., **32**, 26, 1938.
321. Weimar H. E., Mehl J. W., Winzler R. J., J. Biol. Chem., **185**, 561, 1950.
322. Schmid K., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2816, 1950; **75**, 60, 1953.
323. Smith E. L., Brown D. M., Weimar H. E., Winzler R. J., J. Biol. Chem., **185**, 569, 1950.
324. Odin L., Werner I., Acta Soc. Med. Upsaliensis, **57**, 227, 230, 1952.
325. Blix G., Z. physiol. Chem., **240**, 43, 1936.
326. Blix G., Svennerholm L., Werner I., Acta Chem. Scand. **6**, 358; 1952.
327. Mehl J. W., Golden F., Winzler R. J., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **72**, 110, 1949.
328. Hoch H., Chanutin A., J. Biol. Chem., **200**, 241, 1953.
329. Pedersen K. O., J. Phys. Chem., **51**, 164, 1948.
330. Deutsch H. F., Federation Proc., **12**, 196, 1953.
331. Orcutt M. L., Howe P. E., J. Exptl. Med., **36**, 291, 1922.
332. Aschaffenburg R., Bartlett S., Kon S. K., Terry P., Thompson S. Y., Walker D. M., Briggs C., Cotchin E., Lovell R., J. Dairy Sci., **3**, 187, 1949.
333. Hansen R. G., Phillips P. H., J. Biol. Chem., **171**, 223, 1947.

334. Laskowski M., Jr., Laskowski M., J. Biol. Chem., **190**, 563, 1951.
335. Kutner A., Ratner B., Am. J. Diseases Children, **25**, 413, 1923.
336. Mason J. H., Dalling T., Gordon W. S., J. Path. Bact., **33**, 783, 1930.
337. Moore D. H., Martin Du Pan R., Buxton C. L., Am. J. Obstet. Gynecol., **57**, 312, 1949.
338. Longsworth L. G., Curtis R. M., Pembroke R. H., J. Clin. Invest., 24, 46, 1945.
339. Vahlquist B., Etudes Neo-natales, **1**, No. 2, 31 (May 1952).
340. Cohen S. G., J. Infectious Diseases, **87**, 291, 1950.
341. Brambell F. W. R., Hemming W. A., Rowlands W. T., Proc. Roy. Soc. (London), **B135**, 390, 1948; **136**, 131, 1949; **137**, 239, 1950; **138**, 195, 1951.
342. Deutsch H. F., Goodloe M. B., J. Biol. Chem., **161**, 1, 1945.
343. Dayhoff M. O., Perlmann G. E., MacInnes D. A., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2515 (1952).
344. Perlmann G. E., Kaufman P., J. Am. Chem. Soc., **67**, 638, 1945.
345. Janeway C. A., Advances in Internal Med., **3**, 295, 1949.
346. Pillemer L., Hutchinson M. C., J. Biol. Chem., **158**, 299, 1945.
347. Kekwick R. A., Record B. R., Mackay M. E., Nature, **157**, 629, 1946.
348. Svensson H., J. Biol. Chem., **139**, 805, 1941.
349. Oncley J. L., Gurd F. R. N., in «Blood Cells and Plasma Proteins, Their State in Nature», ed. by James L. Tillis, Memoirs of University Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard University, No. 2, p. 338, Academic Press, New York, 1953.

ОБЩИЕ РУКОВОДСТВА

1. Tullis J. L. ed., Blood Cells and Plasma Proteins, Academic Press, New York, 1953.
2. Albritton E. C. ed., Standard Values in Blood, Saunders W.B. Co., Phila., Pa., 1952.
3. Lipoproteins, Disc. Faraday Soc., **6**, 1949.
4. Blood Clotting and Allied Problems (Trans. Josiah Macy, Jr. Conf., N.Y.), vol. 1—4, 1948—1951.
5. Astrup T., Biochemistry of Blood Coagulation, Store Nordiske Videnskabsboghandel, Copenhagen, 1944.
6. Owren P. A., The Coagulation of Blood, Acta Med. Scand. Suppl., **194**, 1947.
7. The Physiology and Pathology of Hemostasis, Lea & Febiger, Phila., 1951.
8. «Blood Coagulation», Chap. 35 in The Enzymes, vol. I, part 1, ed. by Sumner J. B. and Myrbäck K., Academic Press, New York, 1950.
9. Pappenheimer A. M., Jr, ed., The Nature and Significance of the Antibody Response, Columbia University Press, New York, 1953.
10. Immunochemistry, Biochem. Soc. Symposia, No. 10, Cambridge University Press, London, 1953.

VI

ДЫХАТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Ф. Гауровитц и *Р. Хардин*

F. Haurowitz and R. Hardin, «Respiratory Proteins»
(vol. II, part A, pp. 279—344)

1. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ [1, 2]

Дыхательные белки—это белки, способные соединяться с молекулярным кислородом и отщеплять молекулы кислорода при низких давлениях газа. Растворы этих белков связывают значительно больше кислорода, чем растворы других веществ. Концентрация дыхательных белков в крови иногда очень высока, и в этом случае они действуют не только как переносчики кислорода, но и как буферы и регуляторы pH крови.

Дыхательные белки издавна привлекали внимание физиологов и биохимиков не только потому, что они важны как переносчики кислорода, но также и вследствие их интенсивной окраски и способности многих из них легко образовывать красивые кристаллы. Дыхательный белок позвоночных и некоторых беспозвоночных—гемоглобин, по-видимому, наиболее хорошо изучен из всех белков.

Хотя каждый из дыхательных белков встречается только у животных определенных видов, однако строгого соответствия между их распространенностью и зоологической классификацией животных не имеется.

Широко распространенный гемоглобин встречается не только у всех позвоночных, но и у более низших животных. Так, его находят у некоторых ракообразных [3], по крайней мере у одного гастропода (пресноводная улитка *Planorbis*), у многих кольчатых червей, у отдельных нематод (некоторые виды кишечных паразитов *Ascaris*), у одного класса иглокожих (*Holothuroidea*), у мшанки (*Phoronis*) и даже у парамеций. У простейших хордовых гемоглобина нет [4, 5]. Большинство насекомых также лишены гемоглобина, который не является необходимым при их системе дыхательных путей. С другой стороны, гемоглобин был недавно обнаружен в корневых узелках бобовых [6].

Гемоцианин—дыхательный белок, содержащий медь,—встречается лишь у моллюсков (цефалопода и гастропода) и ракообразных. Хлорокруорин—зеленый дыхательный белок—имеется у представителей только двух особых групп полихастов. Встречаемость хлорокруорина изменяется не только от рода к роду, но также

и в пределах некоторых отдельных родов многощетинковых червей. Так, *Spirorbis corrugata* содержит только гемоглобин, *Spirorbis borealis*—только хлорокруорин, а *Spirorbis militaris* не содержит пигмента, и их кровь бесцветна [7]. Некоторые разновидности *Serpula* содержат и гемоглобин и хлорокруорин, причем первый преобладает у молодых, а второй—у взрослых особей [7]. Гемэритрин—коричневый дыхательный белок—найден только у некоторых Sipunculoides.

У млекопитающих гемоглобин содержится в безъядерных эритроцитах. Низшие позвоночные имеют ядерные красные клетки, цитоплазма которых содержит гемоглобин. Не ясно, образуется ли гемоглобин сначала в цитоплазме или в ядрах эритробластов, представляющих собой ядерные клетки, из которых получаются безъядерные красные клетки. При гомогенизации и фракционировании эритроцитов посредством дифференциального центрифугирования гемоглобин отделяется с микросомами [8].

Внутриклеточные гемоглобины, выделяемые из эритроцитов, имеют низкие молекулярные веса—от 17 000 до 68 000, в то время как молекулярные веса внеклеточных гемоглобинов, находящихся в тканевых жидкостях беспозвоночных, достигают нескольких миллионов. Внеклеточные гемоглобины вследствие их высокого молекулярного веса не могут значительно повышать осмотическое давление тканевых жидкостей [9]. Внеклеточные гемоглобины отличаются от внутриклеточных не только большим молекулярным весом, но и более высокой кислотностью. Внеклеточные гемоглобины были названы эритрокруоринами [10]. Однако различные гемоглобины и эритрокруорины имеют некоторые общие физико-химические свойства. Поэтому нет определенного критерия для отличия гемоглобина от эритрокруорина [11].

Концентрация гемоглобина в эритроцитах крови млекопитающих весьма постоянна: она изменяется приблизительно от 30 до 34% [12]. Высокое содержание гемоглобина в эритроцитах указывает на относительно близкое расположение молекул гемоглобина друг к другу [13]. Общее содержание гемоглобина в теле млекопитающих составляет примерно 12,7 *г/кг* [14]. Концентрация гемоглобина в цельной крови животных разных видов не одинакова вследствие значительных различий в числе эритроцитов в 1 *мл* крови и их величине. Так, кровь овцы содержит около 9%, а кровь лошади—приблизительно 17% гемоглобина [15].

Концентрация гемоглобина в крови здорового человека равна приблизительно 14,5%. Концентрация гемоглобина возрастает при низких давлениях кислорода, например на больших высотах. Подобный компенсаторный механизм наблюдается у водяной блохи *Daphnia*, у которой при недостатке кислорода количество гемоглобина возрастает, а в хорошо аэрированной воде уменьшается [16].

Миоглобин является дыхательным белком, находящимся в красных мышечных волокнах. Его структура и функция подобны структуре и функции гемоглобина. Филогенетически миоглобин соответствует внеклеточным гемоглобинам беспозвоночных, но не внутриклеточным гемоглобинам позвоночных [17].

2. ГЕМОГЛОБИН [18—21]

А. Приготовление и очистка гемоглобина и оксигемоглобина

Первая стадия приготовления чистого гемоглобина или его окисленной формы—оксигемоглобина—заключается в получении отмытых эритроцитов, не содержащих белков плазмы. Дефибринированную или оксалатную кровь центрифугируют, и осажденные эритроциты повторно промывают изотоническим солевым раствором.

Гемолиз отмытых эритроцитов достигается добавлением воды. Если разбавление водой нежелательно, то гемолиз осуществляют повторным замораживанием и оттаиванием, добавлением небольших количеств сапонина [22], обработкой эритроцитов эфиром [23] или толуолом [24]. Интересно, что в некоторых случаях гемолиз приводит непосредственно к кристаллизации оксигемоглобина, например при гемолизе эритроцитов крыс. Очевидно, в этом случае концентрация гемоглобина и оксигемоглобина в эритроцитах выше, чем в насыщенном водном растворе.

Приготовление оксигемоглобина в значительных количествах впервые описал Хоппе-Зейлер [25], который получил кристаллы при осторожном добавлении холодного этилового спирта к охлажденному раствору оксигемоглобина. Хотя при этом гемоглобин легко кристаллизуется, но его кристаллы загрязнены нерастворимой стромой эритроцитов, если она не удалена до прибавления спирта. Строму удаляют путем высокоскоростного центрифугирования, адсорбцией на окиси алюминия [26, 27] или посредством флотации с толуолом [24, 28]. Денатурирующее действие этилового спирта можно свести к минимуму, если получать кристаллы в холодильнике при температуре приблизительно —12°. Этим способом можно получить значительные количества кристаллов оксигемоглобина из крови быка, овцы или свиньи; чтобы вызвать кристаллизацию, концентрацию этилового спирта необходимо довести до 40% и более.

Кристаллизация гемоглобина и оксигемоглобина происходит легче при слабокислой реакции, поскольку изоэлектрические гемоглобин и оксигемоглобин менее растворимы, чем их щелочные соли. Подкисление производят соляной кислотой, осторожно добавляя ее до pH 6,6 [29], или пропусканием через раствор углекислого газа [24]. Кристаллизация также облегчается при уменьшении содержания солей в растворе, так как при этом предотвращается

увеличение растворимости («солевой эффект»). Уменьшение содержания солей достигается диализом против дистиллированной воды [30, 31]. Нежелательное разбавление можно предотвратить, проводя диализ при отрицательном давлении [32]. Разбавленные растворы гемоглобина можно сконцентрировать медленным замораживанием с последующим медленным оттаиванием. Если эти операции производить так, что расплавленный раствор не перемешивается, то получается два слоя: верхний бесцветный и нижний темно-красный, представляющий собой концентрированный раствор гемоглобина. Последний отбирают пипеткой и подвергают кристаллизации при охлаждении [28]. Кристаллические препараты гемоглобина человека и других гемоглобинов получают также «высаливанием» или, лучше, диализом против насыщенного раствора сульфата аммония или против 2,8 *М* фосфатного буфера с pH 6,8 [33].

Растворимость гемоглобинов разного происхождения весьма различна. Гемоглобины овцы, свиньи, быка и кролика, а также человека легко растворимы. Гемоглобины лошади и собаки менее растворимы и легче кристаллизуются. Легко образуются кристаллы наименее растворимых гемоглобинов крысы и морской свинки. Весьма обстоятельно изучена растворимость карбоксигемоглобина (карбонилгемоглобина) человека в растворах нейтральных солей и ее зависимость от pH и ионной силы. При этом найдено, что по обе стороны от изоэлектрической точки [31] между растворимостью (при данной концентрации NaCl) и квадратом активности водородных ионов (или ее обратной величиной) существует линейная зависимость [34].

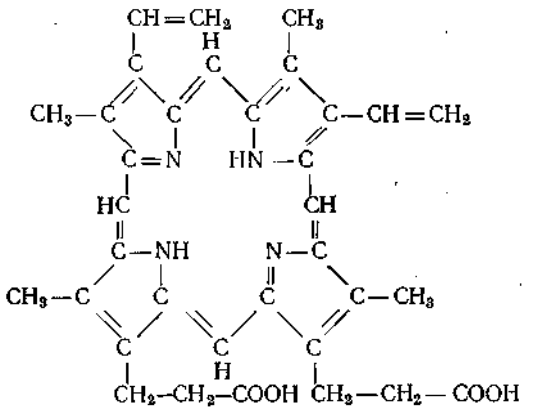
Гемоглобин является одним из немногих белков, разновидности которого резко отличаются по форме кристаллов [35]. Оксигемоглобин крови лошади кристаллизуется в моноклинических иглах [27], морской свинки—в тетраэдрах, собаки—в орторомбических иглах [27], человека—в орторомбических симметричных бипирамидах [33]. Хотя при переходе гемоглобина в оксигемоглобин к 17 000 *г* первого присоединяется только 32 *г* кислорода, формы кристаллов этих белков часто неодинаковы [36].

Препараты оксигемоглобина не очень устойчивы; кислород медленно окисляет как простетическую группу, так и белковую часть молекулы. В сухих препаратах оксигемоглобина двухвалентное железо очень легко окисляется до трехвалентного [37]. Вследствие этого невозможно получить устойчивые сухие препараты оксигемоглобина. Окисление можно предотвратить, проводя работу в атмосфере окиси углерода; при этом получаются изоморфные кристаллы карбоксигемоглобина, более устойчивые, чем кристаллы оксигемоглобина. При высушивании в вакууме гемоглобин переходит в ангидрогемоглобин, дающий отличный от гемоглобина спектр поглощения [38]. На воздухе ангидрогемоглобин окисляется

в содержащий трехвалентное железо комплекс—метгемоглобин [37, 38]. Воздушно-сухие препараты гемоглобина, оксигемоглобина и их производных содержат приблизительно 10% воды [30, 38].

Б. Простетическая группа

Простетическая группа гемоглобина является протогемом, т. е. комплексом протопорфирина IX, содержащим двухвалентное железо. Порфирины являются производными порфина. Протопорфирин IX представляет собой порфин, замещенный в положениях 1, 3, 5 и 8 метильными группами, в положениях 2 и 4—винильными группами и в положениях 6 и 7—остатками пропионовой кислоты. Комплексы порфирина, содержащие двухвалентное железо, называются гемами, комплексы с трехвалентным железом—геминами. Кюстер [39] выяснил структуру порфирина и гемина, а Г. Фишер и Орс [40] синтезировали эти вещества.



Протопорфирин IX

Если эритроциты или концентрированный раствор оксигемоглобина прямо вносят в горячую ледяную уксусную кислоту, содержащую достаточное количество NaCl, то образуются кристаллы хлористого протогемина (кристаллы Тейхмана). Аналогичным образом можно получить бромистый и иодистый протогемины. Во всех этих соединениях ион трехвалентного железа замещает водородные атомы двух иминогрупп, третий положительный заряд нейтрализуется анионом галоидоводородной кислоты. В состав гемоглобина и оксигемоглобина входит двухвалентное железо, легко окисляемое в кислых растворах кислородом воздуха. Поэтому при подкислении растворов оксигемоглобина до $pH<3$—4 происходит образование метгемоглобина, содержащего трехвалентное железо. Если подкисление производится в отсутствие кислорода или при наличии

восстановителя, то происходит отщепление ионов двухвалентного железа и вместо протогемина получается протопорфирин, не содержащий железа [40а]. Комплекс, содержащий двухвалентное железо—протогем—не устойчив. Его можно получить восстановлением щелочных растворов протогемина.

Рассмотрение химии порфиринов, гемов и геминов не входит в задачу данной главы. Структуру порфиринов и их металлических комплексов обстоятельно рассмотрели Г. Фишер и Орс [40], которые внесли большой и ценный вклад в эту область. Здесь будут затронуты лишь те вопросы, которые непосредственно относятся к химии гемоглобина и его производных. Одним из таких вопросов является лабильность винильных боковых цепей протогемина. Винильные группы способны реагировать с водой, метиловым спиртом и другими веществами. Обработка оксигемоглобина концентрированной серной кислотой с последующим разбавлением водой приводит к образованию гематопорфирина, в котором две винильные группы протопорфирина замещены оксиэтильными группами:

$$-CH=CH_2+H_2O \longrightarrow -CHOHCH_3.$$

Гематопорфирин не встречается в теле животных, как это предполагалось ранее.

При действии бактерий на гемоглобин образуется свободный протопорфирин, или дейтеропорфирин, или оба одновременно. В дейтеропорфирине винильные группы замещены водородными атомами [40]. Протопорфирин и дейтеропорфирин, как и их комплексы, содержащие трехвалентное железо, образуются в пищеварительном тракте человека при действии бактерий на гемоглобин, поступающий с пищей или появляющийся в результате кровоизлияния [41].

При восстановлении винильных групп *in vitro* получается мезопорфирин. Этот порфирин не встречается в теле животных, однако является важным производным, которое часто используется для доказательства наличия протопорфирина. Мезопорфирин гораздо более устойчив, чем протопорфирин, так как он содержит насыщенные боковые цепи.

Протогемин получается из оксигемоглобина не только при действии горячей ледяной уксусной кислоты, но и при действии других подкисленных органических растворителей, например этилового спирта или ацетона, содержащих соляную [42] или щавелевую [43] кислоту. Если применять минеральную кислоту и метиловый или этиловый спирт, то пропионовая кислота в боковых цепях гемина этерифицируется, причем образуются эфиры протогемина. В некоторых более старых методах получения гемина не принимались меры для защиты боковых цепей гемина от побочных реакций, и в результате получались смеси различных геминов. Это послужило

поводом к предположению, что гемоглобин содержит различные гемины, названные α-, β- и γ-геминами. Последние, однако, являются артефактами. Если приняты меры для предотвращения побочных реакций, в которые могут вступить винильные группы боковых цепей, то из всех известных гемоглобинов получается только кристаллический α-гемин, идентичный с протогемином.

Связь между гемом и белковым остатком—глобином—весьма прочна в щелочных растворах. Обработка гемоглобина разбавленным раствором NaOH приводит к образованию глобин-гемохромогена [44]. При нагревании гемоглобина с 2 н. раствором NaOH при 85° получается продукт, который содержит, кроме гемина, некоторые части белкового компонента [45]. Поскольку этот продукт устойчив и по отношению к кислотам, по-видимому, в веществе, обработанном щелочью, образуется новая связь между гемом и глобином.

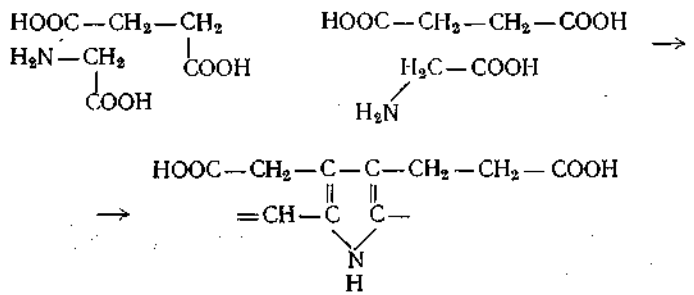
При обработке гемоглобина пепсином в разбавленной соляной кислоте получаются гематин (гидроокись железопротопорфирина) и гемин; белковая часть гемоглобина превращается при этом в растворимые полипептиды. Концентрированные растворы нативных гемоглобина и оксигемоглобина более устойчивы к действию папаина или трипсина [46]; разбавленные растворы или денатурированные препараты легко перевариваются указанными ферментами [47—49]. Однако при этом переваривании никогда не образуется гем или гемин, но всегда получается «геминпротеоза», которая, кроме всего гемина, содержит фрагменты белковой части гемоглобина. Эти фрагменты составляют 40—60% получаемого вещества [46]. Геминпротеоза не разрушается при действии на нее ледяной уксусной кислоты, ацетона и HCl, а также пепсина. Очевидно, в результате обработки трипсином или папаином между гемом и фрагментами белка образуется устойчивая связь.

Содержание гема в гемоглобине можно вычислить по содержанию в последнем железа, так как все железо находится в простетической группе. Все известные гемоглобины, как это было впервые установлено Зиновским [50], а позже подтверждено многими исследователями, содержат 0,33—0,34% железа. Так как протогем содержит 9,1% железа, то содержание гема в гемоглобине составляет 33,5 : 9,1=3,68%.

Уже давно установлено, что сложные структуры порфиринов и геминов могут возникать в костном мозгу позвоночных, однако ничего не было известно о их предшественниках. Эта проблема стала доступной для экспериментального исследования после того, как было установлено, что меченные изотопами ацетат [51] и глицин [52] включались в систему порфиринового кольца. Установленное явление быстрого образования гема *in vitro*, происходящего при инкубации ядерных эритроцитов утки с добавлением глицина [53], облегчило дальнейшие исследования. Образование

гема происходило значительно медленнее в случае безъядерных эритроцитов кролика [54].

Все четыре атома азота и восемь атомов углерода, входящие в систему порфиринового кольца, происходят из глицина. При этом в систему порфиринового кольца включаются только α-углеродные атомы глицина, но не его карбоксильные группы; они образуют четыре метиновые группы и четыре α-углеродных атома пиррольного кольца [55, 56, 56а]. Углерод C^{14}-ацетата обнаружен в винильных группах, в пропионовой кислоте боковых цепей, в метильных группах, а также в пиррольных кольцах [56, 57]. Ацетат может превращаться в C_4-соединение, например в янтарную кислоту; две молекулы C_4-соединения взаимодействуют с глицином по следующей схеме [58]:



Четыре полученных таким образом пиррольных остатка затем конденсируются, образуя порфирин, в который входят в виде боковых цепей четыре группы уксусной кислоты и четыре группы пропионовой кислоты.

Такие порфирины уже давно известны как уропорфирины. При декарбоксилировании групп уксусной кислоты образуется копропорфирин (тетраметилпорфиринтетрапропионовая кислота). Если от двух групп пропионовой кислоты, находящихся в боковых цепях копропорфирина, отщепляются две молекулы муравьиной кислоты, то образуются винильные группы

$$-CH_2CH_2COOH \longrightarrow -CH=CH_2 + HCOOH$$

и копропорфирин превращается в протопорфирин. Хотя эта последовательность реакций не была доказана, она является весьма вероятной, так как в теле животных находят небольшие количества уро- и копропорфиринов, образование которых в больших количествах происходит при патологическом состоянии.

Продолжительность существования гема вычисляли из скорости круговорота меченного изотопом гема; она оказалась равной в среднем 120 дням у мужчин и 109 дням у женщин [59]. В случае пернициозной анемии продолжительность существования гема умень-

шается до 85 дней, а при серповидной анемии—до 42 дней; в то же время при истинной полицитемии она возрастает до 131 дня [59].

В. Глобин

Белковый компонент гемоглобина называется глобином. Денатурированный глобин легко получается обработкой оксигемоглобина млекопитающих большим избытком этилового спирта или ацетона, содержащих соляную или серную кислоту [60]. При этом гемин переходит в органический растворитель, а солянокислый или сернокислый белок выпадает в виде белого осадка. Осадок растворяется в воде и может быть снова осажден аммиаком; так как осаждаемость аммиаком типична для гистонов, то глобин в течение длительного времени относили к группе гистонов [60]. В 1926 г. Хилл и Холден [42] показали, что при расщеплении оксигемоглобина кислотой при низких температурах и удалении гемина экстракцией эфиром получается глобин с совершенно иными свойствами, растворимый в разбавленных растворах аммиака. Такой же нативный глобин получается обработкой оксигемоглобина холодным ацетоном, содержащим соляную или щавелевую кислоту [43, 61].

В противоположность денатурированному глобину нативный глобин соединяется при pH 8—9 с протогемином, образуя метгемоглобин, который при добавлении восстановителей, например $Na_2S_2O_4$ превращается в гемоглобин. Этот «синтетический» гемоглобин соединяется с кислородом так же, как и естественный гемоглобин, образуя типичный оксигемоглобин [42, 62, 63].

Нативный глобин крайне легко денатурируется и значительно менее устойчив, чем гемоглобин. Соединение нативного белка с гемом до некоторой степени защищает белок от действия денатурирующих агентов и протеолитических ферментов [46—49]. Изоэлектрическая точка нативного глобина, выделенного из крови лошади, pH 6,9—7,0 [62], а у денатурированного белка она приблизительно pH 8,1 [64]. Нативный глобин из крови лошади растворим в полунасыщенном растворе сульфата аммония, но высаливается при 60-процентном насыщении [42]. В соответствии с этим его следует отнести к альбуминам. Однако глобины других видов имеют иные растворимости в растворах сульфата аммония [65]; некоторые глобины ведут себя в этом отношении как глобулины.

Слабоосновные свойства глобина крови позвоночных определяются высоким содержанием в нем гистидина, которое колеблется от 7,8 до 8,6% [1]. Глобины из крови беспозвоночных содержат только 4,0—4,7% гистидина и имеют изоэлектрическую точку, близкую к pH 5 [1]. Ни нативный, ни денатурированный глобин не содержат свободных сульфгидрильных групп, реагирующих с нитропруссидом [66]. Однако в денатурированном глобине сульф-

гидрильные группы можно обнаружить титрованием порфиринди-дином [67] или по их взаимодействию со свободным цистином [68].

Денатурированный глобин соединяется с одной или несколькими молекулами гемина, образуя комплекс, совершенно отличный от метгемоглобина. Аналогичный продукт, называемый катгемоглобином, получается при денатурации оксигемоглобина едким натром с последующей нейтрализацией раствора. Растворы катгемоглобина в нейтральном 60-процентном этиловом спирте окрашены в красный цвет. При нагревании растворов катгемоглобина последний диссоциирует на гемин и денатурированный глобин, на что указывает изменение окраски раствора от красной до коричнево-зеленой [69—72]. При восстановлении водных растворов денатурированного глобина и гемина получается не гемоглобин, а глобин-гемохромоген, который, подобно всем гемохромогенам, имеет интенсивную полосу поглощения в области 556—558 *мμ* и менее интенсивный максимум поглощения при 525—529 *мμ* [42, 72]. Аналогичные гемохромогены получаются при соединении гема с такими основаниями, как пиридин или аммиак. Молекула гема в глобин-гемохромогене, по-видимому, связана с основными группами молекулы глобина. В противоположность гемоглобину глобин-гемохромоген не может соединяться с молекулярным кислородом.

Денатурация гемоглобина и оксигемоглобина может быть вызвана различными видами денатурирующих агентов. Во всех случаях денатурации получаемые продукты в нейтральной среде имеют коричневую окраску, а при восстановлении переходят в розовый глобин-гемохромоген. Денатурация происходит также при растекании растворов оксигемоглобина на поверхности раздела вода—масло; при восстановлении таких слоев $Na_2S_2O_4$ получаются продукты, дающие спектр поглощения, типичный для гемохромогена [73].

Теплоту денатурации метгемоглобина определяли калориметрически по разности теплот нейтрализации нативного и денатурированного метгемоглобинов едким кали; она оказалась равной примерно 138 *ккал/моль* [74]. Денатурация гемоглобина путем нагревания при 80° и выше является необратимым процессом. Если гемоглобин нагревают при более низких температурах и не очень долго, то наблюдается некоторая обратимость процесса [61]. Кинетика тепловой денатурации гемоглобина исследована весьма обстоятельно. Энергия активации денатурации в водном растворе при pH 6,8 между 60,5 и 68° равна приблизительно 77 *ккал/моль*; свободная энергия активации ΔF_+^+ при 60,5° составляет около 25 *ккал/моль*; энтропия активации ΔS_+^+ равна приблизительно 152 энтропийным единицам (э. е.) [75]. В концентрированных растворах сульфата аммония и в смесях этиловый спирт—вода ΔS_+^+ возрастает до 300 э. е., в то время как ΔF_+^+ не изменяется; в кислых

растворах при pH 4,08 $\Delta S_+^+ = -33{,}7$ э. е., $\Delta F_+^+ = 20{,}9$ *ккал/моль* и теплота активации $\Delta H_+^+ = 11{,}1$ *ккал/моль* [75].

Полному аминокислотному анализу до сих пор был подвергнут только глобин из крови лошади; число аминокислотных остатков в одной молекуле с молекулярным весом 68 000 указано в табл. 36 [76].

Таблица 36

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ГЕМОГЛОБИНА ЛОШАДИ
(число остатков каждой аминокислоты в молекуле гемоглобина с молекулярным весом 68 000)

Аминокислота	Число в молекуле гемоглобина	Аминокислота	Число в молекуле гемоглобина
Глицин	48	Аргинин	14
Аланин	54	Гистидин	36
Валин	50	Лизин	38
Лейцин	75	Аспарагиновая кислота	51
Изолейцин	0	Глутаминовая кислота	38
Пролин	22	Аммиак	36
Фенилаланин	30	Серин	35
Цистеин	3	Треонин	24
Цистин/2	2,5	Тирозин	11
Метионин	4,5	Триптофан	5

Неожиданное следствие, вытекающее из результатов этого анализа, заключается в том, что числа аминокислот не кратны четырем, несмотря на то, что молекула гемоглобина лошади содержит четыре атома железа и, по-видимому, состоит из четырех субъединиц, эквивалентный вес каждой из которых равен 17 000. Очевидно, эти четыре субъединицы не идентичны. Другой неожиданный результат заключается в том, что числа остатков цистина и метионина в молекуле гемоглобина не являются целыми.

Число аминокислот, содержащих серу, в молекуле глобина очень невелико, поэтому изменения в отношениях количеств этих аминокислот к количеству железа могут давать ценные сведения относительно различий между субъединицами, составляющими молекулу гемоглобина. Результаты определений общей серы, серы, входящей в состав цистина и цистеина, и серы, содержащейся в метионине, представлены в табл. 37. Поскольку раздельное определение цистина менее надежно, чем определение суммы этих двух аминокислот, то содержание серы в них выражено суммарно.

Таблица 37

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРЫ В ГЕМОГЛОБИНАХ

Отношение	Бык	Овца	Лошадь	Собака	Человек	Ссылка на литературу
Общая S/Fe	—	4	2	3	—	77
Цист./Fe	—	—	1,37	—	—	76
	1,52	0,82	0,86	—	1,7	78, 79
	—	0,56	0,28	0,84	—	80
	—	0,55	0,56	—	0,80	78
	0,31/0,46	—	0,45/0,62	1,08/1,29	0,70/0,93	81
	—	0,84	0,58	1,62	—	77
Мет./Fe	—	—	1,12	—	—	76
	1,9/2,1	—	0,98/1,13	0,31/0,46	1,5/1,63	81
	1,3	1,3	0,8	—	1,7	78, 79

Неустойчивость значений, представленных в табл. 37, свидетельствует о том, что или величина отношений изменяется от индивидуума к индивидууму для одного и того же вида животного, или недостаточна точность аналитических определений. Хотя нельзя исключить отдельные колебания, все же ясно, что аналитические методы не удовлетворительны. Это, вероятно, связано с окислением кислородом в процессе гидролиза некоторых содержащих серу аминокислот, которое катализируется железом, содержащимся в геме.

Число свободных аминогрупп в гемоглобине, определяемое при помощи реакции с азотистой кислотой, очень велико; если вычесть из общего аминоазота число ε-аминогрупп лизина, то получается очень большая цифра, а именно 16 α-аминогрупп на одну молекулу гемоглобина [82]. Прямым определением концевых α-аминогрупп при помощи динитрофторбензола установлено, что молекула гемоглобина лошади имеет шесть концевых аминогрупп, принадлежащих остаткам валина [76], т. е. 1,5 концевого остатка валина на атом железа. Это также указывает на то, что четыре субъединицы, образующие молекулу гемоглобина, различны.

При частичном гидролизе гемоглобина пепсином получается только одна аминокислота—фенилаланин—в свободном состоянии [83]; при неполном гидролизе трипсином или химотрипсином получается фракция, осаждаемая трихлоруксусной кислотой, содержание лизина в которой незначительно; наибольшее количество лизина находится в неосаждаемых продуктах распада [83]. Частичный гидролиз трипсином также указывает на наличие в гемоглобине нескольких γ-глутамилпептидных связей [84]. Богатый гистидином гидролизат получается при неполном гидролизе глобина лошади серной кислотой (70% по объему) при 40° [85].

Образование и скорость круговорота глобина *in vivo* исследовали путем введения C^{14}-лизина. Установлено, что время, необходимое для образования глобина в костном мозгу собак, равно приблизительно 3—5 дням, а продолжительность существования глобина с момента его образования—примерно 115 дням [86]. Значительная часть инъецированного меченого углерода была обнаружена в геме гемоглобина вследствие промежуточного образования глутаминовой кислоты из C^{14}-лизина [87]. Интересно, что C^{14}-валин, который образует N-концевые аминокислоты гемоглобина крысы, включается с одинаковой скоростью как в эти концевые положения, так и в другие положения внутри пептидной цепи; это доказывает, что биосинтез глобина происходит в течение очень непродолжительного времени и что образование его молекулы протекает в одну фазу [56а].

Г. Величина и форма молекул гемоглобина

Все известные гемоглобины позвоночных содержат 0,33—0,34% железа, откуда следует, что их эквивалентный вес в среднем равен 16 700 $\left(\frac{100 \times 55{,}84}{0{,}335}\right)$.

Действительно, первые осмометрические измерения молекулярного веса гемоглобина лошади дали величину 16 700 [88]. После усовершенствования осмометрического метода и введения условий постоянства ионной силы и pH среды это значение молекулярного веса гемоглобина, принимавшееся в течение многих лет, не подтвердилось. Молекулярный вес изоэлектрического оксигемоглобина, измеренный при низких температурах, оказался равным 68 000, т. е. величине, почти в 4 раза большей 16 700 [89, 90]. Адер [89], проводивший эти определения исключительно тщательно, нашел также, что молекулярный вес нативного глобина из крови лошади или быка составляет приблизительно половину молекулярного веса оксигемоглобина, но что при денатурации снова происходит полимеризация [91]. Значение 68 000 для молекулярного веса гемоглобина позвоночных было подтверждено измерениями скорости диффузии [91] и определениями седиментационного равновесия при помощи ультрацентрифуги [10]. Это значение в настоящее время общепринято. Аналогичное значение было вычислено из кривых сила—площадь, полученных для конденсированных мономолекулярных пленок гемоглобина [92].

При добавлении мочевины эффективный молекулярный вес гемоглобина понижается до половины его исходного значения, равного 68 000 [93, 94]. Аналогичное явление наблюдается при повышении концентрации нейтральных солей в растворах гемоглобина до 1 *моль/л* [95] или при понижении давления, производимого мономолекулярной пленкой гемоглобина, т. е. при пере-

ходе конденсированной пленки в растянутую газообразную пленку [92]. Примечательно, что диссоциация гемоглобина на частицы с молекулярным весом, равным половине исходной величины, не сопровождается каким-либо изменением его способности связывать 1 моль кислорода на 1 моль гема [94]. Очевидно, диссоциация молекулы гемоглобина на меньшие частицы не обязательно связана с денатурацией молекулы. Легкость, с которой частицы, имеющие молекулярный вес 68 000, подвергаются дезагрегации, дает основание предполагать, что субъединицы связаны одна с другой не ковалентными связями, а слабыми силами.

Гемоглобины всех позвоночных, за исключением гемоглобина круглоротых, имеют эффективный молекулярный вес около 68 000 и изоэлектрическую точку, близкую к pH 7; соответствующие же величины для гемоглобинов беспозвоночных изменяются в широком интервале, как это видно из табл. 38.

Таблица 38

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС И ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА ГЕМОГЛОБИНОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

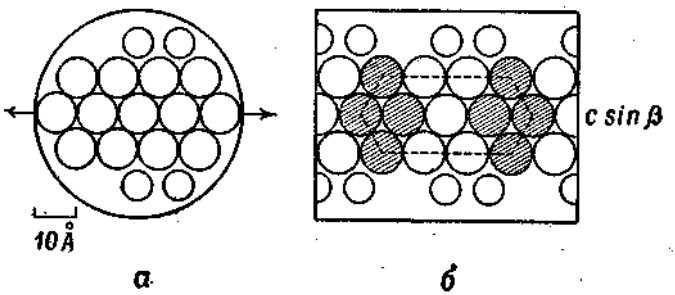
Вид	Молекулярный вес		Изоэлектрическая точка [1]
	осмометрический метод [1]	седиментация в ультрацентрифуге [10]	
Myxine glutinosa	—	34 000	6,0
Petromyzon fluviatilis	16 700	19 100	5,6
Chironomus plumosus	—	31 400	5,4
Daphnia pulex	—	360 000	—
Planorbis corneus	—	1 300 000	4,77
Arenicola marina	362 000	2 750 000	4,76
Glycera gigantea	56 600	34 000	5,6
Dasybranchus caducus	26 000	—	—
Lumbricus terrestris	—	2 750 000	5,28

Хотя совпадение между осмометрическими данными и данными, полученными при помощи ультрацентрифуги, не очень хорошее, все же из табл. 38 следует, что гемоглобины более низших животных значительно отличаются от гемоглобина типичных позвоночных не только кажущимся молекулярным весом, но и изоэлектрическими точками. В этом отношении некоторые гемоглобины беспозвоночных сходны с зеленым дыхательным белком—хлорокруорином, поэтому гемоглобин беспозвоночных решили назвать эритрокруорином [10].

Из табл. 38 видно, что гемоглобины низшего класса позвоночных—круглоротых (*Myxine* и *Petromyzon*) аналогичны гемоглобинам кольчатых червей (*Glycera* и *Dasybranchus*); все эти гемоглобины

с низким молекулярным весом находятся в красных кровяных тельцах. С другой стороны, высокомолекулярные гемоглобины улитки *Planorbis*, земляного червя *Lumbricus* и кольчатого червя *Arenicola* растворены в жидкостях тел этих животных [1].

Данные о форме молекул гемоглобина были получены в результате фундаментальных исследований Перутца [96], а также Брэгга и Перутца [97], получивших рентгенограммы единичных кристаллов гемоглобина и его производных. Согласно этим исследованиям,



Р и с. 30. Молекула гемоглобина (идеализированное представление).
а—проекция, показано расположение в окружности диаметром 52,2 Å; *б*—проекция соответствующей единичной ячейки.

молекулы гемоглобина с молекулярным весом 68 000 имеют грубо эллипсоидную форму с размерами $55 \times 55 \times 65$ Å; объем молекулы метгемоглобина лошади 83 000 Å^3 в сухом состоянии и 116 000 Å^3 во влажном состоянии [100]. Молекула гемоглобина образована тремя внутренними слоями, состоящими из полипептидных цепей, причем каждый из трех слоев содержит 4, 5 и 4 полипептидные цепи соответственно, и двумя внешними слоями, состоящими из 2—3 цепей каждый (рис. 30). Длина пептидных цепей менее 30 Å, на что указывает их незначительная способность к светорассеянию; внешние цепи короче внутренних. Цепи, вероятно, скручены в спирали, причем на каждый виток спирали приходится 3,7 аминокислотного остатка [98, 99]. Цепи, по-видимому, плотно упакованы, так как они непроницаемы для солей [100]. Различиям в форме кристаллов гемоглобина, оксигемоглобина и метгемоглобина, полученных из крови различных видов животных, соответствуют различия в рентгенограммах [100]. При осаждении карбоксигемоглобинов (карбонилгемоглобинов) из крови человека и лошади на стеарате бария получаются мономолекулярные пленки, толщина которых равна 38 и 26 Å соответственно [101].

Делались попытки определить форму молекул гемоглобина в водных растворах методом диффракции рентгеновских лучей, а также путем измерения диэлектрических инкрементов Первый метод [102] дает периоды идентичности 54,5 и 32,5 Å, что указы-

вает на наличие или сферических частиц диаметром 65 Å, или цилиндрических, диаметр основания которых равен 40 Å, а длина—63 Å [102]. Определения диэлектрической постоянной при различных частотах [20, 103] указывают на форму молекул в виде сплюснутых шаров с отношением осей, равным 2,0.

Д. Спектры поглощения гемоглобина и его производных [19, 104, 105]

Присоединение кислорода к гемоглобину и превращение последнего в другие производные, например в карбонилгемоглобин или метгемоглобин, сопровождаются характерными изменениями цвета и спектра поглощения в видимой области [106]. Поэтому методы спектроскопии и спектрофотометрии часто применяют для изучения равновесия между гемоглобином и кислородом или окисью углерода. Аналогичным образом можно изучать равновесие между метгемоглобином и фторидами, цианидами или перекисью водорода.

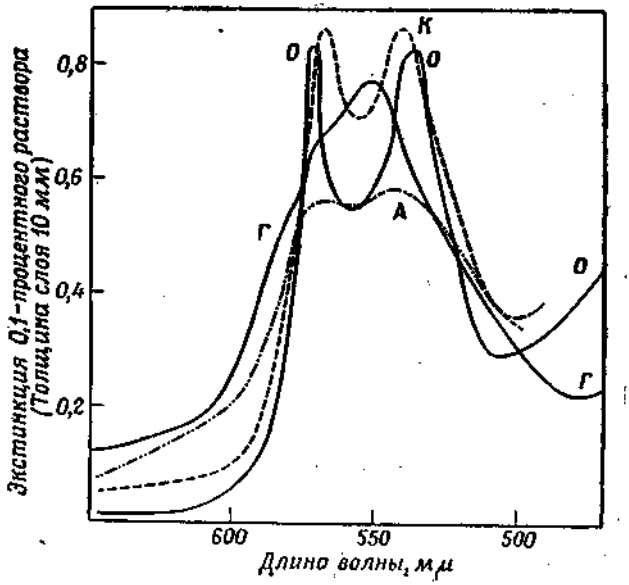
Поскольку гемоглобин и его производные являются коллоидами, их растворы не только поглощают падающий свет, но и частично рассеивают его. Тем не менее закон поглощения Бера применим для растворов гемоглобина в широком интервале концентраций [107]. Это объясняется главным образом тем фактом, что в красной области спектра, в которой растворы гемоглобина пропускают наибольшую часть падающего на них света, светорассеяние незначительно.

Вследствие того, что молекулярные веса гемоглобинов различного происхождения не одинаковы (см. раздел Г), для построения кривых поглощения нецелесообразно пользоваться молярными коэффициентами экстинкции. Для этой цели часто применяют «удельную экстинкцию», т. е. экстинкцию, которую проявляет 0,1-процентный раствор, заключенный в кювете высотой 1 *см*. Если E—наблюдаемая экстинкция раствора неизвестной концентрации, E_s—удельная экстинкция для света той же длины волны, то концентрация исследуемого раствора равна $c=E/E_s$.

Если раствор содержит несколько производных гемоглобина, то его экстинкция равна сумме экстинкций каждого компонента. Так, наблюдаемая экстинкция E смеси гемоглобина и оксигемоглобина для любой длины волны равна E_A+E_B, т. е. сумме экстинкций гемоглобина и оксигемоглобина. Если концентрации гемоглобина и оксигемоглобина в смеси c_A и c_B, а их удельные экстинкции—E_{sA} и E_{sB} соответственно, то их экстинкции в исследуемом растворе $E_A=c_AE_{sA}$ и $E_B=c_BE_{sB}$, следовательно, $E=c_AE_{sA}+c_BE_{sB}$, где все величины, за исключением c_A и c_B, известны. Производя измерения при двух различных длинах волн, получают два уравнения с двумя неизвестными. Таким путем часто определяют концентрацию гемоглобина c_A и оксигемоглобина c_B в их смесях.

Если экстинкцию измеряют при таких условиях, когда E_s для обоих пигментов одинакова, то их общую концентрацию $c = c_A + c_B$ можно определить из одного измерения.

На рис. 31 представлены удельные экстинкции гемоглобина и некоторых его производных для видимой части спектра [19]. Пурпурно-синий цвет гемоглобина объясняется тем, что его растворы в отличие от растворов оксигемоглобина поглощают только



Р и с. 31. Спектры поглощения гемоглобина (Г), оксигемоглобина (О), карбоксигемоглобина (К) и нитроксигемоглобина (А).

небольшую часть падающего света в синей части спектра между 400 и 490 *мμ* (см. рис. 31). С другой стороны, коричневый цвет кислых растворов метгемоглобина определяется интенсивным поглощением света в синей части спектра при 500 *мμ* (рис. 32). При небольших изменениях pH кривые поглощения гемоглобина, оксигемоглобина и карбоксигемоглобина заметно не изменяются. Однако спектр поглощения других производных гемоглобина, например метгемоглобина, зависит от pH, а также от концентрации комплексообразующих солей в растворах.

Полосы поглощения в видимой части спектра связаны с поглощением света интенсивно окрашенными простетическими группами гемоглобина и его производных, тогда как полоса поглощения в ультрафиолетовой части спектра при 275 *мμ* [108] появляется

в результате поглощения света ароматическими аминокислотами, содержащимися в глобине. Исключительно интенсивные полосы поглощения гемоглобина около 415 *мμ* и оксигемоглобина около 430 *мμ* были открыты Сорэ [109], и их часто называют полосами поглощения Сорэ. Поскольку порфирины и их комплексы с металлами имеют максимум поглощения такой же интенсивности в области 410—420 *мμ*, то полосы Сорэ приписывают гему гемоглобина.

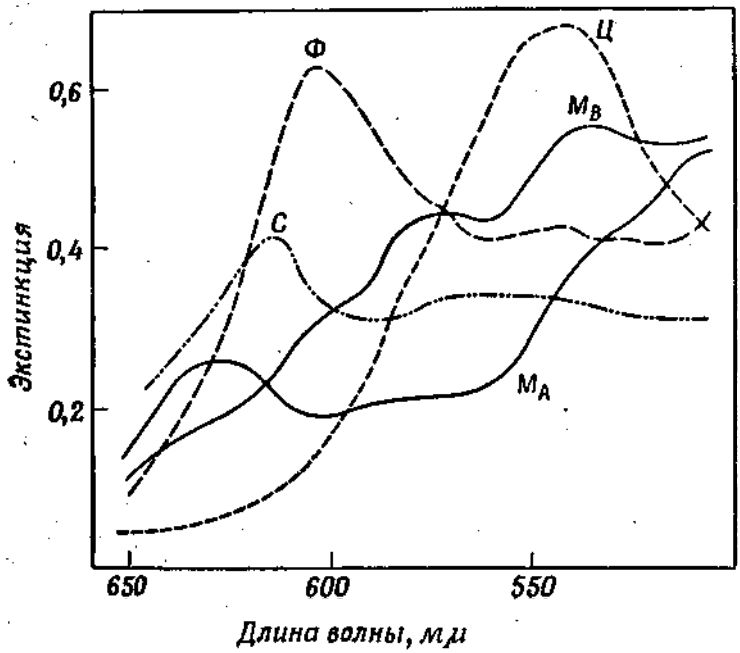
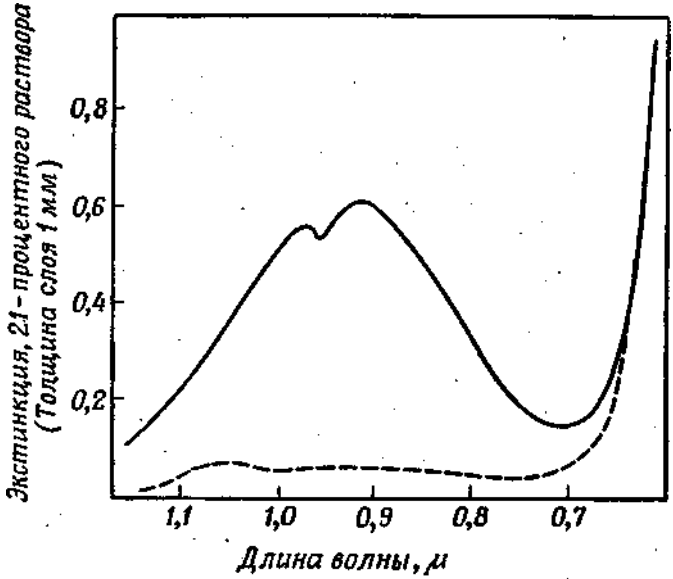


Рис. 32. Спектры поглощения метгемоглобина в кислотной (M_A) и щелочной (M_B) средах, цианид-метгемоглобина (Ц) и фторид-метгемоглобина (Ф) в 0,1-процентных растворах и сульфгемоглобина (С) в растворе приблизительно той же концентрации.

Аналогично незначительный максимум поглощения при 310 *мμ* (гемоглобин) и при 350 *мμ* (оксигемоглобин) связывают с поглощением света простетической группой [104, 108, 110].

Поглощение света водными растворами оксигемоглобина, а также карбоксигемоглобина в ближней инфракрасной области спектра показано на рис. 33 [111, 112]. Интересно, что в этой части спектра карбоксигемоглобин не имеет максимума поглощения, тогда как очень близкий к нему оксигемоглобин имеет четкий максимум поглощения при 0,92 *мμ*. Поэтому смеси этих двух пигментов можно анализировать методом инфракрасной спектрофотометрии.

Легко рассчитать кривые поглощения для смесей нескольких производных гемоглобина, однако не всегда просто решить, принадлежит ли новый спектр поглощения новому производному гемоглобина или смеси нескольких хорошо известных производных. Было показано, что многие пигменты, которые раньше принимались в качестве новых производных гемоглобина, представляют собой смеси хорошо известных веществ [113].



Р и с. 33. Спектры поглощения оксигемоглобина (——) и карбоксигемоглобина (- - - - -) в инфракрасной области [112].

Делались попытки измерить спектры поглощения гемоглобина и его производных в суспензиях эритроцитов и в цельной крови. Такие измерения имеют то преимущество, что исследование дыхательного белка производится в его естественной среде. Чтобы избежать осложнений, обусловленных интенсивным светорассеянием в подобных суспензиях, для измерений применяли адсорбционные кюветы высотой 0,07 *мм* [114] или пленки толщиной 3—10 μ [115]. По закону Рэлея, интенсивность рассеянного света обратно пропорциональна четвертой степени длины волны падающего света, поэтому потери, вызываемые светорассеянием, особенно велики для ультрафиолетовых лучей. Действительно, в спектре поглощения эритроцитов полоса Сорэ едва заметна [116]. Исходя из этого факта, некоторые исследователи пришли к ошибочному заключению, что дыхательные белки, содержащиеся в эритроцитах, отличаются от гемоглобина и оксигемоглобина, находящихся в водных растворах.

Е. Соединение гемоглобина с кислородом

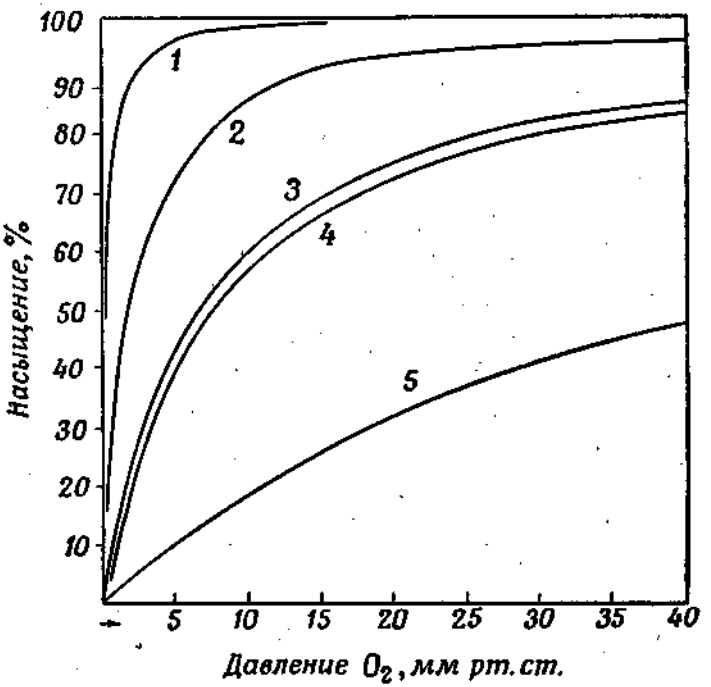
Основная функция гемоглобина состоит в связывании кислорода при высоких давлениях газа и освобождении связанного кислорода при низких давлениях. Таким образом гемоглобин соединяется с кислородом в легких, переносит его к тканям, где связанный кислород отщепляется и расходуется на окисление органических метаболитов. Максимальное количество кислорода, которое связывается 1 *г* гемоглобина, составляет 1,34 *мл* газообразного кислорода [117, 118]. Это точно соответствует одной молекуле кислорода на один атом железа. Все гемоглобины содержат 0,335% Fe, поэтому величина 1,34 *мл* O_2 на 1 *г* гемоглобина относится к гемоглобинам всех видов животных. Эта величина называется кислородной емкостью гемоглобина.

Отщепление кислорода от оксигемоглобина *in vitro* можно вызвать или понижением давления кислорода, или добавлением реагентов, восстанавливающих молекулярный кислород. Большинство обычных восстановителей денатурирует белковую часть гемоглобина, а некоторые, такие, как сульфид аммония, не только отщепляют кислород, но и приводят к образованию сульфгемоглобина. Наилучшим реагентом для отщепления кислорода от оксигемоглобина является дитионит натрия $Na_2S_2O_4$, который часто неправильно называют гидросульфитом натрия. При добавлении незначительных количеств дитионита натрия к растворам оксигемоглобина при pH 7—9 наблюдается быстрое превращение оксигемоглобина в гемоглобин. В кислых растворах дитионит натрия и продукты его окисления образуют SO_2 и вызывают денатурацию гемоглобина.

Кислородная емкость одинакова для всех гемоглобинов, сродство же гемоглобина к кислороду значительно изменяется в зависимости от вида животного, из крови которого получен гемоглобин [119, 120] (см. стр. 436, 437). Сродство к кислороду измеряется отношением количеств гемоглобина и оксигемоглобина при различных давлениях кислорода. Результаты подобных измерений обычно представляют в виде кривых, причем на оси абсцисс откладывают давление кислорода, а на оси ординат—процент насыщения гемоглобина кислородом. Крутой подъем кривой насыщения указывает на высокое сродство к кислороду; плоская кривая насыщения характерна для гемоглобинов с низким сродством к кислороду (рис. 34).

При добавлении к растворам гемоглобина нейтральных солей сродство гемоглобина к кислороду понижается. Солевой эффект возрастает в следующем порядке: NaCl, KCl, цитрат натрия, фосфат натрия [108, 121, 122]. Сродство гемоглобина к кислороду уменьшается при понижении pH [21]. Поэтому при высоких давлениях двуокиси углерода кислород легче отщепляется от оксигемо-

глобина [124]. Уменьшение сродства гемоглобина к кислороду происходит также при повышении температуры. Теплоту присоединения кислорода к гемоглобину можно вычислить по уравнению Аррениуса на основании данных, полученных при изучении



Р и с. 34. Кривые диссоциации оксигемоглобина при различных температурах [21].
1—оксигемоглобин человека (15°); *2*—оксигемоглобин моллюска Planorbis (12°); *3*—оксигемоглобин лягушки (15°); *4*—оксигемоглобин человека (35°); *5*—оксигемоглобин лягушки (35°).

равновесия гемоглобин $\rightleftarrows$ оксигемоглобин при различных температурах; присоединение кислорода к гемоглобину является экзотермическим процессом, ΔH которого равно приблизительно $+10$ *ккал/моль* [123]. Та же величина была найдена прямыми калориметрическими измерениями [123].

Соединение гемоглобина с кислородом наиболее просто можно представить уравнением

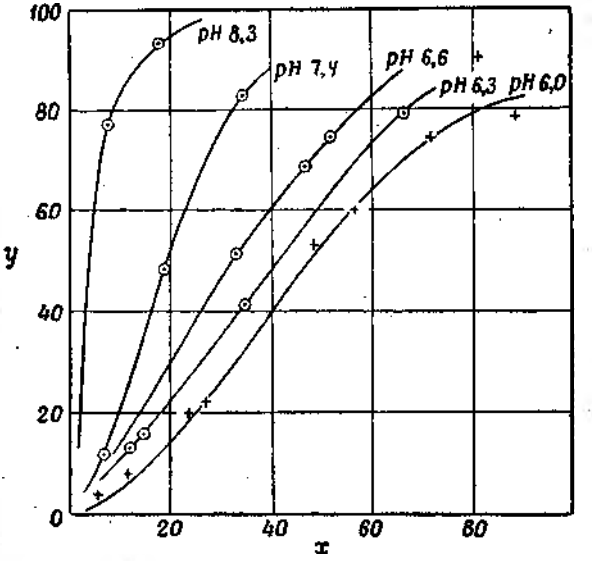
$$Hb + O_2 \rightleftarrows HbO_2. \qquad (1)$$

Для разбавленных растворов активности растворенных веществ практически равны их концентрациям, и константа равновесия

выражается как

$$K = \frac{[HbO_2]}{[Hb]\,[O_2]}.$$

Концентрации гемоглобина и оксигемоглобина можно выражать в произвольных единицах, так как необходимо знать только их отношение; обычно концентрации даются в процентах от общего количества, и их можно легко определить спектрофотометрически.



Р и с. 35. Кривые диссоциации оксигемоглобина при различных значениях pH [21].

Концентрацию кислорода измеряют в атмосферах или миллиметрах ртутного столба. Если при давлении кислорода x образуется y % оксигемоглобина, то константа равновесия

$$K = \frac{y}{x\,(100 - y)} \quad \text{и} \quad \frac{y}{100} = \frac{Kx}{1 + Kx}.$$

Графически зависимсоть между y и x должна выражаться гиперболой *. Однако для гемоглобинов позвоночных эта зависимость выражается S-образными кривыми, как это показано на рис. 35 [21, 125, 126]. Очевидно, уравнение (1) неприменимо к процессу присоединения кислорода к гемоглобину позвоночных.

* Это следует из уравнения $\frac{y}{100} = \frac{Kx}{1 + Kx}$. — *Прим. ред.*

Поскольку молекула гемоглобина позвоночных содержит четыре атома железа, каждая молекула гемоглобина соединяется с четырьмя молекулами кислорода. Применяя символ Hb для субъединицы, содержащей только один атом железа, процесс присоединения кислорода можно выразить следующим уравнением:

$$Hb_4 + 4O_2 \rightleftarrows Hb_4(O_2)_4. \qquad (2)$$

Если бы каждый из четырех атомов железа, находящийся в молекуле Hb_4, реагировал с кислородом независимо, то константа равновесия для каждой из четырех субъединиц была бы $K = \frac{y}{x(100-y)}$. Поскольку в действительности дело обстоит иначе, предполагают, что между четырьмя атомами железа имеется некоторое взаимодействие и допускают образование трех промежуточных соединений, состав которых лежит между Hb_4 и $Hb_4(O_2)_4$ и выражается следующими формулами: $Hb_4(O_2)$, $Hb_4(O_2)_2$ и $Hb_4(O_2)_3$. Если бы константы диссоциации этих промежуточных соединений были одинаковы по величине и значительно превосходили константу диссоциации $Hb_4(O_2)_4$, то константа равновесия, выражаемого уравнением (2), была бы равна

$$K = \frac{[Hb_4(O_2)_4]}{[Hb_4][O_2]^4},$$

откуда

$$\frac{y}{100} = \frac{Kx^4}{1+Kx^4}.$$

В этом случае зависимость между y и x графически выражается S-образной кривой, однако ее форма существенно отличается от формы экспериментальных кривых. Для гемоглобина млекопитающих форма экспериментальной кривой приблизительно описывается уравнением, в котором x^4 заменено на $x^{2,5}$ [126], для гемоглобина утки — на x^3 и для эритрокруорина *Arenicola cristata* — на x^6 [126а].

Из S-образной формы кривых насыщения гемоглобина следует, что первый из четырех атомов железа соединяется с кислородом очень медленно, т. е. что его сродство к кислороду невелико, но по мере течения процесса присоединения кислорода сродство железа, входящего в состав гемоглобина, к кислороду увеличивается. Очевидно, константы равновесия четырех стадий рассматриваемого процесса нельзя считать идентичными; необходимо принять различные значения для K_1, K_2, K_3 и K_4, где числовые индексы указывают на соответствующие фазы процесса. Удовлетворительное уравнение, основанное на экспериментальных данных, предложил Адер [127]:

$$\frac{y}{100} = \frac{K_1p + 2K_1K_2p^2 + 3K_1K_2K_3p^3 + 4K_1K_2K_3K_4p^4}{4(1 + K_1p + K_1K_2p^2 + K_1K_2K_3p^3 + K_1K_2K_3K_4p^4)}.$$

Попытки выделить промежуточные продукты путем фракционированной кристаллизации частично окисленного гемоглобина оказались безрезультатными [128]. Но, несмотря на это, S-образную форму кривой насыщения гемоглобина позвоночных следует приписать образованию промежуточных продуктов, содержащих одну, две или три молекулы кислорода на одну молекулу Hb_4. Это вытекает из того факта, что гемоглобинам более низкого молекулярного веса соответствуют гиперболические кривые насыщения. Такие кривые были получены для гемоглобина миноги (*Petromyzon marinus*) [129] и для миоглобина [129a], содержащих только один атом железа на одну молекулу пигмента с молекулярным весом 17 000, а также для гемоглобина личинок gastrophilus в желудке лошади (молекулярный вес гемоглобина 34 000).

При сравнении S-образной и гиперболической кривых видно, что они различаются между собой в области низких давлений кислорода, причем гипербола соответствует более высокому сродству к кислороду. По-видимому, при агрегации четырех субъединиц гемоглобина позвоночных атомы железа, находящиеся в геме, становятся менее доступными и не могут соединяться с молекулами кислорода так же легко, как до агрегации. Действительно, при расщеплении мочевиной молекулы Hb_4 на две частицы Hb_2 сродство гемоглобина к кислороду значительно возрастает [131].

Природа взаимодействия между гемами различных субъединиц, с которой связана S-образная форма кривой насыщения, не совсем ясна. Поскольку взаимодействие между гемами может быть предотвращено *n*-хлормеркурибензоатом, можно предположить, что в механизме этого взаимодействия принимают участие сульфгидрильные группы [131a]. S-образную форму кривой нельзя объяснить неидентичностью четырех гемов; об этом свидетельствует симметричная форма кривой насыщения, если по оси ординат откладывать процент насыщения кислородом, а по оси абсцисс $\lg[O_2]$ (вместо $[O_2]$) [132]. Хотя нет никаких указаний на то, что в молекуле Hb_4 четыре гема соединены друг с другом, все же они, вероятно, расположены настолько близко, что присоединение кислорода к одному из них может нарушить взаимодействие между ними и, таким образом, облегчить дальнейшее присоединение кислорода [132, 133, 166]. Результаты микроскопических исследований показывают, что при присоединении кислорода к кристаллическому гемоглобину форма его кристаллов очень сильно изменяется [136] (рис. 36), хотя молекула кислорода составляет всего 0,2% всей молекулы оксигемоглобина. Поскольку глобин не взаимодействует с кислородом, изменение кристаллической решетки должно быть связано с перемещением групп гема, которые, вероятно, перемещаются к поверхности молекулы гемоглобина [36]. К аналогичным заключениям приводит тот факт, что гем легко соединяется с этил-, пропил- и бутилизоцианидами, тогда как сродство гемоглобина к этим

веществам уменьшается в порядке этилизоцианид—пропилизоцианид—бутилизоцианид [134]; очевидно, только самые небольшие молекулы изоцианида могут легко соединяться с гемами молекулы Hb_4.

Сродство гемоглобина к кислороду возрастает не только при частичном присоединении кислорода, но и при окислении части атомов двухвалентного железа до трехвалентного состояния [135].

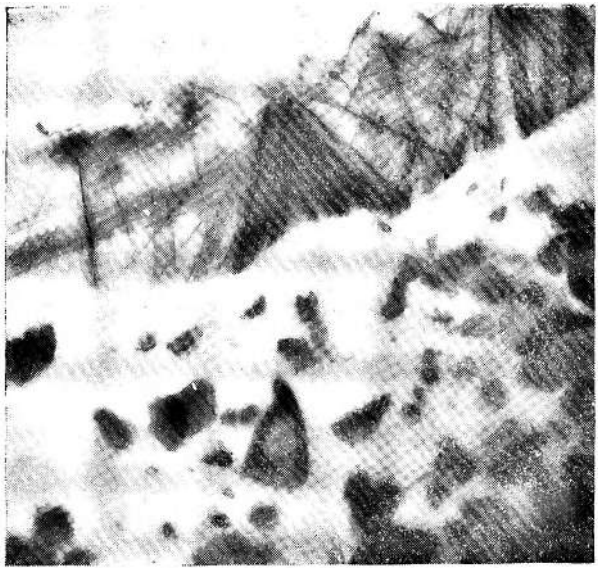


Рис. 36. Гексагональные пластинки гемоглобина лошади (внизу), и образование игл оксигемоглобина около пузырька воздуха (вверху налево) [36].

Так, если смесь гемоглобина (тетражелезистый комплекс) и метгемоглобина (тетражелезистый комплекс) подвергнуть действию кислорода при различных его давлениях, то получается гиперболическая кривая насыщения; очевидно, сродство к кислороду двухвалентного железа, содержащегося в моно-, ди- и трижелезистых комплексах, образующихся при достижении равновесия, выше, чем в тетражелезном комплексе [136].

По закону действия масс константа равновесия K равна $\frac{k'}{k}$, где k' и k—константы скорости присоединения кислорода и его отщепления соответственно. Хартридж и Ротон [137] разработали быстропоточный метод, при помощи которого оказалось возможным экспериментально измерить скорости того и другого процессов.

Данные, полученные по этому методу для миоглобина с молекулярным весом 17 000, находятся в соответствии с законом действия масс [138]. Однако при связывании кислорода молекулой Hb_4 имеются четыре константы скорости для четырех стадий окисления и четыре константы скорости отщепления кислорода. Эти константы связаны с четырьмя константами равновесия K_1, K_2... соотношением $K_n = k'_n/k_n$, где индекс $n = 1,2,3$ или 4 указывает на соответствующую фазу процесса [139]. Если принять упрощающее допущение, что скорости первых трех реакций строго пропорциональны числу несоединившихся атомов железа и что только в четвертой промежуточной реакции происходит значительное взаимодействие между четырьмя гемами, то можно получить следующие значения для гемоглобина овцы при слабощелочной реакции:

n	1	2	3	4
k'	24	18	12	106
k	75	150	225	12
$K = k'/k$	0,32	0,12	0,033	8,85

Низкие значения K_1, K_2 и K_3 показывают, что равновесия смещены в сторону отщепления кислорода, тогда как равновесие в последней стадии, для которого $K = 8,85$, значительно смещено в сторону его связывания.

Сродство внутриклеточного гемоглобина к кислороду у некоторых видов животных такое же, как и сродство растворов гемоглобина. У других видов наблюдается увеличение сродства при гемолизе эритроцитов [140, 141]. Это изменение сродства не зависит от природы гемолизирующего агента: гемолиз, вызываемый толуолом, сапонином или водой, дает одинаковые результаты.

Оксигемоглобин при медленном высушивании при низких температурах превращается в метгемоглобин; при быстрой сушке этого не происходит. Такие сухие препараты оксигемоглобина не отдают кислорода при низком давлении, тогда как влажные препараты оксигемоглобина при тех же условиях отщепляют кислород [38]. Очевидно, отщепление кислорода от оксигемоглобина связано с наличием воды, и поэтому равновесие между гемоглобином и оксигемоглобином следует выражать уравнением

$$Hb(H_2O) + O_2 \leftrightharpoons HbO_2 + H_2O. \qquad (3)$$

Здесь гемоглобин представлен в виде аквакомплекса, который, кроме молекул воды, связанных белком, содержит одну молекулу воды, связанную железом [38, 141а]. Это предположение находится в соответствии с тем фактом, что равновесие между гемоглобином и оксигемоглобином не смещается при изменении гидростатического давления [142]. Если бы уравнения (1) и (2) были справедливы, то следовало ожидать подавления диссоциации оксигемоглобина

при высоких давлениях. Кинетика присоединения и отщепления кислорода в водных растворах не изменяется, если гемоглобин представлять как аквасоединение, поскольку в водных системах избыток воды настолько велик, что ее концентрацию можно считать постоянной.

Оксигемоглобин устойчив при низких давлениях, тогда как у гемоглобина при этом изменяется спектр поглощения: широкая полоса в зеленой части сменяется двумя узкими полосами, типичными для спектра гемохромогена [38]. Наиболее вероятно, что это объясняется потерей молекул воды, связанных с атомами железа, и превращением гемоглобина в ангидрогемоглобин.

Образование диссоциирующего соединения гемоглобина с кислородом в течение долгого времени было единственным известным примером обратимого координационного комплекса, образуемого молекулами O_2. В последние годы были открыты комплексы кобальта, обладающие способностью обратимо соединяться с молекулярным кислородом [143—145]. Заслуживает внимания тот факт, что кислород может соединяться таким образом с комплексными соединениями кобальта и аминокислот; при этом особенно устойчивым является комплекс кислорода с гистидин-кобальтом [146, 147]. В этих сложных комплексах каждая молекула кислорода связана с двумя молекулами кобальтового комплекса.

Ж. Электрохимические свойства гемоглобина

Изоэлектрическая точка гемоглобина, оксигемоглобина и карбоксигемоглобина млекопитающих близка к pH 7; точное значение зависит от метода, применяемого для ее определения, и от природы буфера. Изоэлектрическая точка гемоглобинов беспозвоночных лежит в пределах pH 4,3—5,1 [148] (см. табл. 38).

По электрофоретическим измерениям изоэлектрическая точка карбоксигемоглобина крови быка в фосфатном буфере равна 6,90, по осмометрическим—6,95, по измерениям мембранного потенциала—6,4 [149]. Поскольку фосфатные анионы соединяются с белком, истинная изоионная точка в отсутствие электролитов находится при более высоких значениях pH; изоионная точка карбоксигемоглобина крови овцы равна 7,6, тогда как изоэлектрическая точка в фосфатном буфере лежит в пределах pH 7,16—6,70 [150]. Изоэлектрическая точка нативного глобина быка, измеренная электрофоретически в фосфатном или какодилатном буфере, равна 6,9—7,0 [62]. Рекомбинированный из глобина и гема гемоглобин имеет изоэлектрическую точку 6,72, исходный гемоглобин 6,92 [151].

Электрометрическим титрованием гемоглобина установлено, что одна молекула изоэлектрического белка (молекулярный вес 68 000) может связать не более 106 протонов и что в щелочной среде отщепляется 86 протонов [152]. Однако при очень быстром титровании

кислотой получаются совершенно иные результаты. Если подкисление заканчивается в течение 3 сек., то связывается только $^1/_3$ протонов от того количества, которое связывается при обычном электрометрическом титровании [153]. Очевидно, при подкислении происходит денатурация молекул нативного гемоглобина; 34—36 групп, связывающих протоны, которые состоят главным образом из COO^- или имидазольных групп, не доступны для протонов в нативном гемоглобине [153].

При обычных значениях pH крови оксигемоглобин является более сильной кислотой, чем гемоглобин; изоэлектрическая точка гемоглобина лошади 6,81, а изоэлектрическая точка оксигемоглобина 6,7 [154]. В соответствии с этим оксигемоглобин лошади может связывать основание при pH 7,4 на 0,6 эквивалента (на 1 гем) больше, чем гемоглобин [154]. Это—важный фактор, регулирующий pH в циркулирующей крови; бо́льшая кислотность оксигемоглобина в артериальной крови компенсирует потерю двуокиси углерода, выделяющуюся в легкие из венозной крови. Благодаря этому механизму pH артериальной крови незначительно отличается от pH венозной крови. При физиологических значениях pH оксигемоглобин обладает большей кислотностью, чем гемоглобин, однако в области значений pH от 4,5 до 6,1 наблюдается обратная картина: гемоглобин способен связать основание примерно на 0,2 эквивалента (на 1 гем) больше, чем оксигемоглобин [155].

Гемоглобин и оксигемоглобин могут соединяться с двуокисью углерода. Вследствие большей кислотности оксигемоглобина после присоединения кислорода к гемоглобину связывается меньшее количество CO_2 [156]. По той же причине сродство гемоглобина к кислороду уменьшается при обработке двуокисью углерода [157] (эффект Бора).

Для объяснения этих взаимоотношений Гендерсон [158] предположил, что в непосредственной близости к атому железа гема находится особая группа глобина, которая при подкислении соединяется с протоном. Вполне возможно, что приобретение положительного (или потеря отрицательного) заряда по соседству с атомом железа может изменить его сродство к кислороду. По Фергусону и Ротону [159], группой, связывающей протон, является NH_2-группа, которая, присоединяя протон, превращается в положительно заряженную группу NH_3^+. Если подкисление производится двуокисью углерода, то последняя, согласно Ротону, соединяясь с аминогруппой, дает карбаминосоединение [159, 160]:

$$RNH_2 + CO_2 \longrightarrow RNH{-}COOH$$

или

$$RNH_2 + HCO_3^- \rightleftarrows RNHCOO^- + H_2O.$$

В противоположность карбонатам, карбаматы не осаждаются в щелочной среде хлоридом бария [159]. Соединение, образуемое

гемоглобином или оксигемоглобином с двуокисью углерода, называется карбгемоглобином [161].

Вопрос о существовании карбгемоглобина является спорным; так, отношение CO_2/HCO_3^- при постоянном pH имеет одну и ту же величину как при наличии гемоглобина, так и в его отсутствие [162, 163]. Выдвигались также возражения, что карбаминосоединения устойчивы только в щелочных растворах, но не в среде с pH циркулирующей крови [164], и что взаимодействие гемоглобина с ионами бикарбоната не отличается от его взаимодействия с ионами хлора [165]. Наконец, допускали, что эффект Бора объясняется не изменением связи между гемом и глобином, а такими конфигурационными изменениями, которые сопровождают присоединение кислорода, соединение с окисью углерода и окисление двухвалентного железа в трехвалентное [166]. Рассматривая эти различные точки зрения, можно сделать вывод, что механизм реакции, происходящей между гемоглобином и двуокисью углерода, все еще не выяснен.

3. Карбоксигемоглобин (карбонилгемоглобин)

Впервые карбоксигемоглобин был открыт в ярко-красной крови, взятой из сердца человека или животного, погибшего при вдыхании светильного газа [167]. В противоположность оксигемоглобину, который быстро восстанавливается при действии внутриклеточных ферментов и бактерий в темно-пурпуровый гемоглобин, карбоксигемоглобин более устойчив по отношению к этим восстанавливающим агентам и его ярко-красная окраска сохраняется в трупах в течение длительного времени. Он также остается красным при действии на него ацетата свинца, сульфата меди, дубильной кислоты, сильнощелочных растворов, а также при нагревании. Посредством этих реакций его можно отличить от оксигемоглобина, который при аналогичной обработке превращается в коричневый пигмент [167].

Несмотря на это, карбоксигемоглобин очень близок к оксигемоглобину; подобно оксигемоглобину, он содержит двухвалентное железо; каждый атом железа связывает одну молекулу окиси углерода так, что емкость гемоглобина по CO равна его емкости по кислороду, т. е. составляет 1,34 *мл* CO на 1 *г* гемоглобина [168]. Сродство гемоглобина к окиси углерода значительно выше, чем к кислороду; поэтому кривая насыщения идет более круто и при низких давлениях окиси углерода происходит почти полное насыщение [168] (рис. 37). В связи с тем, что равновесие

$$Hb_4 + 4CO \underset{k}{\overset{k'}{\rightleftarrows}} Hb_4(CO)_4$$

значительно смещено вправо, константа K этого равновесия больше константы равновесия при связывании гемоглобином кислорода.

Кинетический анализ показал, что скорость соединения гемоглобина с CO меньше скорости связывания кислорода, но скорость диссоциации карбоксигемоглобина значительно меньше скорости отщепления кислорода [169], поэтому отношение k'/k много больше аналогичного отношения для реакции гемоглобина с кислородом (см. раздел Е).

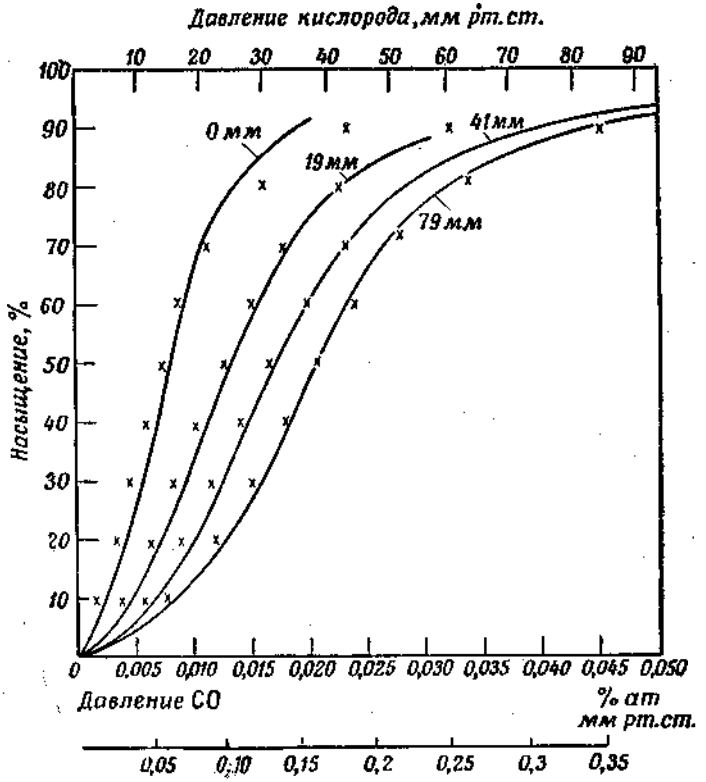


Рис. 37. Равновесные кривые карбоксигемоглобина (———) и оксигемоглобина (××××) при 0, 19, 41 и 79 *мм* давления CO [21].

Спектр поглощения карбоксигемоглобина очень похож на спектр поглощения оксигемоглобина; однако два максимума поглощения в зеленой области спектра при 570 и 542 *мμ* расположены ближе друг к другу, чем аналогичные полосы в спектре оксигемоглобина [168]. Значительное различие в поглощении обнаружено в ближней инфракрасной области спектра, где карбоксигемоглобин в противоположность оксигемоглобину не имеет максимума поглощения [170] (см. рис. 33). Молекулярный вес карбоксигемоглобина,

определенный методом диффузии, оказался равным молекулярному весу оксигемоглобина.

Соединение железа, содержащегося в геме, с окисью углерода, по-видимому, повышает устойчивость белковой части молекулы, так как температура коагуляции карбоксигемоглобина примерно на 11° выше температуры коагуляции оксигемоглобина [171].

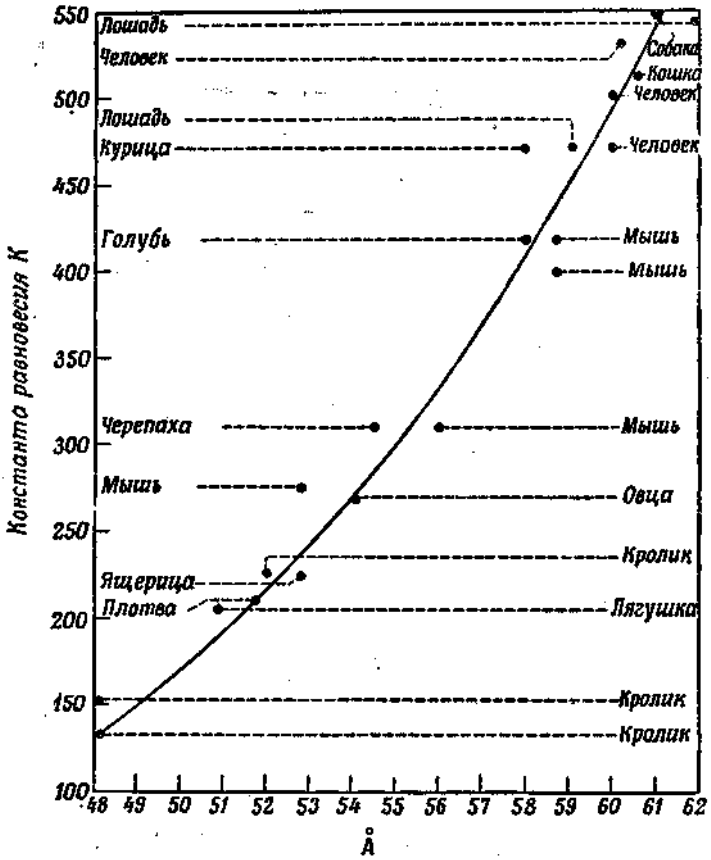


Рис. 38.

Насыщение CO влияет на электрохимические свойства гемоглобина так же, как и связывание кислорода; кислотные свойства гемоглобина усиливаются при насыщении его CO при pH 6,0—8,6 [172]. Карбоксигемоглобин окисляется феррицианидом в метгемоглобин; выделяющуюся при этом окись углерода определяют методами газового анализа [173].

Гемоглобин имеет большее сродство к окиси углерода, чем к кислороду, поэтому оксигемоглобин при действии на него окиси углерода превращается в карбоксигемоглобин. Константа равновесия обратимой реакции

$$HbO_2 + CO \rightleftarrows HbCO + O_2 \text{ равна } K = \frac{[HbCO][O_2]}{[HbO_2][CO]}.$$

Для гемоглобина позвоночных численное значение константы колеблется в пределах 120—550, для миоглобина млекопитающих — в пределах 28—51, для леггемоглобина из корневых узелков бобовых эта константа равна 37, для гемоглобина личинок gastrophilus—0,67, для цитохромоксидазы—приблизительно 0,1 [130].

Установлено интересное соотношение между константой K, являющейся мерой относительного сродства гемоглобина к кислороду и окиси углерода, и спектрами поглощения оксигемоглобина и карбоксигемоглобина. Если D—«промежуток» (в Å) между первыми максимумами поглощения (при 5700—5800 Å) двух производных гемоглобина, то $\lg K \approx 0{,}05\ D$ [21]. Графически зависимость между $\lg K$ и D выражается кривой, показанной на рис. 38. Причина этой неожиданной зависимости между сродством и максимумом поглощения не установлена.

В отличие от оксигемоглобина, карбоксигемоглобин под действием света с длинами волн 280—546 *мμ* распадается на CO и гемоглобин [119, 174]. Эта реакция обратима: в темноте продукты распада соединяются вновь. Квантовый выход фотохимической диссоциации карбоксигемоглобина равен ~0,25, т. е. для отщепления одной молекулы окиси углерода необходимо около четырех квантов. Если освещение производится в 2,6 M растворе NaCl, то квантовый выход увеличивается до ~0,5 [175].

И. Другие производные гемоглобина, содержащие двухвалентное железо

Гемоглобин легко соединяется с окисью азота NO, образуя нитроксигемоглобин, в котором NO прочно связана с железом гема [30, 176]. Такой же комплекс образуется при взаимодействии гемоглобина с нитритами, так как нитриты в присутствии гемоглобина распадаются, согласно следующему уравнению [177]:

$$4HNO_2 \longrightarrow N_2O_4 + 2NO + 2H_2O.$$

Выделяющаяся при этом окись азота соединяется с гемоглобином, часть же гемоглобина окисляется четырехокисью азота до комплекса с трехвалентным железом, т. е. до метгемоглобина. Таким образом, в результате действия нитритов на гемоглобин получается смесь нитроксигемоглобина и метгемоглобина [177, 178]. Чистый кристаллический нитроксигемоглобин получают, пропуская NO через раствор гемоглобина в отсутствие воздуха или с добавкой

дитионита [30]. Изоэлектрическая точка нитроксигемоглобина равна 7. Спектр поглощения его представлен на рис. 31; максимум поглощения наблюдается при 565 и 542 *мμ*.

Гемоглобин соединяется также с цианидами [179], с метилизоцианидом (метилкарбиламином) CH_3NC [180] и с более высокими гомологами алкилизоцианидов, образуя соответственно цианидгемоглобин или карбиламингемоглобины. Цианидгемоглобин неустойчив в нейтральных растворах, но устойчив при pH 10—11 при наличии избытка цианида [179]. Сродство гемоглобина к алкилизоцианидам уменьшается с увеличением длины цепи углеводородного остатка [134]. Все эти комплексы имеют по два максимума поглощения в зеленой части спектра. Это также наблюдается для нитрозобензолгемоглобина—комплекса, образующегося в результате обратимого соединения нитрозобензола с гемоглобином [181], и для случая соединения гемоглобина с трехфтористым фосфором [181а].

При пропускании сероводорода и кислорода через растворы гемоглобина образуется зеленый пигмент сульфгемоглобин [113]. Это же вещество получается при одновременном действии на гемоглобин сероводорода и перекиси водорода [182]. Об образовании сульфгемоглобина в органах, подвергшихся гниению, известно уже давно [183]. Растворы сульфгемоглобина дают узкую полосу поглощения в красной части спектра при 617 *мμ* [113], которая в отличие от аналогичной полосы поглощения метгемоглобина не исчезает при добавлении дитионита. Образование сульфгемоглобина *in vivo* наблюдалось после употребления некоторых лекарственных веществ, таких, как аминофенолы, производные фенацетина [184] и сульфонамиды [185]. Это объясняли повышенной чувствительностью гемоглобина к небольшим количествам сероводорода, образующимся в кишечном тракте под действием бактерий [184].

Превращение гемоглобина в сульфгемоглобин является необратимой реакцией [186]. Вследствие зеленой окраски сульфгемоглобина его иногда ошибочно принимают за не содержащий железа вердоглобин (см. раздел А) [187]. Однако сульфгемоглобин в отличие от вердоглобина содержит прочно связанное железо, которое не отщепляется при обработке кипящей разбавленной соляной кислотой [188]. Неясно, является ли находящееся в нем железо двух- [186] или трехвалентным. При обработке сульфгемоглобина кипящей концентрированной соляной кислотой происходит отщепление железа. Образующаяся простетическая группа представляет собой порфирин, тогда как вердоглобины при этих условиях дают линейные производные тетрапиррила. Порфирин, получаемый из сульфгемоглобина, отличается от протопорфирина избыточным содержанием двух атомов серы и четырех атомов кислорода, которые, вероятно, образуют два сульфоновых мостика между винильными боковыми цепями протопорфирина и смежными с ними метиновыми группами [188].

К. Метгемоглобин и его производные

Окисление двухвалентного железа в гемоглобине до трехвалентного приводит к образованию коричневого комплекса, называемого метгемоглобином [189]. Поскольку он является аналогом с трехвалентным железом гемоглобина, то его также называют ферригемоглобином или гемиглобином [18].

Для превращения гемоглобина в метгемоглобин применяют различные окислители; некоторые из них, например перманганат или хлорат, окисляют не только двухвалентное железо, но и белковую часть гемоглобина. Белковая часть не окисляется, если применяют слабые окислители, такие, как феррицианид [190]. При действии феррицианида на оксигемоглобин сначала отщепляются молекулы кислорода, а затем полученный гемоглобин превращается в метгемоглобин. Эта реакция, протекающая до конца при избытке феррицианида, применяется для количественного определения оксигемоглобина [191].

Соотношение между гемоглобином и метгемоглобином выражают уравнением

$$Hb \rightleftarrows Methb + e^- \text{ (но не } Hb_4 \rightleftarrows Methb_4 + 4e^-),$$

где Methb—субъединица молекулы, содержащая один ион трехвалентного железа, а e^-—электрон [192, 193]. При 30° и pH 7 окислительно-восстановительный потенциал эквимолярной смеси гемоглобина и метгемоглобина равен +0,14 *в*; это значит, что равновесие значительно смещено вправо и образование метгемоглобина может происходить самопроизвольно [194, 195]. Действительно, оксигемоглобин медленно превращается в метгемоглобин; эта реакция ускоряется при повышении температуры, при подкислении и при действии некоторых катализаторов [195а]. Таким путем при нагревании кристаллов оксигемоглобина, суспендированного в 5-процентном этиловом спирте до 37°, были получены кристаллы метгемоглобина [196].

В циркулирующей крови непрерывное образование метгемоглобина предотвращается вследствие наличия в крови восстановительных систем; естественным восстановителем является, по-видимому, фосфоглицеральдегид [197]. При отсутствии нормальной восстановительной системы может развиться такое заболевание, как идиопатическая метгемоглобинемия [198]. Поскольку моча не содержит восстановителей, значительная часть гемоглобина, выделяемая с мочой при гемоглобинурии, находится в виде метгемоглобина. Метгемоглобин обнаружен также в крови после приема производных анилина, нитробензола или сульфаниламида [185, 198, 199]. Очевидно, эти вещества или продукты их обмена задерживают физиологическое восстановление метгемоглобина.

Молекулярный вес метгемоглобина позвоночных такой же, как и гемоглобина, из которого он получается [200]. Метгемоглобин менее устойчив, чем оксигемоглобин или карбоксигемоглобин;

коагуляция растворов метгемоглобина происходит при более низких температурах, чем коагуляция растворов оксигемоглобина [201]. Более того, метгемоглобин легче денатурируется при взбалтывании его с хлороформом [69]. Из данных по скорости денатурации метгемоглобина человека мочевиной при 25 и 40° была вычислена энергия активации процесса денатурации, которая оказалась равной 40 *ккал/моль* [202].

Простетической группой метгемоглобина является гематин (гидроокись протогемина) [203, 204]. Подобно гематину, метгемоглобин представляет собой индикатор—коричневый в кислых растворах и красный в щелочных [205]. Спектр поглощения метгемоглобина при различных pH показан на рис. 32. Кислые растворы метгемоглобина дают узкую полосу поглощения в красной и широкую в синей областях видимого спектра; щелочные растворы метгемоглобина дают две полосы, которые лежат приблизительно в той же части спектра, что и полосы оксигемоглобина, однако максимум поглощения ниже и общее поглощение в красной и синей частях спектра более интенсивно, чем у оксигемоглобина [205].

Равновесие между кислым и щелочным метгемоглобинами можно представить следующим уравнением [141а]:

$$\rangle Fe^{+}(H_2O) \rightleftarrows \rangle FeOH + H^{+},$$

где ион трехвалентного железа двумя валентностями связан с атомами азота, находящимися в пиррольном кольце; в кислом растворе ион трехвалентного железа имеет положительный заряд, в щелочном растворе он соединяется с гидроксильным ионом [205а]. Таким образом, метгемоглобин имеет кислотную группу, которой нет у гемоглобина или оксигемоглобина [207]. Его константа диссоциации равна приблизительно $10^{-8,5}$ [206].

Растворы метгемоглобина изменяют свою окраску при добавлении к ним фторидов, цианидов, перекиси водорода, азидов, цианатов, тиоцианатов, окиси азота. Во всех этих случаях установлено образование новых производных метгемоглобина; некоторые из комплексов были получены в кристаллической форме. Одним из них является фторидметгемоглобин (фторметгемоглобин), растворы которого в отличие от растворов метгемоглобина окрашены в красный цвет при pH < 7 [208, 209]. Он дает узкую полосу поглощения с максимумом при 610—611 *мμ* в кислых растворах и при 605—606 *мμ* в щелочных [209] (см. рис. 32). Фторметгемоглобин содержит один ион фтора на один атом железа [205]. Константа равновесия реакции

$$HbF \rightleftarrows Hb^{+} + F^{-}$$

равна 0,0145 [206].

Другим кристаллическим производным метгемоглобина является цианидметгемоглобин (цианметгемоглобин) [210, 211]; он содержит один ион CN^{-} или, возможно, одну молекулу HCN [211а]

на атом железа; его растворы имеют светло-красный цвет и дают широкий максимум поглощения при 520—579 *мμ* [211] (см. рис. 32). Ион CN^- очень прочно связан с атомом железа, константа диссоциации этого комплекса равна $3{,}6 \cdot 10^{-8}$ [206]. При восстановлении дитионитом цианидметгемоглобин превращается в неустойчивый цианидгемоглобин, который быстро распадается на гемоглобин и цианид (см. раздел И).

Метгемоглобин соединяется также с сульфидными и азидными ионами [186, 212], образуя красные соединения, которые имеют два максимума поглощения в зеленой части спектра. Интересно, что эти ионы (F^-, CN^-, S^{2-} и N_3^-) являются чрезвычайно ядовитыми. Их ядовитость объясняют тем, что они соединяются не только с железом метгемоглобина, но и с железом гема ферментов [209, 213]. Метгемоглобин способен также связывать перекись водорода [209, 210, 213] и перекись этила [214], образуя красные комплексы, содержащие одну молекулу перекиси на один атом железа. Возможно, что они представляют собой комплексы, содержащие четырехвалентное железо [214а]. Вследствие слабого каталитического действия метгемоглобина связанная перекись водорода медленно разлагается и комплекс перекиси водорода с метгемоглобином превращается в оксигемоглобин [209, 215].

Ионы CNO^- и CNS^- также соединяются с метгемоглобином [216, 217]; максимумы поглощения цианатметгемоглобина находятся при 627 и 575 *мμ*. Неустойчивый комплекс, образуемый метгемоглобином с окисью азота, дает максимумы поглощения при 568 и 531 *мμ*; он медленно превращается в устойчивый нитроксигемоглобин [218] (см. раздел И).

Л. Холеглобин, вердоглобины, или псевдогемоглобины

Если через раствор оксигемоглобина, содержащий аскорбиновую кислоту или другой восстановитель, пропускать кислород, то происходит образование холеглобина, сопровождающееся изменением цвета раствора от красного к зеленому [18, 219]. Холеглобин дает максимум поглощения при 629 *мμ*; он способен обратимо соединяться с окисью углерода [18] и, возможно, с кислородом. Холеглобин содержит нативный глобин, переходящий при денатурации в холегемохромоген, имеющий максимум поглощения при 619 *мμ* [18]. Полоса Сорэ при 400 *мμ*, типичная для всех производных порфирина (см. раздел Д), отсутствует в спектре поглощения холеглобина [18]. При кипячении холеглобина с концентрированной соляной кислотой и экстрагировании раствора этилацетатом получают биливердин [18]; экстрагированный водный раствор содержит ионы трехвалентного железа. В соответствии с этим простетическая группа холеглобина родственна вердогему—соединению биливердина, содержащему двухвалентное железо [220].

Вердогем отличается от протогема отсутствием метиновой группы между I и II пиррольными кольцами, т. е. кольцами, связанными с двумя винильными боковыми цепями; метиновый мостик —C(=)—CH=C(—)— разрывается на —C(—)—OH и O=C(—)— [220], так что замкнутое порфиновое кольцо превращается в линейное производное тетрапиррола. Зеленые соединения, называемые псевдогемоглобинами, получают также при обработке растворов оксигемоглобина перекисью водорода в присутствии цианида [221, 222]; они или идентичны с холеглобином, или весьма сходны с ним [223]. Образование зеленых соединений происходит в бо́льших количествах при действии цианидов [224], которые защищают H_2O_2 от разложения каталазой. В отличие от железа гемина железо холеглобина отщепляется разбавленной соляной кислотой. В крови человека имеются небольшие количества «неактивного» гемоглобина [225], который, вероятно, идентичен с холеглобином.

М. Специфичность гемоглобинов

В разделах А и В упоминалось о том, что глобины являются специфическими образованиями и что глобины беспозвоночных значительно отличаются от глобинов позвоночных более низкими значениями изоэлектрической точки и очень большими или очень малыми молекулярными весами. Различные глобины отличаются друг от друга также аминокислотным составом и спектрами поглощения в ультрафиолете [1]. При определении концевых α-аминогрупп при помощи фтординитробензола было установлено, что молекула гемоглобина лошади содержит шесть концевых остатков валина, тогда как молекулы гемоглобинов коровы, овцы и козы содержат по два концевых остатка валина и метионина [226]. Серологическая специфичность гемоглобинов зависит от вида глобина и не зависит от природы простетической группы [227].

С биологической точки зрения важно, что различия в сродстве гемоглобинов к кислороду зависят от состава и физико-химических свойств глобинов. Гемоглобины беспозвоночных имеют значительно большее сродство к кислороду, чем гемоглобины позвоночных [21]. Имеются также незначительные различия в положении максимума поглощения; первый максимум поглощения оксигемоглобинов позвоночных находится при 5762—5769 Å, а аналогичный максимум поглощения беспозвоночных лежит в пределах 5746—5781 Å [21].

Один из наиболее простых методов доказательства различия гемоглобинов разных видов животных заключается в обработке их 0,05 н. NaOH при комнатной температуре [228]. В щелочном растворе ярко-красный оксигемоглобин денатурируется и превращается в коричневый продукт; одновременно с этим две узкие полосы поглощения оксигемоглобина заменяются размытым спектром

поглощения без какого-либо определенного максимума. Скорость разложения, т. е. время, необходимое для исчезновения полос поглощения оксигемоглобина, изменяется в очень широком интервале в зависимости от происхождения оксигемоглобина. Для оксигемоглобина человека оно составляет приблизительно 1 мин., для оксигемоглобина собаки—3 мин., кролика—21 мин., лошади—80 мин., быка—более 24 час. [228]. Кривые зависимости оптической плотности при соответствующей длине волны от продолжительности

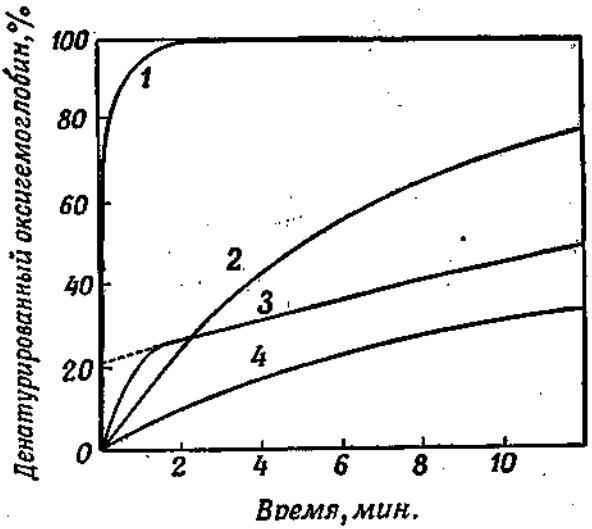


Рис. 39. Денатурация различных гемоглобинов едким натром [246].
1—гемоглобин матери; *3*—гемоглобин новорожденного ребенка; *2*—гемоглобин кролика; *4*—гемоглобин лошади.

действия NaOH показаны на рис. 39 [229]. Эти кривые дают возможность определить время полураспада или другую желаемую конечную точку, например время, в течение которого распадается 90% оксигемоглобина. Анализ кривых показывает, что разложение едким натром является реакцией приблизительно первого порядка [229]. При повышении концентрации NaOH скорость разложения увеличивается, но при очень высоких концентрациях она уменьшается [230]. Понижение скорости денатурации при высоких концентрациях NaOH, вероятно, связано с дегидратирующим действием едкого натра [231].

Несложность рассмотренного выше метода послужила основанием для его широкого применения при исследовании крови человека и животных. Уже в 1866 г. Крюгер [228] открыл, что гемоглобин эмбриона человека разлагается едким натром значительно труд-

нее, чем гемоглобин взрослого человека. Спектрофотометрическим анализом установлено, что в крови новорожденного ребенка содержатся два различных гемоглобина (см. рис. 39), причем один из них идентичен с гемоглобином матери [28]. У нормальных новорожденных детей приблизительно 80% составляет гемоглобин, характерный для эмбриона, и 20%—для взрослого организма [28]. Гемоглобин, характерный для эмбриона, исчезает в крови в течение первых 7 мес. после рождения [232].

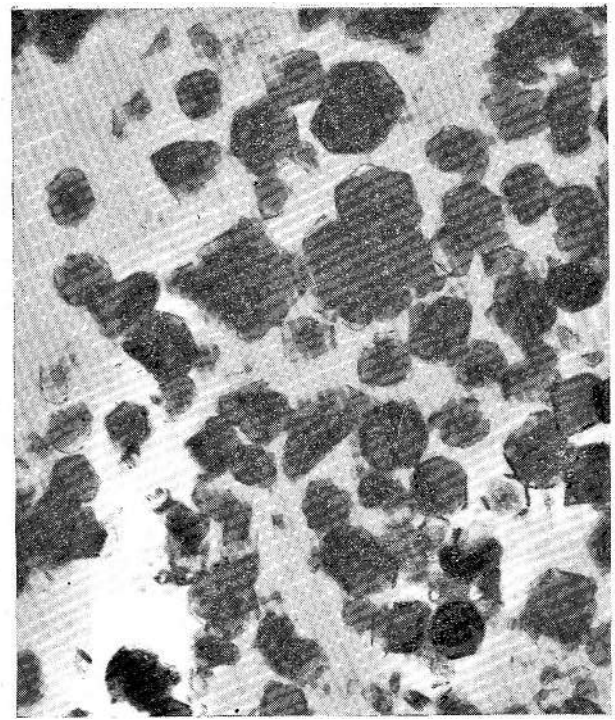
Интересно, что ни у одного из видов животных не обнаружено такого различия между скоростями разложения едким натром гемоглобинов зародыша и взрослого организма. Менее значительные различия между скоростями денатурации NaOH гемоглобина зародышей и взрослых были обнаружены у многих млекопитающих [232]. Гемоглобин зародышей козы и кролика имеет большее сродство к кислороду, чем гемоглобин взрослых животных [233]. Аналогично с увеличением возраста уменьшается сродство к кислороду гемоглобина цыплят [234, 235]. Гемоглобины зародыша и взрослого организма отличаются также растворимостью: карбоксигемоглобин теленка более растворим, чем карбоксигемоглобин коровы [236], и дает иную рентгенограмму [237]. Имеются также некоторые данные, свидетельствующие о существовании различных гемоглобинов у кроликов [238]. Наконец, можно отметить, что электрофоретические измерения указывают на наличие двух различных гемоглобинов в крови некоторых видов животных [239—241] и что гемоглобин головастиков отличается от гемоглобина лягушек более высоким сродством к кислороду [241а].

Наиболее обстоятельно исследован гемоглобин человека. В крови здоровых взрослых людей, по-видимому, содержится только один гемоглобин [242], называемый гемоглобином А [242а]. Гемоглобин эмбриона принято называть гемоглобином F [242а]. В то время как сродство к кислороду гемоглобина эмбриона больше, чем сродство гемоглобина крови матери, после гемолиза наблюдается обратное соотношение: большее сродство к кислороду имеет материнский гемоглобин [140, 243]. При этом происходит изменение главным образом гемоглобина А материнской крови, который в эритроцитах имеет малое сродство к кислороду, но после гемолиза его сродство увеличивается [244]. Это изменение сродства, по-видимому, связано с наличием в эритроцитах диализируемого вещества [245, 245а].

Гемоглобины эмбриона и взрослого человека отличаются по форме их кристаллов (рис. 40 и 41) [140], по рентгенограммам [247], по поглощению ультрафиолетовых лучей, по серологическим [248] и электрофоретическим [249] свойствам; гемоглобин взрослого человека имеет бóльшую анодную подвижность при pH $\geqslant$ 7,1. Молекулярные веса гемоглобинов эмбриона и взрослого человека одинаковы [250]. При обработке фтординитробензолом установлено, что на одну молекулу гемоглобина эмбриона приходится 2,6 конце-



Р и с. 40. Гемоглобин взрослого человека [246].



Р и с. 41. Гемоглобин эмбриона человека [246].

вой молекулы валина, а на одну молекулу гемоглобина взрослого— 5 концевых молекул валина [226].

Кровь больных пернициозной и вторичной анемией содержит гемоглобин, идентичный с гемоглобином А, но в ней не обнаружено гемоглобина F [196]. Однако в крови взрослых людей, страдающих средиземноморской анемией (болезнь Кулея, Thalassemia major), обнаружен гемоглобин F [250а]. Третий тип гемоглобина, называемый гемоглобином S, найден в крови больных серповидной анемией (наследственное заболевание, встречающееся у негров). При этом заболевании эритроциты принимают серповидную форму, когда их гемоглобин лишен кислорода [251, 252, 252а]. Эритроциты могут принимать серповидную форму при обработке их дитионитом натрия [251, 252]. Гемоглобин серповидных клеток обладает двойным лучепреломлением; очевидно, все молекулы в эритроцитах ориентированы в одном направлении [251, 253]. Тот факт, что явление серповидности обнаруживается только у клеток с гемоглобином, но не с оксигемоглобином, объясняется более низкой растворимостью деоксигенированного гемоглобина [253].

Гемоглобин серповидных клеток имеет тот же аминокислотный состав, что и нормальный гемоглобин. Возможно, что эти два гемоглобина отличаются один от другого типом упаковки пептидных цепей [254]. Электрофоретически установлено, что гемоглобин серповидных клеток имеет несколько более основной характер, чем нормальный гемоглобин [252а]. На одну молекулу гемоглобина S приходятся три реакционноспособные сульфгидрильные группы, тогда как молекула нормального гемоглобина имеет только две такие группы [255].

Другой анормальный пигмент, гемоглобин С, был найден в крови людей, не страдающих анемией, но кровь которых содержала гемоглобин S. Гемоглобин С при pH 6,9 обладает вдвое большей электрофоретической подвижностью, чем гемоглобин S [253а]. Третий анормальный пигмент, находящийся в крови людей, страдающих наследственной гемолитической анемией, был назван гемоглобином D [253а].

В течение многих лет считали, что гемоглобин является пигментом, встречающимся только у животных. Однако недавно гемоглобин был найден в корневых узелках бобовых растений [6]. Уже давно было известно, что корни бобовых растений принимают участие в ассимиляции азота и что инвазия корней некоторыми симбиотическими бактериями является необходимым условием для фиксации азота. Гемоглобин образуется только в таких корнях, которые поражены симбиотическими микроорганизмами [256]. Растительный гемоглобин был назван леггемоглобином; подобно гемоглобину позвоночных, он содержит 0,34% железа [257]; леггемоглобин может превращаться в феррисоединение, подобное метгемоглобину, и в зеленый легхолеглобин [257]. Все же не известно, яв-

ляется ли леггемоглобин истинным переносчиком кислорода [258] и принимает ли он участие в процессе ассимиляции азота.

Н. Каталитические свойства гемоглобина

Несмотря на то, что многие гем-протеиновые комплексы имеют резко выраженные каталитические свойства, у гемоглобина они не превосходят каталитических свойств протогемина. Подобно протогемину, гемоглобин действует как пероксидаза; он катализирует окисление перекисью водорода бензидина, пирогаллола [259], иодидов [260], пирамидона, аминофталгидразида и других субстратов. Пероксидазная активность выражена настолько сильно, что ее используют для определения следов гемоглобина. Подобно протогемину, гемоглобин обладает также очень слабой каталазной активностью, катализируя разложение перекиси водорода [261]. Кроме того, гемоглобин может действовать и как оксидаза, т. е. как фермент, катализирующий окисление метаболитов кислородом. Так действует гемоглобин на небольшую группу веществ, например на жирные кислоты с двумя или более двойными связями и на сероводород. Гемоглобин, а также гемин значительно ускоряют окисление льняного масла, линолевой и линоленовой кислот [262]. Интересно, что это каталитическое действие проявляется только на границе раздела вода—масло, но не в гомогенных спиртовых или щелочных растворах жирных кислот и что при встряхивании растворов гемоглобина с линолевой кислотой в присутствии кислорода гемоглобин медленно разлагается с образованием бесцветных продуктов [263, 264]. Этот распад гемоглобина, вызываемый действием перекисей, образующихся из линолевой кислоты и кислорода в присутствии гемоглобина, может происходить и в живом организме.

При взбалтывании растворов гемоглобина со смесью кислорода и сероводорода образуется сульфгемоглобин (см. раздел И); одновременно происходит быстрое окисление сероводорода до серы, которая образует бледно-желтый осадок в зеленом растворе сульфгемоглобина [265]. Процесс можно выразить следующим суммарным уравнением:

$$2H_2S + O_2 \longrightarrow 2S + 2H_2O.$$

Первой стадией реакции является образование серы и промежуточного продукта—перекиси водорода:

$$H_2S + O_2 \longrightarrow S + H_2O_2;$$

в присутствии гемоглобина, обладающего каталазной и пероксидазной активностью, H_2O_2 быстро распадается [265].

В заключение можно упомянуть о том, что гемоглобин также катализирует превращение ортоводорода в параводород [266].

Поскольку всеми упомянутыми выше каталитическими активностями в одинаковой мере обладают как протогемин, так и гемо-

глобин, становится ясным, что каталитическая активность гемина не увеличивается при соединении его с глобином. Глобин заметно отличается от белковых компонентов каталазы, пероксидазы, цитохрома и цитохромоксидазы тем, что он сообщает гему свойство обратимо соединяться с кислородом.

О. Миоглобин (мышечный гемоглобин)

При вымывании гемоглобина из красных мышц цвет их не изменяется; этот цвет объясняется наличием в мышцах миоглобина и различных цитохромов. Цитохромы представляют собой катализаторы, миоглобин же является переносчиком кислорода, аналогичным гемоглобину. Соотношение между количествами (в *мг*) гемоглобина, миоглобина и цитохрома с в теле крысы весом 250 *г* было определено как 3190 : 101 : 14,4 [267]. Сердечная мышца млекопитающих содержит 0,23—0,60% миоглобина [268]. Мышцы крыльев насекомых бедны миоглобином, но очень богаты цитохромами [269]. В период второй мировой войны было установлено, что частая гемоглобинурия у людей с травмированными частями тела (травмы в результате обвалов и т. п.) связана с выделением миоглобина, а не гемоглобина [270].

Кристаллический миоглобин впервые был получен из мышц лошади диализом мышечного экстракта против насыщенного раствора сульфата аммония [271]. Позднее были получены кристаллы миоглобина человека [272, 273]. Простетической группой миоглобина является протогем, идентичный с простетической группой гемоглобина [274]. Белковый компонент миоглобина отличается от белкового компонента гемоглобина. Подобно нативному глобину из гемоглобина, нативный белок из миоглобина может снова соединяться с протогемом, образуя при этом миоглобин. Рекомбинированный миоглобин был получен в виде кристаллов [275].

Содержание железа в миоглобине то же, что и в гемоглобине, т. е. 0,345% [271]. Однако молекулярный вес миоглобина лошади 16 800 [276], тогда как у гемоглобина 68 000. В соответствии с этим молекула миоглобина содержит только один атом железа. Изоэлектрическая точка миоглобина, как и гемоглобина лошади, равна 6,99 [271]. Рентгеновский анализ дает относительно простую рентгенограмму [277].

Единичная ячейка содержит две молекулы с молекулярным весом 17 000; каждая молекула состоит из ряда параллельно вытянутых участков пептидной цепи; как и в гемоглобине, группа гема перпендикулярна к цепям. Структура цепей точно не известна, но, вероятно, каждая из них состоит из одного или нескольких (не более трех) слоев; можно допустить, что молекула миоглобина сходна с четвертой частью молекулы гемоглобина [277]. Конфигурация цепей такая же, как у гемоглобина [278]; предполагают, что мио-

глобин и гемоглобин имеют одинаковые цепи с такой же α-спиральной конфигурацией, как у α-кератина [99].

Спектр поглощения миоглобина очень похож на спектр поглощения гемоглобина с той разницей, что все полосы первого смещены в направлении более длинных волн [140, 279, 280]. Максимумы поглощения для оксимиоглобина человека находятся при 583 и 543 *мμ*, тогда как для оксигемоглобина человека они лежат при

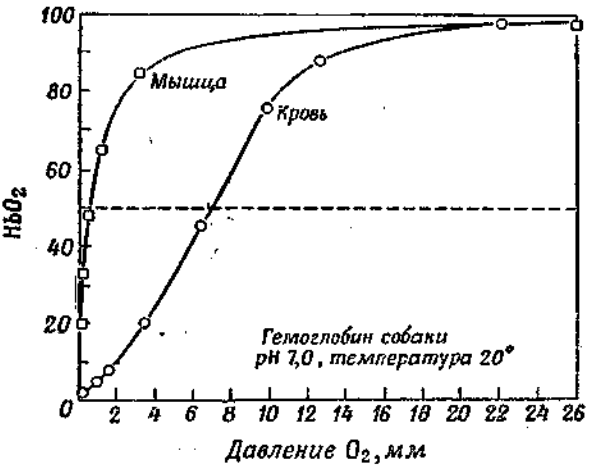


Рис 42. Кривые диссоциации оксигемоглобина и оксимиоглобина [281].

577 и 541,5 *мμ* [140]. Несмотря на то, что кислородная емкость гемоглобина и миоглобина одна и та же—молекула кислорода на атом железа—сродство миоглобина к кислороду значительно выше сродства гемоглобина [140, 281] (рис. 42). Поэтому он может действовать как промежуточный переносчик кислорода от оксигемоглобина к окисляемым участкам клеток. Более высокое сродство миоглобина к кислороду объясняется тем, что скорость связывания кислорода миоглобином больше, чем гемоглобином. Время, необходимое для оксигенирования 50% миоглобина, составляет 0,0004 сек. [282]. Для полунасыщения гемоглобина человека кислородом необходимо давление кислорода 12 *мм* рт. ст., тогда как полунасыщение миоглобина человека происходит при давлении кислорода 2 *мм* рт. ст. [140]. Подобно гемоглобину миоглобин соединяется с окисью углерода. Численное значение константы равновесия

$$K = \frac{[HbCO]\,[O_2]}{[HbO_2]\,[CO]}$$

для миоглобина млекопитающих колеблется в пределах 28—51, тогда как для гемоглобина эта величина составляет 120—550. Отсюда

следует, что относительное сродство миоглобина к окиси углерода меньше, чем у гемоглобина [130]. Интересно, что уравнение $\lg K = 0{,}05\ D$ (см. рис. 38) применимо и к миоглобину [279, 283]. На свету карбоксигемоглобин распадается на окись углерода и миоглобин; фотохимический выход равен приблизительно 1,0, следовательно, отщепление одной молекулы CO происходит при поглощении одного фотона [284].

Аминокислотный состав миоглобина (см. табл. 39) [76] значительно отличается от аминокислотного состава гемоглобина.

Таблица 39

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МИОГЛОБИНА ЛОШАДИ
(Число остатков каждой аминокислоты в молекуле миоглобина с молекулярным весом 17 000)

Аминокислота	Число остатков аминокислоты в молекуле миоглобина	Аминокислота	Число остатков аминокислоты в молекуле миоглобина
Глицин	13	Аргинин	2
Аланин	15	Гистидин	9
Валин	6	Лизин	18
Лейцин+изолейцин	22	Аспарагиновая кислота	10
Пролин	5	Глутаминовая кислота	19
Фенилаланин	5	Аммиак	8
Цистин+цистеин	0	Серин	6
Метионин	2	Треонин	7
Триптофан	2	Тирозин	2

N-концевой аминокислотой является глицин [76]. Миоглобин из мышцы кита не содержит цистина и цистеина; N-концевой кислотой у него является валин [285]. Видовая специфичность миоглобинов проявляется в различной форме кристаллов и растворимости [286]. Миоглобин значительно устойчивее гемоглобина по отношению к денатурирующему действию растворов щелочей [279]. В то время как гемоглобин человека разлагается 0,05 н. раствором NaOH в течение 1 мин., для разложения миоглобина человека требуется более 14 час. [140].

При окислении миоглобина феррицианидом и другими окислителями получается метмиоглобин по аналогии с образованием метгемоглобина. В реакции миоглобин $\rightleftarrows$ метмиоглобин участвует только

один электрон, который освобождается при окислении двухвалентного иона железа в трехвалентный; при pH 7 и температуре 30° окислительно-восстановительный потенциал равен +0,046 *в* [287]. Константы диссоциации комплексов, образуемых метмиоглобином с основаниями, цианидами и фторидами, меньше констант диссоциации соответствующих комплексов метгемоглобина [288]. При 20 и 37° 50% гидроокиси метгемоглобина диссоциирует при pH 9,038 и 8,803 соответственно; теплота ионизации, вычисленная из этих данных, равна 6,1 *ккал/моль* [288а].

П. Количественное определение гемоглобина [106]

Гемоглобин можно определять в присутствии других белков путем измерения степени окрашенности, по поглощению света, по кислородной емкости или по содержанию железа в его растворах. Хотя при разработке методов определения гемоглобина были использованы именно эти принципы, только немногие из рекомендуемых методов являются вполне удовлетворительными.

Основной недостаток большинства колориметрических методов заключается в отсутствии устойчивого стандарта. Гемоглобин и оксигемоглобин неустойчивы; в присутствии воздуха они медленно превращаются в метгемоглобин и затем подвергаются бактериальному разложению. Стеклянные светофильтры, имитирующие цвет гемоглобина или оксигемоглобина, не точно соответствуют их окраске. Поскольку карбоксигемоглобин более устойчив, то его растворы в качестве стандартных могут сохраняться в течение определенного времени; при этом можно определять гемоглобин в виде карбоксигемоглобина, подвергнув его действию окиси углерода [173].

В клинических лабораториях часто применяют метод Сали [289]. Этот метод основан на превращении гемоглобина в «солянокислый гематин» добавлением разбавленной соляной кислоты и сравнении коричневой окраски полученного раствора с окраской стандартного раствора солянокислого гематина. Хотя этот метод имеет широкое применение, он совершенно неудовлетворителен с аналитической точки зрения: коричневый кислый раствор неустойчив, с течением времени в нем образуется коричневый осадок. Интенсивность окраски определяется не только образующимся гематином, но зависит также от помутнения раствора, вызываемого липидами или белками. При сравнении образцов крови различных особей с одинаковым содержанием гемоглобина колориметрические данные не совпадают [290]. Наиболее значительные отклонения наблюдались для крови птиц, так как ядра эритроцитов вызывают дополнительное помутнение [291, 292]. Лучшие результаты получаются при сравнении щелочных растворов гемоглобина со стандартным щелочным раствором гемоглобина, который устойчив в течение более длительного времени. В основу наиболее удовлетворительного колориметрического

метода положено явление почти полной идентичности спектров поглощения цианидметгемоглобина и цианистого гемина (цианогематина). Растворы цианогематина устойчивы в течение многих месяцев и даже лет [293, 294]. Кровь подкисляют разбавленной соляной кислотой, после чего к ней добавляют избыток цианистого натрия до щелочной реакции и сравнивают со стандартным раствором цианогематина, приготовленного растворением хлористого гемина в растворе цианистого натрия. Этот многократно проверенный метод дает прекрасные результаты. Однако с мутными липемическими гемолизатами были получены ошибочные результаты [295].

Спектрофотометрический метод [106] обладает теми преимуществами перед колориметрией, что в этом случае стандартный раствор приходится готовить только один раз и что помутнение растворов оказывает меньшее влияние на результаты, если измерение поглощения света производят в длинноволновой части спектра. Кроме того, спектрофотометрическим методом можно определять различные производные гемоглобина и их смеси (см. раздел Д). Метод инфракрасной спектрофотометрии применяли для определения карбоксигемоглобина и метгемоглобина в присутствии оксигемоглобина [112, 113].

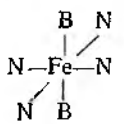
Определив железо, можно рассчитать содержание гемоглобина в растворах чистого гемоглобина, но в цельной крови и органах необходимо учитывать при этом наличие других железо-протеиновых комплексов (сидерофилин, ферритин). Одним из наилучших методов определения гемоглобина является метод, основанный на измерении его кислородной емкости. Гемоглобин превращают в оксигемоглобин, после чего кислород выделяют действием феррицианида; объем полученного кислорода измеряют волюмометрически или манометрически [296—298]. Чтобы удостовериться в том, что выделившийся газ действительно кислород, применяют в качестве поглотителя кислорода щелочные растворы дитионита натрия. Поскольку емкость гемоглобина по окиси углерода та же, что и кислородная емкость, то гемоглобин можно насыщать не кислородом, а окисью углерода. Если перед насыщением CO или O_2 исследуемую пробу обработать дитионитом натрия, то метгемоглобин восстанавливается в гемоглобин и емкость по отношению к указанным газам возрастает. Однако по этому методу, кроме метгемоглобина, определяется также «неактивный» гемоглобин, который, возможно, идентичен с холеглобином [299]. Прямое определение кислорода в небольших количествах крови можно производить полярографически, применяя капельный ртутный катод [300].

В заключение следует отметить, что следы гемоглобина можно определять колориметрически, применяя для этой цели бензидиновую реакцию [301—303].

Р. Взаимодействие между гемом и глобином

Гемоглобин принято рассматривать как координационный комплекс, в котором центром координации служит атом железа [192]. Однако в отличие от всех других координационных комплексов гема гемоглобин способен обратимо соединяться с кислородом и вследствие этого функционировать как переносчик кислорода. Это уникальное свойство гемоглобина должно находиться в зависимости от особой структуры гем-глобинового комплекса.

Крайне неустойчивый гем легко соединяется с аммиаком, с первичными, вторичными и третичными аминами, а также с цианидами и окисью углерода, образуя ярко-красные комплексы, называемые гемохромогенами. Вследствие малой растворимости гемохромогены легко получаются в кристаллическом состоянии. Все гемохромогены имеют две типичные узкие полосы поглощения в зеленой части спектра при 558 и 528 *мμ*. Рентгенограммы, подобные рентгенограммам фталоцианинов, и другие физико-химические данные свидетельствуют о том, что порфиновое кольцо является жестким плоским кольцом, в центре которого находится металл, связанный с порфином. Металл связан с четырьмя атомами пиррола, которые образуют углы квадрата. Гем может соединяться с двумя молекулами основания (В), которые располагаются над и под плоскостью порфинового кольца:



Молекулы основания могут быть неодинаковыми.

В качестве примеров веществ, соединяющихся с гемом, можно назвать аммиак, гидрат гидразина, пиперидин, имидазол, метилимидазол и пиридин. Гем обладает ярко выраженной способностью соединяться с этими веществами. Такие соединения легко получаются при добавлении восстановителей, подобных дитиониту натрия, к раствору гемина и связываемого им вещества.

Некоторые из веществ, связываемых гемом, соединяются также с гемином, хотя способность последнего образовывать комплексы выражена в меньшей степени, чем у гема. Так, гемин не соединяется с окисью углерода, однако образует непрочные комплексы с пиридином или цианидами. Комплексные соединения гемина называются парагематинами.

Окислительно-восстановительный потенциал системы гем—гемин резко изменяется при их соединении с основаниями [304]. Превращение гема в гемохромоген и гемина в парагематин сопровождается также сильным уменьшением парамагнитной восприимчивости [305]. Последняя для гемина в точности равна парамагнитной восприим-

чивости ионов трехвалентного железа (5,8—5,9 магнетона Бора), что соответствует пяти неспаренным электронам на 3 *d*-орбите [306].

Распределение электронов по орбитам в ионе трехвалентного железа выражается следующей формулой: $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^5$, где индексы над буквами указывают число электронов в соответствующей орбите. Парамагнитная восприимчивость иона трехвалентного железа (5,9 магнетона) определяется спинами пяти неспаренных электронов на 3 *d*-орбите. При восстановлении трехвалентного иона железа в двухвалентный один из электронов 3 *d*-оболочки образует пару с электроном, получаемым от восстановителя, так что в 3 *d*-орбите иона двухвалентного железа остается только четыре неспаренных электрона; магнитный момент иона двухвалентного железа равен 4,9 магнетона. Спины спаренных электронов антипараллельны, вследствие чего магнитные моменты взаимно погашаются. В ферроцианидах и других аналогичных комплексных соединениях двухвалентного железа заместители (например, ионы CN^-) взаимодействуют с электронами 3 *d*-оболочки и производят спаривание нечетных электронов, в результате чего магнитный момент полностью исчезает и комплекс становится диамагнитным.

Из того факта, что магнитные восприимчивости гема и гемина соответствуют четырем и пяти неспаренным электронам соответственно, следует, что ионы железа, двухвалентные у гема и трехвалентные у гемина, связаны с атомами азота порфирина не ковалентными, а ионными связями.

При соединении гема с двумя молекулами основания, например с пиридином, ионная связь переходит в ковалентную d^2sp^3-связь гемохромогена и парамагнитная восприимчивость исчезает [306]. Гемохромогены, как и ферроцианиды—диамагнитны [306].

Гемохромогены можно также получить при соединении гема с денатурированным глобином или с другими денатурированными белками [42, 62]. По-видимому, гем в этих комплексах соединяется с некоторыми из многочисленных основных групп белков. Хорошо известно, что ионы двух- и трехвалентного железа могут образовывать комплексы с карбоновыми кислотами, однако ни с одной из этих кислот гемохромогены не получены. Поэтому следует предположить, что карбоксильные группы белков не принимают участия в образовании гемохромогена.

Гемоглобин отличается от гемохромогенов не только широкой полосой поглощения в зеленой части спектра и способностью обратимо соединяться с кислородом, но и парамагнитной восприимчивостью, которая у него равна 5,4 магнетона Бора [306]. В то время как все исследованные гемохромогены диамагнитны, гемоглобин, подобно гему и неорганическим ионам двухвалентного железа, обладает парамагнитной восприимчивостью [306]. Это свидетельствует о том, что соединение гема с нативным глобином, по существу, является ионным соединением. Возникает вопрос, каким образом

нативный глобин соединяется с порфириновой структурой молекулы гема. Поскольку гемоглобин легко образуется из гемина и глобина при добавлении восстановителей к их водным растворам и эта реакция протекает в нейтральной среде при комнатной температуре почти мгновенно [42], образование ковалентных связей, подобных эфирным или пептидным, между глобином и боковыми цепями порфириновой структуры исключается [62].

Рекомбинированный гемоглобин, полученный из нативного глобина и протогема, может кристаллизоваться [63]. Его кислородная емкость [62], спектр поглощения [42] и способность перевариваться трипсином [48] те же, что и у исходного гемоглобина. Он несколько отличается от исходного гемоглобина более низкой температурой коагуляции [62] и способностью легче денатурироваться растворами NaOH [307].

Нативный глобин соединяется не только с протогемом, но и с мезогемом [42], в котором винильные группы замещены на группы C_2H_5, и с диметиловым эфиром мезогема, в котором карбоксильные группы этерифицированы [62]. Образующиеся при этом комплексы являются истинными гемоглобинами, способными обратимо соединяться с кислородом. Очевидно, винильные и карбоксильные группы не играют существенной роли при образовании гемоглобина [62].

При добавлении нативного глобина к щелочным растворам протопорфирина, не содержащего железа, наблюдается слабое изменение спектра поглощения [42, 62, 308]. Однако такие изменения могут происходить и при добавлении органических растворителей [62]. Эти изменения, вероятно, связаны с сольватационными эффектами в коллоидных растворах геминов и порфиринов, в которых они находятся в виде полимолекулярных мицелл [304]. Изменения в спектрах поглощения, происходящие при добавлении глобина или органических растворителей, очевидно, вызываются деполимеризацией этих мицелл. Аналогичные изменения наблюдаются при добавлении к коллоидным растворам гемина кофеина или пилокарпина [309].

В связи с тем, что при образовании гемоглобинов глобин не может быть заменен другими белками, он должен иметь или какую-то особую «гемаффинную» группу или обладать специфическими физико-химическими свойствами, отличными от свойств других белков [231]. Одним из особых свойств глобина млекопитающих является высокое содержание в нем гистидина (см. раздел В). В соответствии с этим предположили, что гем соединяется с имидазольными группами остатков гистидина, содержащихся в глобине. Это предположение подтвердилось данными, полученными при электрометрическом титровании гемоглобина, оксигемоглобина и метгемоглобина [310—312]. Данные дифференциального электрометрического титрования гемоглобина и оксигемоглобина указывают, что около ионов железа гема имеются две кислотные группы; их pK

для гемоглобина лошади равна 7,93 и 5,25, а для соответствующего оксигемоглобина—6,68 и 5,75 [20]. Очевидно, в результате окисления железа гема одна из этих групп становится более сильной, а другая—более слабой. Приведенные значения p*K* значительно отличаются от соответствующих величин для карбоксильной и аммонийной групп, но близки к значениям p*K* имидазольных групп. Считают, что эти данные подтверждают предположение о присоединении железа гема к имидазольным группам. Действительно, гемин легко соединяется с имидазолом и метилимидазолом, образуя типичные парагематины, дающие спектры поглощения, аналогичные спектрам поглощения метгемоглобина [313]. Однако соответствующие комплексы двухвалентного железа—имидазольные гемохромогены—отличаются от гемоглобина тем, что у них атом железа соединен с двумя молекулами имидазольного основания, а также лабильностью связи между железом и имидазольным основанием в щелочной среде [313а]. Кроме того, сродство гема к имидазольному основанию настолько мало, что для образования гемохромогена необходим большой избыток основания [313а]; к этому следует добавить, что гемин не соединяется с гистидином [231]. И, наконец, глобины беспозвоночных содержат очень мало гистидина в отличие от более основных глобинов, полученных из крови млекопитающих [1]. Вследствие этого один из авторов данной главы не разделяет широко распространенного мнения о том, что гем в гемоглобине связан с гистидиновыми остатками глобина [231].

Из того факта, что гемоглобин легко образуется из гема и глобина в щелочном растворе и что связь между гемом и глобином весьма лабильна в кислотной среде, следует, что гемоглобин и метгемоглобин ближе к комплексам, образованным ионами двух- и трехвалентного железа с анионами слабых кислот, чем к соответствующим комплексам, образованным аминами или иминами. Поэтому предполагали, что железо гема соединяется с кислотной группой молекулы глобина [231] и что группой с более низким значением p*K* является карбоксильная группа. Аналогичный вывод был сделан на основании данных, полученных при электрометрическом титровании метгемоглобина [288]. Поскольку миоглобин не содержит цистина и цистеина [76], маловероятно, что сульфгидрильная группа может быть той группой глобина, которая связывает гем, как это допускалось ранее [231].

Принимая во внимание все эти наблюдения, один из авторов данной главы предполагает, что общим для всех глобинов является дополнительная «антигемовая» форма (решетка), которая допускает возможность тесного сближения их с плоской структурой гема [314]. Гемоглобин, согласно этой точке зрения, содержит свободный или слабо связанный гем, внедренный в поверхность гидратированной молекулы глобина. Такое представление дает возможность объяснить парамагнитную восприимчивость гемоглобина, которая отли-

чается от диамагнитной восприимчивости гемохромогена. Структура гемоглобина сохраняется за счет действия сил Лондона—Ван-дер-Ваальса между поверхностями молекулы гема и антигемовой решетки глобина.

Молекулы воды, свободные или связанные в результате гидратации, имеют существенное значение для структуры гемоглобина, о чем свидетельствует образование ангидрогемоглобина при низких давлениях водяного пара [38, 205а].

Гем легко соединяется с нативным глобином, из чего можно сделать вывод, что молекула гема присоединена к поверхности молекулы глобина. Однако этот вывод не обязателен в отношении исходной молекулы Hb_4. S-образная форма кривой диссоциации оксигемоглобина указывает на то, что присоединение кислорода к одному из четырех гемов расшатывает всю структуру молекулы Hb_4 (см. раздел Е). Последнее подтверждается тем, что при соединении гемоглобина с кислородом наблюдается изменение его растворимости [315], формы кристаллов (см. рис. 36) и оптической активности. В то время как удельное вращение гемоглобина лошади при длине волны 668 *мμ* равно +28,3°, для соответствующего оксигемоглобина оно составляет +13° [316]. Аналогичное изменение оптической активности происходит при соединении гемоглобина с окисью углерода [316]. Из всех этих наблюдений можно сделать вывод, что соединение железа гемоглобина с кислородом или окисью углерода вызывает некоторую перегруппировку пептидных цепей глобина.

Паулинг и Кориелл [306] обнаружили, что парамагнитная восприимчивость гемоглобина исчезает при соединении последнего с кислородом или окисью углерода. Диамагнитная восприимчивость оксигемоглобина и карбоксигемоглобина указывает на полную потерю ионного характера атомом двухвалентного железа. В соответствии с этим при связывании кислорода происходит изменение природы связей между атомом железа и атомами азота порфирина и, возможно, образование ковалентной связи между атомом железа и глобином. Интересно, что молекулы кислорода, парамагнитные в газообразном состоянии, утрачивают парамагнитную восприимчивость при соединении с железом гемоглобина. Ковалентная связь между железом гемоглобина и кислородом представлена резонансом между структурами Fe: —Ö=Ö: и Fe=Ö—Ö:, где черточками показаны общие электронные пары, а точками—свободные электроны [306]; при этом шесть электронных пар доставляются молекулой кислорода и одна пара—атомом железа.

Метгемоглобин, который как аналог гемоглобина Hb, содержащий трехвалентное железо, можно представить символом Hb^+ или $Hb^+(H_2O)$, в кислом растворе имеет такую же парамагнитную восприимчивость, как и гемин, соответствующую пяти неспаренным электронам. Однако в щелочном растворе, содержащем HbOH,

парамагнитная восприимчивость уменьшается до значения, соответствующего трем неспаренным электронам [206, 317]. Дальнейшее уменьшение парамагнитной восприимчивости наблюдается при соединении метгемоглобина с цианидами или сульфидами [206, 317, 318]. Изменение магнитной восприимчивости протекает параллельно изменению спектров поглощения. В соответствии с этими изменениями производные гемоглобина можно разделить на четыре группы [318] (табл. 40).

Таблица 40

СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ И МАГНИТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМОГЛОБИНА

Группа	Тип связи	Соединение	Цвет	Спектр поглощения	Число неспаренных электронов
I	Ионная с трехвалентным железом	Метгемоглобин, гемин, фторметгемоглобин	Коричнево-зеленый	Одна полоса в красной области	3—5
II	Ковалентная с трехвалентным железом	Цианметгемоглобин, сульфидметгемоглобин, парагематины	Красный	Одна широкая или две узкие полосы в зеленой области	1
III	Ионная с двухвалентным железом	Гемоглобин, гем	Пурпурно-красный	Одна широкая полоса в зеленой области	4
IV	Ковалентная с двухвалентным железом	Оксигемоглобин, карбоксигемоглобин, ангидрогемоглобин (?), гемохромогены	Светло-красный	Две полосы в зеленой области	0

Магнитная восприимчивость миоглобина и его производных аналогична магнитной восприимчивости соответствующих производных гемоглобина [319]. Поскольку молекула миоглобина имеет только одну группу гема, а молекула гемоглобина—четыре такие группы, идентичность их магнитных восприимчивостей свидетельствует о том, что магнитные моменты производных Hb_4 не изменяются в результате межмолекулярного взаимодействия гемов.

Хотя исследование магнитной восприимчивости проливает свет на природу связей между железом и органическими заместителями,

однако многие проблемы остаются еще не разрешенными. Типы связей, указанные в табл. 40, усложняются наличием резонанса. Более того, имеются некоторые указания на то, что производные гемоглобина являются комплексами железа с семью координационными связями на один атом железа, при этом шесть из них ковалентные, а одна—ионная резонансная [320].

Положение четырех групп гема в молекуле Hb_4 у млекопитающих не известно, однако можно предположить, что четыре плоских порфириновых кольца одинаково ориентированы в молекуле Hb_4 [320а]. Это предположение основано на двух фактах: во-первых, кристаллы гемоглобина и его производных обладают дихроизмом и, во-вторых, спектры поглощения кристаллов, измеренные в разных направлениях, различны [321, 322]. Все же остается неясным, занимают ли четыре остатка гема молекулы Hb_4 четыре угла квадрата [323] или четырехугольника [36], или они располагаются попарно [324]. Предположение о двух парах гема основывается на том, что сродство гемоглобина к кислороду увеличивается при расщеплении молекулы пополам концентрированными растворами мочевины [20, 131].

Наконец, возникает вопрос, почему гемоглобин в отличие от других белков, содержащих гем, действует как переносчик кислорода и почему молекула кислорода, соединенная с гемоглобином, не восстанавливается до воды или перекиси водорода. Ответ, вероятно, заключается в том, что связанная молекула кислорода защищена от действия молекул восстановителей [325]. Одна из главных функций глобина, по-видимому, состоит в его способности соединяться с гемом таким образом, что молекула кислорода, связанная с гемом, стерически защищена [325]. Только при этих условиях возможен перенос молекулярного кислорода.

3. ХЛОРОКРУОРИН

Хлорокруорин представляет собой зеленый пигмент, открытый Ланкастером [326] в некоторых Chaetopode, таких, как *Sabella ventilabrum*, *Sabella bombyx*, *Serpula*, а также в *Siphonostoma diplochaitos*. Наиболее обстоятельно исследован хлорокруорин, полученный из гемолимфы морского червя *Spirographis spallanzanii*, [327]. Из каждой особи *Spirographis* можно получить приблизительно 0,02—0,1 *мл* крови. Соединенную кровь многих червей смешивали с водой в равных объемах; к смеси добавляли сульфат аммония до появления слабой опалесценции. При охлаждении из раствора выпадал кристаллический хлорокруорин [327]. Он содержал 1,2% железа [327]. Аморфные препараты хлорокруорина, полученные из крови *Sabella pavonina* осаждением спиртом или сульфатом магния, содержали 0,45% железа [328].

Хлорокруорин, как и гемоглобин, обратимо соединяется с молекулярным кислородом. Для кристаллического хлорокруорина из *Spirographis* отношение O_2 к Fe равно 1 [327]. Сродство хлорокруорина к кислороду аналогично сродству гемоглобина; при физиологических условиях гемолимфа *Spirographis* насыщена кислородом приблизительно наполовину [327]. Сродство хлорокруорина к окиси углерода мало, так что соединение этого пигмента с кислородом происходит даже в присутствии окиси углерода [329].

Простетическая группа хлорокруорина представляет собой типичный гем [328]. В отличие от протогемина гемин *Spirographis* дает порфирин, нерастворимый в эфире и реагирующий с гидроксиламином с образованием оксима [330, 331]. Карбонильная группа, открытая при помощи этой реакции, оказалась группой—CHO, замещающей винильную группу в положении 2 в молекуле протопорфирина [332]. Таким образом, порфирин *Spirographis* является 1,3,5,8-тетраметил-2-формил-4-винилпорфин-6,7-дипропионовой кислотой [332]. Спектры поглощения порфирина *Spirographis* и хлорокруорина смещены в сторону более длинных волн по сравнению со спектрами поглощения протопорфирина и гемоглобина. Максимум поглощения оксихлорокруорина находится при 604 и 560 *мμ*, деоксигенированного хлорокруорина—при 574 *мμ* [327].

Белковый компонент хлорокруорина обладает свойствами типичного глобина; соединяясь с протогемином, он образует типичный гемоглобин [1]. Хлорокруорин из *Spirographis* содержит 2,3% гистидина и 1,7% лизина [1]. Его изоэлектрическая точка лежит при pH 4,3 [1]. Молекулярный вес хлорокруорина из *Sabella penicillus*, определенный при помощи ультрацентрифуги, оказался равным 2 750 000 [333]. По всем рассмотренным здесь физико-химическим свойствам хлорокруорин больше напоминает гемоглобины беспозвоночных (эритрокруорины), чем гемоглобины млекопитающих.

4. ГЕМОЦИАНИН

Гемоцианин является дыхательным белком, содержащим медь. Он находится в гемолимфе многих моллюсков и членистоногих. Гемоцианин не был найден в клетках крови. Ниже указаны некоторые виды, в которых был найден гемоцианин [1,2, 334—339]:

1) Брюхоногие моллюски: *Helix pomatia, H. hortensis, H. nemoralis, H. arbustorum, Paludina vivipara, P. contecta, Littorina littorea, Buccinum undulatum, Achatina fulva, Murex brandaris, Haliotis rufescens, Neptunea antiqua, Linmea stagnalis, Limax maximus, Arion empiricorum.*

2) Головоногие моллюски: *Octopus vulgaris, Eledone moschata, E. cirrhosa, Loligo vulgaris, Sepia officinalis, Sepiola oweniana.*

3) Пластинчатожаберные моллюски: *Mytilus edulis, Anodonta, Pecten.*

4) Паукообразные: *Euscorpius carpathicus.*

5) Мечехвосты: *Limulus polyphemus.*

6) Ракообразные: *Homarus vulgaris, Astacus fluviatilis, Cancer pagurus, Carcinus moenas, Maia squinado, Dromia vulgaris, Palinurus vulgaris, Pagurus striatus, Nephrops norvegicus, Squilla mantis.*

Гемоцианин получали из гемолимфы этих животных диализом против дистиллированной воды [340]; в изоэлектрическом состоянии он нерастворим в отсутствие солей и в этом подобен эуглобулину. Другие эуглобулины гемолимфы становятся нерастворимыми после кратковременного диализа, тогда как гемоцианин, обладающий более кислотными свойствами, остается в растворе и может быть отделен от первого белого осадка эуглобулина [334]. При продолжительном диализе осаждается гемоцианин, причем часто в кристаллическом состоянии. Осаждение можно ускорить электродиализом [341], добавлением разбавленной соляной кислоты [334] или пропусканием через раствор двуокиси углерода [342]. Осадок растворим в 0,2 *М* растворе NaCl. Гемоцианин получали также насыщением его водного раствора сульфатом магния или добавлением сульфата аммония до 40% насыщения [343].

Гемоцианины, полученные из организмов различных видов, отличаются друг от друга цветом, растворимостью [1], формой кристаллов и другими свойствами [344, 345], которые будут рассмотрены далее. В то время как гемоцианин небольшой улитки пурпурно-синий, гемоцианин осьминога *Sepia* и ракообразного *Palinurus* зеленовато-синий, а гемоцианин *Eledone*—зеленый. Гемоцианин улитки кристаллизуется в октаэдрах в квадратной системе, а гемоцианин *Palinurus* образует ромбододекаэдры [346] (рис. 43).

По содержанию меди гемоцианины можно разделить на две группы. В одной из них, включающей гемоцианины моллюсков, содержание меди составляет 0,245—0,26%, в другой, в которую входят гемоцианины членистоногих, содержание меди равно 0,17—0,18% [1, 347]. Содержание серы в гемоцианинах колеблется в пределах 0,67—1,2% и не зависит от принадлежности гемоцианина к одной из двух упомянутых выше групп. Гемоцианин подковообразного краба (*Limulus polyphemus*) содержит 1,2% серы, причем примерно половина ее находится в метионине, а остальное—в цистине [348]. Аминокислотный состав гемоцианинов колеблется в широких пределах; были найдены следующие значения: аргинин 4,9—6,8%, лизин 6,6—9,6%, гистидин 5,7—9,8%, тирозин 3,9—5,6%, триптофан 4,3—6,4% [1].

Гемоцианин обратимо соединяется с кислородом, при этом на каждые два атома меди связывается одна молекула кислорода [349]. Содержание меди в гемолимфе изменяется от 3 до 28 *мг* на 100 *мл*; в крови *Octopus* ее содержание высоко, а в крови *Maia squinado*—

мало [342]. Кислородная емкость крови в общем изменяется параллельно содержанию в ней меди [342]; она значительно ниже кислородной емкости крови позвоночных.

Сродство гемоцианина к кислороду меньше, чем сродство гемоглобина. При пропускании водорода или двуокиси углерода через раствор оксигенированного соединения от него легко отщепляется

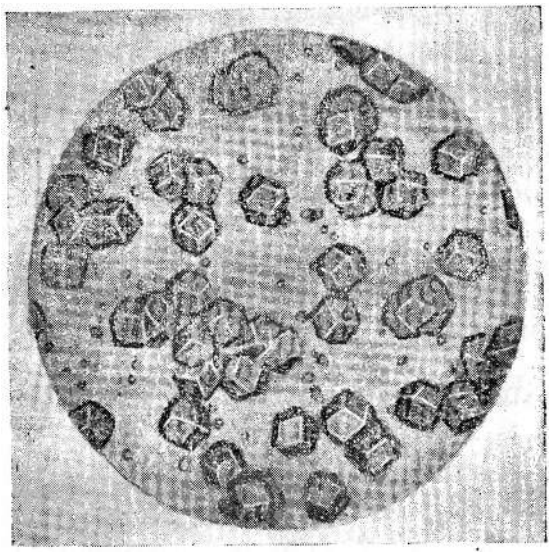


Рис. 43. Кристаллы оксигемоцианина из крови *Palinurus vulgaris* [346].

кислород [342]. Исследованием кинетики процесса по быстропоточному методу установлено, что соединение гемоцианина с кислородом является реакцией первого порядка [138]. Сродство гемоцианина к кислороду возрастает при частичном его насыщении, так что кривая насыщения имеет, как и у гемоглобина млекопитающих, S-образную форму [138, 344] (рис. 44). Сродство к кислороду уменьшается при понижении pH [138, 344].

Гемоцианин соединяется с молекулярным кислородом в отношении $O_2/2Cu$ [349]. По-видимому, присоединение кислорода сопровождается окислением ионов меди [350a]. В отличие от гемоглобина гемоцианин не соединяется с окисью углерода [351].

Присоединивший кислород гемоцианин *Helix pomatia* дает широкую полосу поглощения от 531 до 610 *мμ* с максимумом при 580 *мμ*; максимум поглощения гемоцианина ракообразных лежит около 563 *мμ* [345, 346] (рис. 45). При отщеплении кислорода исчезают цвет и полосы поглощения. Гемоцианины дают полосы погло-

щения в ультрафиолетовой части спектра при 278 и 346 *мμ* [1, 352]; интенсивность второй полосы возрастает при связывании кислорода.

Значения изоэлектрических точек гемоцианинов моллюсков колеблются от 4,7 до 5,1; изоэлектрическая точка гемоцианина ракообразных ~4,7, а гемоцианина *Limulus*—6,3 [1,148,345]. При электрометрическом титровании гемоцианина обнаружено различие

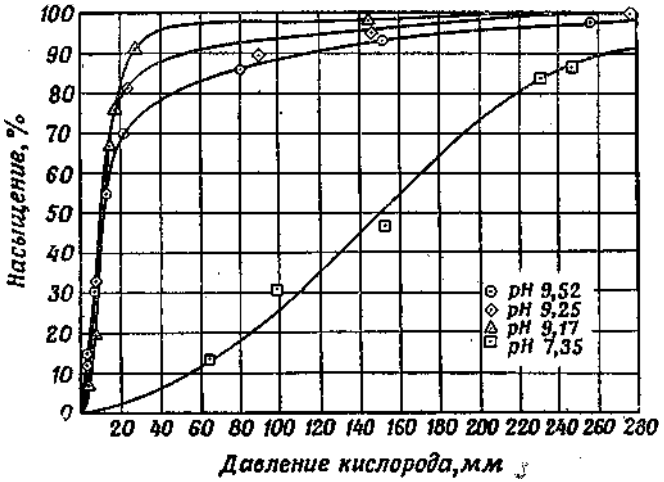


Рис. 44. Кривые диссоциации оксигемоцианина краба при различных значениях pH [350].

между оксигенированной и деоксигенированной формами, подобное тому, которое имеется между гемоглобином и оксигемоглобином; в то время как оксигенированная форма гемоцианина имеет группу, в которой константе кислотной диссоциации отвечает значение pK 6,8—7,0, соответствующее значение pK в восстановленном гемоцианине равно 7,1—7,5 [1,345].

Молекулярные веса гемоцианинов определяли при помощи ультрацентрифуги [333, 353] и осмометрическим методом [354]. Найдены следующие значения констант седиментации: для ракообразных $16{,}9 \cdot 10^{-13}$, $23{,}4 \cdot 10^{-13}$ и $34{,}1 \cdot 10^{-13}$, для головоногих $57{,}1 \cdot 10^{-13}$ и для брюхоногих $99{,}8 \cdot 10^{-13}$. Эти значения констант соответствуют следующим молекулярным весам: для ракообразных 360 000, 640 000 и 1 310 000, для моллюсков 2 750 000 и 5 100 000. Осмометрическим методом найдены следующие значения молекулярных весов: для *Carcinus maenas* 550 000, для *Octopus vulgaris* 710 000, для *Helix pomatia* 1 800 000 [354]. Однако эти значения уменьшаются с разведением растворов гемоцианина. По-видимому, макромолекулы гемоцианина обратимо диссоциируют на меньшие частицы при разбавлении или подщелачивании его растворов [355, 355а].

Основной вопрос химии гемоцианина—почему гемоцианин в отличие от всех других известных комплексов меди обратимо соединяется с кислородом—до сих пор не решен. Гемоцианин не содержит порфиринов. Несомненно, что способность соединяться с молекулярным кислородом определяется особым видом связи иона меди [351]. Делались попытки изолировать простетическую группу гемоцианина. Все эти попытки оказались безуспешными, так как

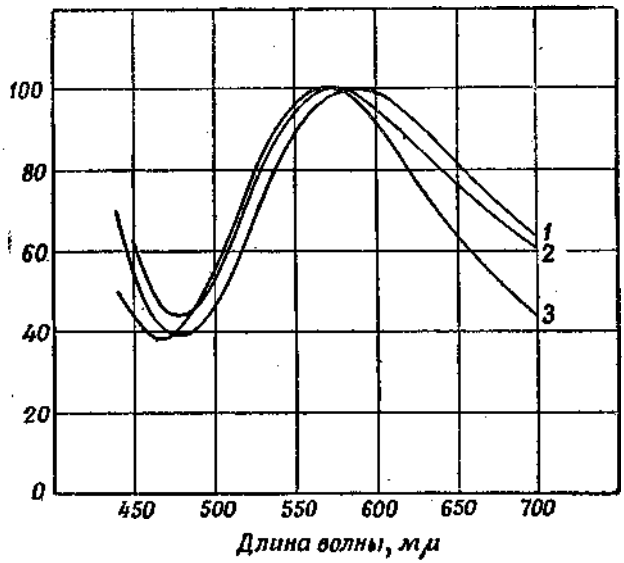


Рис. 45. Спектры поглощения чистых гемоцианинов *Limulus* (*1*), *Homarus* (*2*) и *Busycon* (*3*).

Ордината представляет собой произвольную шкалу, построенную так, что экстинкция для каждого спектра для длины волны максимального поглощения принята за 100 [344].

медь очень легко отщепляется от гемоцианина, например при диализе против воды, подкисленной до pH 2,5 [356], или при действии цианидов [356а]. Обработка гемоцианина раствором NaOH дает медный комплекс, содержащий серу и различные аминокислоты [357]. Однако если учесть тот факт, что ионы двухвалентной меди в щелочной среде соединяются со всеми пептидами и белками (биуретовая реакция), то возникает сомнение, может ли изучение расщепления, производимое щелочью, дать какие-либо сведения об исходной связи меди в гемоцианине.

5. ГЕМЭРИТРИН [358]

Гемэритрин представляет собой коричневый дыхательный белок, найденный у кольчатых червей *Sipunculus nudus*, *Sipunculus gouldii*,

Phaseolosoma vulgare, *Phaseolosoma elongatum*, *Phymosoma*, *Magelona* и у родственных им видов [358, 359]. Полостная жидкость этих червей содержит коричневые клетки, цвет которых определяется находящимся в них гемэритрином. Клетки экстрагировали разбавленным солевым раствором, и экстракты подвергали диализу; первыми выпадают в осадок бесцветные эуглобулины, а при дальнейшем диализе—кристаллический гемэритрин [360, 361].

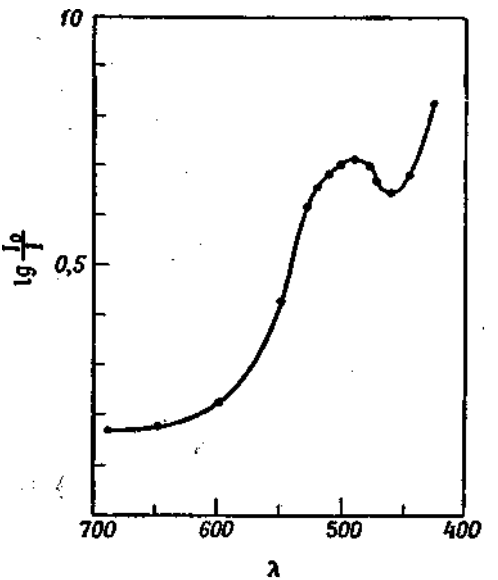


Рис. 46. Спектр поглощения гемэритрина из крови *Sipunculus*.
Толщина слоя 10 *мм*. Содержание азота в растворе 0,092% [360].

Кристаллический гемэритрин из *Sipunculus nudus* содержит 0,99% железа, которое легко отщепляется разбавленной соляной кислотой [1]. Гемэритрин не содержит порфиринов. Кристаллический гемэритрин соединяется с молекулярным кислородом, причем отношение O_2 к Fe равно 1 : 3 [361]. Не совсем ясно, является ли соединение гемэритрина с кислородом только оксигенированием или одновременно с этим происходит окисление двухвалентного железа в трехвалентное [358]. Цвет—красновато-коричневый после обработки кислородом—при добавлении восстановителей исчезает или становится бледно-желтым [361]. Кислородная емкость полостной жидкости *Sipunculus* составляет приблизительно 1,6 *мл* газообразного кислорода на 100 *мл* жидкости [361]. Эта величина очень мала по сравнению с кислородной емкостью крови позвоночных. Гемэритрин не соединяется с окисью углерода [362]. Коричневый раствор окисленной формы дает нечетко выраженную широкую полосу поглощения с максимумом при 495 *мμ* [1,358] (рис. 46). Максимумы в ультрафиолетовой части спектра лежат при 325 и 275 *мμ* [1].

Изоэлектрическая точка гемэритрина из *Sipunculus nudus* равна 5,6 [1]. Молекулярный вес, найденный осмометрически, составляет 66 000 [363]; здесь снова подтверждается правило, что внутриклеточные дыхательные белки имеют низкие молекулярные веса. При электрометрическом титровании гемэритрина получаются

кривые, подобные кривым электрометрического титрования гемоцианина [1]. При обработке гемэритрина кислородом кислотные свойства белка несколько усиливаются, что соответствует изменению константы диссоциации pK особой «кислородсвязывающей» группы от 6,9 (восстановленная форма) до 6,7 (окисленная форма) [1].

Относительно простетической группы гемэритрина ничего не известно. Ее свойства близки к свойствам простетической группы гемоцианина, и вполне возможно, что оба дыхательных белка имеют одинаковое особое расположение пептидных цепей, которым определяется способность металла—меди или железа—обратимо соединяться с молекулярным кислородом.

6. ДРУГИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Дыхательная функция гемоглобина, хлорокруорина и гемоцианина достоверно установлена; что касается гемэритрина, то его дыхательная функция еще требует подтверждений, хотя она весьма вероятна. Неизвестно, существуют ли другие дыхательные белки в животном мире. Тот факт, что белок существует в окисленном и восстановленном состояниях, еще не достаточен для того, чтобы утверждать, что он обладает дыхательной функцией. Так, ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные процессы, могут находиться в окисленном и восстановленном состояниях. Единственным бесспорным доказательством дыхательной функции белка является наличие обратимого соединения его с молекулярным кислородом, который снова отщепляется при низких давлениях газа. Однако в некоторых случаях трудно решить, происходит ли при взаимодействии с кислородом его связывание или окисление.

Одним из белков, который, возможно, принимает участие в дыхании, является геликорубин [364]—красный белок, найденный в желчи *Helix pomatia*. Спектр поглощения окисленной формы имеет две узкие полосы при 580—563 *мμ* и 547—519 *мμ*, а также полосу Сорэ при 415 *мμ* [365]. При обработке геликорубина подкисленным спиртом отщепляется протогемин [365, 366]. В то время как спектр поглощения окисленной формы подобен спектру поглощения оксигемоглобина, спектр поглощения восстановленной формы, имеющий максимумы при 562 и 530 *мμ*, типичен для гемохромогенов [367]. В соответствии с этим окисленная форма геликорубина, по-видимому, должна быть парагематином (см. стр. 453), а не оксигемоглобином. Равновесие между окисленной и восстановленной формами при pH 5—6 смещается в сторону окисленной формы, а при pH 10—11—в сторону восстановленной формы [367]. Возможно, что геликорубин улитки заменяет цитохромы [368].

В крови *Ascidia* и других оболочечных был найден пигмент, содержащий ванадий [369]. Это вещество, названное гемованадином [370], вероятно, является переносчиком кислорода. Оно способ-

но связывать 1 атом кислорода на 1 атом ванадия [369]. Однако не выяснено, является ли гемованадин белком.

Еще меньше известно относительно пиннаглобина. Этот белок получен из крови *Pinna squamosa* высаливанием сульфатом магния, диализом и нагреванием раствора диализированного белка до 56°; после отделения части скоагулированного белка фильтрованием пиннаглобин осаждали спиртом [371]. Вещество содержит 0,35% марганца и соединяется с кислородом, образуя коричневый продукт [371]. Однако пиннаглобин не был получен в чистом состоянии, и поэтому возникает сомнение, связано ли соединение с кислородом и изменение окраски с наличием дыхательного белка. Многие другие органические вещества (например, пирогалловая кислота) окисляются молекулярным кислородом с образованием окрашенных продуктов реакции.

Другим веществом, которое может быть переносчиком кислорода [372], является тетронэритрин, полученный из крови кишечнополостных. Тетронэритрин найден также у ракообразных [373]. Он растворим в хлороформе и, по-видимому, является легко окисляемым каротиноидом [364].

Наконец, имеется сообщение об открытии бесцветных или желтоватых дыхательных белков в крови беспозвоночных. Они были названы ахроглобинами и разделяются на α-, β-, γ- и δ-ахроглобины [374]. Однако нет убедительных данных о том, что эти белки обладают дыхательной функцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roche J., Pigments Respiratoires, Masson, Paris, 1935.
2. Haurowitz F., Tabulae Biologicae, **10**, 18, 1934.
3. Fox H. M., Nature, **164**, 59, 1949; **171**, 162, 1953.
4. Lancaster E. R., Proc. Roy. Soc. (London), **21**, 71, 1873; quoted in Roche [1].
5. Van Reinbold B., Abderhalden's Biochem. Handlexicon, **6**, 188, 1911.
6. Kubo H., Acta Phytochim. (Japan), **11**, 195, 1939; quoted in Lederer E., Ann. Rev. Biochem., **17**, 504, 1947.
7. Fox H. M., Proc. Roy. Soc. (London), **B136**, 378, 1949.
8. Brachet J., Un Symposium sur les Protéines, Liege, Desoer, 1946, p. 123.
9. Roche J., Ann. Rev. Biochem., **5**, 463, 1936.
10. Svedberg T., Ericksson-Quensel B., J. Am. Chem. Soc., **56**, 1700, 1934.
11. Keilin D., Hartree E. F., Nature, **168**, 266, 1951.
12. Bürker K., Arch. ges. Physiol. (Pflügers), **195**, 516, 1922.
13. Perutz M. F., Nature, **161**, 204, 1948.
14. Drabkin D. L., J. Biol. Chem., **182**, 317, 1950.
15. Abderhalden E., Z. physiol. Chem., **23**, 521, 1897.
16. Fox H. M., Hardcastle S. M., Dresel E. I. B., Proc. Roy. Soc. (London), **B136**, 378, 1949.
17. Krüger F., Biol. Generalis, **15**, 456, 1941; quoted in Chem. Zentr., **1942**, **I**, 3223.

18. Lemberg R., Legge J. W., Hematin Compounds and Bile Pigments, Interscience Publishers, Inc., New York, 1949.
18a. Bénard H., Hémoglobine et pigments apparentés, Paris, Masson, 1950.
19. Haurowitz F., in Oppenheimer C., Handb. d. Biochemie, Ergänzungswerk I, Fischer G., Jena, 1933, p. 354.
20. Wyman J., Advances in Protein Chem., 4, 407, 1948.
21. Barcroft J., The Respiratory Function of the Blood: Part II, Haemoglobin, The Cambridge University Press ,London, 1928.
22. Amantea G., Arch. fisiol., **21**, 411, 1923.
23. Hüfner G., Z. physiol. Chem., 8, 358, 1884.
24. Heidelberger M., J. Biol. Chem., **53**, 31, 1922.
25. Hoppe-Seyler F., Medizinisch-Chemische Untersuchungen, 1867, vol. 2, p. 185.
26. Marshall J., Welker W.H., J. Am. Chem. Soc., **35**, 820, 1913.
27. Drabkin D. L., J. Biol. Chem., **164**, 703, 1946.
28. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **186**, 141, 1930.
29. Altschul A. M., Sidwell A. E., Hogness T. R., J. Biol. Chem., **127**, 123, 1939.
30. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **136**, 147, 1924.
31. Hartridge H., J. Physiol. (London), **51**, 252, 1917.
32 Ferry R. M., Green A. A., J. Biol. Chem., 81, 175, 1929.
33. Drabkin D. L., Arch. Biochem., **21**, 224, 1949.
34. Green A. A., Cohn E. J., Blanchard M. H., J. Biol. Chem., **109**, 631, 1935.
35. Reichert E. T., Brown A. P., The Crystallography of Hemoglobin, Publ. No. 116, Carnegie Institution, Washington, 1909.
36. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **254**, 266, 1938.
37. Farr L., Hiller A., Van Slyke D. D., J. Exptl. Med., **86**, 456, 1947.
38. Haurowitz F., J. Biol. Chem., **193**, 443, 1951.
39. Küster W., Z. physiol. Chem., **109**, 108, 1920.
40. Fisher H., Orth H., Die Chemie des Pyrrols, Akademische Ferlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
40a. Papendiek A., Bonath K., Z. physiol. Chem., **144**, 60, 1925.
41. Haurowitz F., Arch. Verdauungs-Krankh. Stoffwechselpath. Diätetik, **50**, 33, 1931.
42. Hill R., Holden F., Biochem J., **20**, 1326, 1926.
43. Hamsik A., Z. physiol. Chem., **187**, 229, 1930.
44. Hill R., Biochem. J., **19**, 341, 1927.
45. Waelsch H., Z. physiol. Chem., **168**, 188, 1927.
46. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **188**, 161, 1930.
47. Ross W., Turner R., J. Biol. Chem., **139**, 603, 1941.
48. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., **17**, 399, 1934.
49. Lineweaver H., Hoover S., J. Biol. Chem., **137**, 325, 1941.
50. Zinoffsky O., Z. physiol. Chem., **10**, 16, 1885.
51. Ponticorvo L., Rittenberg D., Bloch K., J. Biol. Chem., **179**, 839, 1949.
52. Muir H. M., Neuberger A., Biochem. J., **45**, 163, 1949.
53. Shemin D., London I. M., Rittenberg D., J. Biol. Chem., **183**, 757, 1950.
54. London I. M., Shemin D., Rittenberg D., J. Biol. Chem., **183**, 749, 1950.
55. Wittenberg J., Shemin D., J. Biol. Chem., **185**, 103, 1950.
56. Muir H. M., Neuberger A., Biochem. J., **47**, 97, 1950.
56a. Muir H. M., Neuberger A., Perrone J. C., Biochem. J., **52**, 87, 1952.

57. Radin N. S., Rittenberg D., Shemin D., J. Biol. Chem., **184**, 745, 1950.
58. Shemin D., Kusmin S., J. Biol. Chem., **198**, 827, 1952.
59. London I. M., Shemin D., West R., Rittenberg D., J. Biol. Chem., **179**, 463, 1949.
60. Schulz F., Z. physiol. Chem., **24**, 449, 1898.
61. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., **13**, 121, 133, 469, 1930.
62. Haurowitz F., Waelsch H., Z. physiol. Chem., **182**, 82, 1929.
63. Jope E. M., Jope H. M., O'Brien J. R. P., Nature, **164**, 622, 1949.
64 Osato S., Biochem. Z., **132**, 485, 1922.
65. Roche J., Derrien Y., Moutte M., Compt. rend. soc. biol., **132**, 531, 1938
66. Meldrum N. U., Biochem. J., **26**, 162, 1939.
67. Greenstein J. P., J. Biol. Chem., **128**, 233, 1939.
68. Mirsky A. E., Anson M. L., J. Gen. Physiol., **19**, 439, 1936.
69. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **137**, 62, 1924.
70. Keilin D., Proc. Roy. Soc. (London), **B100**, 129, 1926.
71. Van Klaveran K. H. L., Z. physiol. Chem., **33**, 293, 1901.
72. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Physiol. (London), **60**, 50, 1925.
73. Adair G. S., Elkes I. I., Frazer A. C., Schulman J. H., Stewart H. C., J. Physiol. (London), **103**, 1 P, 1944.
74. Conn J. B., Kistiakowsky G. B., Roberts R. M., J. Am. Chem. Soc., **62**, 1895, 1940.
75. Neurath H., Greenstein J., Putnam F. W., Ericksson J. O., Chem. Revs., **34**, 157, 1944.
76. Tristram G. R., Advances in Protein Chem., **5**, 84, 1949.
77. Vickery H. B., White A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **31**, 6, 1933.
78. Beach E. F., Bernstein S. S., Hummel F. C., Williams H. H., Macy I. G., J. Biol. Chem., **130**, 115, 1939.
79. Beach E. F., Teague D. M., J. Biol. Chem., **142**, 277, 1942.
80. Block R. J., J. Biol. Chem., **105**, 663, 1934.
81. Birköfer L., Taurins A., Z. physiol. Chem., **265**, 94, 1940.
82. Chibnall A. C., Proc. Roy. Soc. (London), **B131**, 136, 1942.
83. Rovery M., Desnuelle P., Biochim. Biophys. Acta, **8**, 450, 1952.
84. Haurowitz F., Bursa F., Biochem. J., **44**, 509, 1948.
85. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **162**, 41, 1926.
86. Bale W. F., Yuile C. L., De La Vergne L., Miller L. L., Whipple G. H., J. Exptl. Med., **90**, 315, 1949.
87. Altmann K. I., Miller L. L., Richmond J. E., Arch. Biochem., **29**, 447, 1950.
88. Hüfner G., Gansser E., Arch. Anat. w. Physiol., **1907**, 209.
89. Adair G. S., Proc. Roy. Soc. (London), **A109**, 292, 1925.
90. Roche J., Roche A., Adair G. S., Adair M. E., Biochem. J., **26**, 1811, 1932.
91. Northrop J. H., Anson M. L., J. Gen. Physiol., **12**, 543, 1929.
92. Michel J., Benhamon N., Compt. rend., **228**, 1577, 1949.
93. Wu H., Yang E. F., Chinese J. Physiol., **6**, 51, 1932.
94. Steinhardt J., J. Biol. Chem., **123**, 543, 1938.
95. Svedberg T., Pedersen K. O., quoted by Neuberger A., Ann. Repts. Progr. Chem. (Chem. Soc. London), **37**, 406, 1940.
96. Perutz M. F., Proc. Roy. Soc. (London), **A195**, 474, 1949.
97. Bragg W. L., Perutz M. F., Proc. Roy. Soc. (London), **A213**, 425, 1952.
98. Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **37**, 282, 1951.
99. Perutz M. F., Nature, **167**, 1053, 1951.

100. Bragg W. L., Howell E. R., Perutz M. F., Acta Cryst., **5**, 136, 277, 323, 1952.
101. Fisk A. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **36**, 518, 1951.
102. Riley D. P., Herbert D., Biochim. Biophys. Acta, **4**, 374, 1950.
103. Wyman J., Ingalls E. N., J. Biol. Chem., **147**, 297, 1943.
104. Drabkin D. L., Medical Physics, Year Book Publishers Inc., Chicago, 1950, Vol. 2, p. 1039.
105. Heilmeyer D., Spectrophotometry in Medicine, Hilger, London, 1943.
106. Drabkin D. L., Austin J. H., J. Biol. Chem., **112**, 51, 67, 89, 105, 1935.
107. Butterfield E. E., Z. physiol Chem., **79**, 439, 1912.
108. Sidwell A. E., Munch R. H., Barron E. S. G., Hogness T. R., J. Biol. Chem., **123**, 335, 1938.
109. Soret A., Compt. rend., **86**, 708, 1878.
110. Holden H. F., Hicks C. S., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., **10**, 219, 1932.
111. Merkelbach O., Schweiz. med. Wochschr., **15**, 1142, 1935.
112. Horecker B. L., J. Biol. Chem., **148**, 173, 1943.
113. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **151**, 130, 1926.
114. Drabkin D. L., Schmidt C. F., J. Biol. Chem., **157**, 69, 1945.
115. Jope E. M., in Roughton F. J. W., Kendrew J. C., Haemoglobin, Butterworths Sci. Publ., London, 1949, p. 205.
116. Keilin D., Hartree E. F., Nature, **148**, 75, 1941.
117. Hüfner G., Arch. Anat. Physiol., **1894**, 130.
118. Barcroft J., Burns J. H., J. Physiol. (London), **45**, 493, 1913.
119. Douglas C., Haldane J. S., Haldane J. B., J. Physiol. (London), **44**, 275, 1912.
120. McCarthy E. F., J. Physiol. (London), **86**, 77, 1936.
121. Barcroft J., Camis M., J. Physiol. (London), **39**, 118, 1909.
122. Altschul A. M., Hogness T. R., J. Biol. Chem., **129**, 315, 1939.
123. Roughton F. J. W., Biochem. J., **30**, 2117, 1936.
124. Bohr Ch., Zentr. Physiol., **17**, 682, 1903.
125. Forbes W. H., Roughton F. J. W., J. Physiol. (London), **71**, 229, 1931.
126. Hill A. V., J. Biol. Chem., **51**, 359, 1922.
126a. Allen D. W., Wyman J., Jr., J. Cellular Comp. Physiol., **39**, 383, 391, 1952.
127. Adair G. S., J. Biol. Chem., **63**, 517, 1925.
128. Conant J. B., McGrew R. V., J. Biol. Chem., **85**, 421, 1930.
129. Riggs A., Wald G., Federation Proc., **10**, 109, 1951.
129a. Theorell H., Biochem. Z., **268**, 73, 1934.
130. Keilin D., Wang Y. L., Biochem. J., **40**, 855, 1946.
131. Taylor J. F., Hastings A. B., J. Biol. Chem., **144**, 1, 1942.
131a. Riggs A. F., J. Gen. Physiol., **36**, 1, 1952.
132. Allen D. W., Guthe K. F., Wyman J., J. Biol. Chem., **187**, 393, 1950.
133. Pauling L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **21**, 186, 1935.
134. St. George R. C. C., Pauling L., Science, **114**, 629, 1951.
135. Darling R. C., Roughton F. J. W., Am. J. Physiol., **137**, 56, 1942.
136. Kiese M., Klingmüller G., Arch. Exptl. Path. Pharmakol., **207**, 655, 1949.
137. Hartridge H., Roughton F. J. W., Proc. Roy. Soc. (London), **A104**, 376, 395, 1923.
38. Millikan G. A., J. Physiol. (London), **79**, 158, 1933.
39. Legge J. W., Rounghton F. J. W., Biochem. J., **47**, 43, 1950.

139a. Roughton F. J. W., in Roughton F. J. W., Kendrew J. C., Haemoglobin, Butterworths Sci. Publ., London, 1949, p. 83.
140. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **232**, 125, 1935.
141. Hill R., Wolvekamp H. P., Proc. Roy. Soc. (London), **B120**, 484, 1936.
141a. Keilin D., Nature, **171**, 220, 1953.
142. Johnson F. H., Schlegel F. McM., J. Cell. Comp. Physiol., **31**, 421, 1948.
143. Tsumaki T., Bull. Chem. Soc. Japan, **13**, 252, 1938; quoted in Michaelis L., Federation Proc., **7**, 509, 1948.
144. Diehl H., Henn G., Iowa State Coll., J. Sci., **23**, 273, 1949.
145. Calvin M., Bailes R. H., Wilmarth W. K., J. Am. Chem. Soc., **68**, 2254, 2257, 2263, 2267, 1946.
146. Burk D., Hearon J., Caroline L., Schade E. L., J. Biol. Chem., **165**, 723, 1946.
147. Michaelis L., Arch. Biochem., **14**, 17, 1947.
148. Pedersen K. O., Koll. Z., **63**, 268, 1933.
149. Adair G. S., Adair M. E., Intern. Congr. Biochem. Abstr. of Commun. Ist. Congr., Cambridge, Engl., 1949, p. 161.
150. Adair G. S., Adair M. E., Biochem. J., **28**, 1230, 1943
151. Gralen M., Biochem. J., **33**, 1907, 1939.
152. Pauli W., Schwarzacher W., Helv. Chim. Acta, **28**, 645, 1945.
153. Zaiser E. M., Steinhardt., J. Am. Chem. Soc., **73**, 5568, 1951.
154. Van Slyke D. D., Hastings A. B., Heidelberger M., Neill J. M., J. Biol. Chem., **54**, 481, 1922.
155. German B., Wyman J., J. Biol. Chem., **117**, 533, 1937.
156. Christiansen J., Douglas C. D., Haldane J. S., J. Physiol. (London), **48**, 256, 1914.
157. Bohr Ch., Z. physiol. Chem., **4**, 249, 1890.
158. Henderson L., J. Biol. Chem., **41**, 401, 1920.
159. Ferguson J. K. W., Roughton F. J. W., J. Physiol. (London), **83**, 68, 87, 1935.
160. Grosscurth G., Havemann R., Biochem. Z., **279**, 300, 1935.
161. Henriques O. M., Ergeb. Physiol., **28**, 625, 1929.
162. Van Slyke D. D., Hawkins J. A., J. Biol. Chem., **87**, 265, 1930.
163. Janzen R., Netter H., Arch. ges. Physiol. (Pflügers), **232**, 349, 1933.
164. Pauli W., Valko E., Kolloidchemie d. Eiweisskörper, Steinkopff, Dresden, 1933, p. 91.
165. Stadie W., Science, **81**, 207, 1935.
166. Wyman J., Allen D. W., J. Polym. Sci., **4**, 499, 1951.
167. Hoppe-Seyler F., Arch. path. Anat. Physiol. (Virchow's), **11**, 288, 1857.
168. Hüfner G., Arch. Anat. Physiol., **1903**, 217.
169. Roughton F. J. W., Proc. Roy. Soc., (London), **B115**, 451, 1934.
170. Horecker B. L., Brackett F. S., J. Biol. Chem., **152**, 669, 1944.
171. Hartridge H., J. Physiol. (London), **44**, 34, 1912.
172. Hastings A. B., Sendroy J., Murray C. D., Heidelberger M., J. Biol. Chem., **61**, 317, 1924.
173. Haldane J., J. Physiol. (London), **22**, 306, 1898.
174. Hasselbalch H. A., Biochem. Z., **19**, 435, 1909.
175. Bücher T., Negelein E., Biochem. Z., **311**, 163, 1942.
176. Hüfner G., Reinbold B., Arch. Anat. Physiol., **1904**, Suppl 391.
177. Marshall W., Marshall C. R., J. Biol. Chem., **158**, 187, 1945.
178. Brooks J., Proc. Roy. Soc. (London), **B123**, 368, 1937.
179. Stitt F., Coryell C. D., J. Am. Chem. Soc., **61**, 1263, 1939.

180. Warburg O., Negelein E., Christian W., Biochem. Z., **214**, 26, 1929.
181. Jung F., Naturwiss., **28**, 264, 1940.
181a. Wilkinson G., Nature, **168**, 514, 1951.
182. Michel H. O., J. Biol. Chem., **126**, 323, 1938.
183. Hoppe-Seyler F., Physiologische Chemie, Berlin, **1881**, p. 386.
184. Snapper I., Deut. med. Wochschr., **51**, 648, 1926.
185. Webb T. J., Kniazuk M., J. Biol. Chem., **128**, 511, 1939.
186. Keilin D., Proc. Roy. Soc. (London), **B113**, 393, 1933.
187. Heubner W., Klin. Wochschr., **20**, 137, 1941.
188. Haurowitz F., J. Biol. Chem., **137**, 771, 1941.
189. Hoppe-Seyler F., Z. physiol. Chem., **2**, 149, 1878.
190. v. Zeynek R., Arch. Anat. Physiol., **1899**, 460.
191. v. Reinbold B., Z. physiol. Chem., **85**, 250, 1913.
192. Conant J. B., J. Biol. Chem., **57**, 401, 1923.
193. Küster W., Ber., **43**, 370, 1910.
194. Conant J. B., Pappenheimer A. W., J. Biol. Chem., **98**, 57, 1932.
195. Taylor J. F., Hastings A. B., J. Biol. Chem., **131**, 649, 1939.
195a. Brooks J., Proc. Roy. Soc. (London), **B109**, 35, 1931; ibid., **B118**, 560, 1935.
196. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **194**, 98, 1931.
197. Kiese M., Arch. exptl. Path. Pharmakol., **204**, 288, 1947.
198. Bodansky O., Pharmacol. Revs., **3**, 144, 1951.
199. Heubner W., Lo-Sing, Arch. exptl. Path. Pharmacol., **188**, 143, 1938.
200. Wilson H. C., Biochem. J., **19**, 80, 1925.
201. Bottazzi F., Atti accad. nazl. Lincei, **23**, **II**, 263, 1913.
202. Chalopsis H., Colson-Guastalla H., Bull. Soc. chim. biol., **31**, 669, 1949.
203. Küster W., Ber., **53**, 623, 1920.
204. Heubner W., Arch. exptl. Path. Pharmakol., **72**, 241, 1913.
205. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **138**, 68, 1924.
205a. Keilin D., Hartree E. F., Nature, **169**, 161, 1952.
206. Coryell C., Stitt F., Pauling L., J. Am. Chem. Soc., **59**, 633, 1937.
207. Wyman J., Ingalls E. N., J. Biol. Chem., **139**, 877, 1941.
208. Ville J., Derrien R., Compt. rend., **140**, 743, 1905; quoted in Reinbold [5].
209. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **232** 159, 1935.
210. Kobert R., Arch. ges. Physiol. (Pflügers), **82**, 603, 1900.
211. v. Zeynek R., Z. physiol. Chem., **33**, 426, 1901.
211a. Chance B., J. Biol. Chem., **194**, 483, 1952.
212. Keilin D., Proc. Roy. Soc. (London), **B121**, 165, 1936.
213. Keilin D., Hartree E. F., Proc. Roy. Soc. (London), **B117**, 1, 1935.
214. Stern K. G., DuBois D., J. Biol. Chem., **116**, 575, 1936.
214a. George P., Irvine D. H., Biochem J., **52**, 511, 1952; George P., Science, **117**, 220, 1953.
215. Keilin D., Hartree E. F., Nature, **166**, 513, 1950.
216. Havemann R., Biochem. Z., **316**, 138, 1943.
217. Bader R., Dirnhuber F., Schütz F., Biochim. Biophys. Acta, **5**, 105, 1950.
218. Kellin D., Hartree E. F., Nature, **139**, 548, 1937.
219. Edlbacher S., v. Segesser A., Naturwiss., **25**, 461, 1937.
220. Lemberg R., Legge J. W., Lockwood W. H., Biochem. J., **35**, 328, 339, 353, 363, 1941.

221. Barkan G., Schales O., Z. physiol. Chem., **253**, 83, 1938.
222. Kiese M., Kaeske H., Biochem. Z., **312**, 121, 1942.
223. Liébecq C., Bull. soc. chim. biol., 29, 52, 1947.
224. Foulkes E. C., Lemberg R., Proc. Roy. Soc. (London), **B136**, 435, 1949.
225. Van Slyke D. D., Hiller A., Weiziger J., Cruz W., J. Biol. Chem., **166**, 121, 1946.
226. Porter R., Sanger F., Biochem. J., **42**, 287, 1948.
227. Landsteiner K., Proc. Acad. Sci. Amsterdam, **23**, 1161, 1921
228. v. Krüger F., Z. vergleich. Physiol., **2**, 254, 1925.
229. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **183**, 78, 1929.
230. Philipp K., Z. vergleich. Physiol., **18**, 459 1933.
231. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **232**, 146, 1935.
232. Brinkmann R., Jonxis J. H. P., J. Physiol. (London), **88**, 162, 1937.
233. Barcroft J., J. Physiol. (London), **83**, 192, 1935.
234. Hall F. G., J. Physiol. (London), **83**, 222, 1934.
235. Rostorfer H., Rigdon H., Biol. Bull., **92**, 23, 1947.
236. Wyman J., Rafferty J. A., Ingalls E. N., J. Biol. Chem., **153**, 275, 1944.
237. Kendrew J. C., Perutz M. F., Proc. Roy Soc. (London), **A194**, 375, 1948.
238. Winegarden H. M., Borsook H., J. Cell. Comp. Physiol., **3**, 437, 1933.
239. Reiner L., Moore D. H., Lang E. H., Green M., J. Biol. Chem., **146**, 583, 1942.
240. Hoch H., Biochem. J., **46**, 199, 1950.
241. Geiger A., Proc. Roy. Soc. (London), **B107**, 369, 1931.
241a. Riggs A., J. Gen Physiol., **35**, 41, 1951.
242. Betke K., Naturwiss., **39**, 308, 1952.
242a. Chernoff A. I. et al., Science, **118**, 116, 1953.
243. Barcroft J., Proc. Roy. Soc. (London), **B118**, 249, 1935.
244. McCarthy E. F., J. Physiol. (London), **102**, 55, 1943.
245. Likhniskaya I. I., Sachs M. G., Bull. biol. méd. exptl. URSS, **5**, 320, 1938.
245a. Allen D. W., Wyman J., Smith C. A., J. Biol. Chem., **203**, 81, 1953.
246. Haurowitz F., Chemistry and Biology of Proteins, Academic Press Inc., New York, 1950, p. 214—226 (Гауровитц Ф., Химия и биология белков, ИЛ., М., 1953).
247. Zinsser H. H., Tang Y., Arch. Biochem. Biophys., **34**, 81, 1951.
248. Darrow R., Nowakowski S., Austin M., Arch. Path., **30**, 873, 1940.
249. Beaven G. H., Hoch H., Holiday E. R., Biochem. J., **49**, 374, 1951; Zinsser H. H., Arch. Bioch. Biophys., **38**, 195, 1952.
250. Taylor J. F., Swarm R. L., Federation Proc., **8**, 259, 1948.
250a. Liquori A. N., Nature, **167**, 960, 1951.
251. Itano H. A., Pauling L., Blood, **4**, 66, 1949.
252. Pauling L., Proc. Am. Philosoph. Soc., **96**, 556, 1952.
252a. Itano H. A., Science, **117**, 89, 1953.
253. Perutz M. F., Liquori A. M., Eirich R., Nature, **167**, 929, 1951.
253a. Itano H. A., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., **36**, 613, 1950; **37**, 775, 1951.
254. Schroeder W. A., May L. M., Wells I. C., J. Biol. Chem., **187**, 221, 1950.

255. Ingbar S. H., Kass E. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **77**, 74, 1951.
256. Keilin D., Wang Y. L., Nature, **155**, 227, 1945.
257. Sternberg H., Virtanen A., Acta Chem. Scand., **6**, 1342, 1952.
258. Smith J. D., Biochem. J., **44**, 591, 1949.
259. Willstätter R., Pollinger A., Z. physiol. Chem., **130**, 281, 1923.
260. Kuhn R., Brann L., Ber., **59**, 2370, 1926.
261. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **198**, 9, 1931.
262. Robinson M. E., Biochem. J., **18**, 255, 1924.
263. Haurowitz F., Schwerin P., Enzymologia, **9**, 193, 1940.
264. Haurowitz F., Schwerin P., Yenson M. M., J. Biol. Chem., **140**, 353 1941.
265. Haurowitz F., Enzymologia, **10**, 141, 1941.
266. Eley D., Trans. Faraday Soc., **36**, 500, 1940.
267. Crandall M. W., Drabkin D. L., J. Biol. Chem., **166**, 653, 1946.
268. Watson R. H., Biochem. J., **29**, 2114, 1935.
269. Hill R., Proc. Roy. Soc. (London), **B120**, 472, 1936.
270. Bywaters E. G. L., Delory G. E., Rimington C., Smiles J., Biochem. J., **35**, 1164, 1941.
271. Theorell H., Biochem Z., **252**, 1, 1932.
272. Theorell H., de Duve C., Arch. Biochem., **12**, 113, 1947.
273. Rossi A., Science, **108** 15,. 1948.
274. Schönheimer R., Z. physiol. Chem., **180**, 144, 1929.
275. Drabkin D. L., J. Biol. Chem., **158**, 721, **1945**.
276. Roche J., Vieil H., Compt. rend., **210**, 314, 1940.
277. Kendrew J. C., Proc. Roy Soc. (London), **A201**, 62, 1950.
278. Bragg L., Kendrew J. C., Perutz F. M., Proc. Roy Soc. (London), **A203**, 321, 1950.
279. Theorell H., Biochem. Z., **268**, 46, 1934.
280. Bowen W. J., J. Biol. Chem., **179**, 235, 1949.
281. Hill R., Proc. Roy. Soc. (London), B120, 480, 1936.
282. Millikan G. A., Proc. Roy. Soc. (London), **B120**, 366, 1936.
283. Roche J., Ann. Rev. Biochem., 5, 463, 1936.
284. Bücher T., Kaspers J., Naturwiss., **33**, 937, 1946.
285. Schmidt K., Nature, **163**, 481, 1949.
286. Rossi A., Aragona C., Boll. soc. ital. biol. sper., **17**, 206, 412, 1942.
287. Taylor J. F., Morgan V. E., J. Biol. Chem., **144**, 15, 1942.
288. Theorell H., Ehrenberg A., Acta Chem. Scand., **5**, 823, 1951.
288a. George P., Hanania G., Biochem. J., **52**, 517, 1952.
289. Sahli E., Verhandlungen 20. Kongr. inn. Med., **1902**, 230.
290. Barkan G., Biochem. Z., **283**, 241, 1936.
291. Klein D. E., Hall J. L., King H. H., J. Biol. Chem., **105**, 753, 1934.
292. Rostorfer H. H., J. Biol. Chem., **180**, 901, 1949.
293. Stadie W., J. Biol. Chem., **41**, 237, 1920.
294. King E. J., Gilchrist M., Lancet, **1947**, 201.
295. Haurowitz F., Reiss M., Z. physiol. Chem., **198**, 191, 1931.
296. Van Slyke D. D., Neill J. M., J. Biol. Chem., **61**, 523, 1924.
297. Van Slyke D. D., Hiller A., J. Biol. Chem., **84**, 205, 1929.
298. Sendroy J., J. Biol. Chem., **91**, 307, 1931.
299. Roughton F. J. W., Darling R. C., Root W. S., Am. J. Physiol., **142**, 708, 1944.
300. Baumberger P., Am. J. Physiol., **129**, 308, 1940.
301. Bing F. C., Baker R. W., J. Biol. Chem., **92**, 589, 1931.

302. McFarlane W. D., Hamilton R. C. M., Biochem. J., **26**, 1050, 1932.
303. Wu H., J. Biochem. (Japan), **2**, 189, 1923.
304. Shack J., Clark W. M., J. Biol. Chem., **171**, 143, 1947.
305. Haurowitz F., Kittel H., Ber., **66**, 1046, 1933.
306. Pauling L., Coryell C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **22**, 159, 210, 1936.
307. Roche J., Chouaiech M. S., Bull. soc. chim. biol., **22**, 263, 1940.
308. Holden H. F., Australian J., Exptl. Biol. Med. Sci., **15**, 409, 1937.
309. Keilin J., Biochem. J., **37**, 281, 1943.
310. Wyman J., J. Biol. Chem., **127**, 1, 581, 1938.
311. Coryell C., Pauling L., J. Biol. Chem., **132**, 769, 1940.
312. Theorell H., Arkiv Kemi, Mineral. Geol., **16A**, No. 14, 1942.
313. Langenbeck W., Schubert H., Naturwiss., **39**, 211, 1952.
313a. Cowgill R. W., Clark W. M., J. Biol. Chem., **198**, 33, 1952.
314. Haurowitz F., Intern. Congr. Biochem. Abstr. Commun. 1st Congr. Cambridge, Eng., **1949**, 347.
315. Jope H. M., O'Brien J. R. P., in Roughton and Kendrew, Haemoglobin, Butterworths Sci. Publ., London, 1949, p. 269.
316. Simonovits S., Balassa G., Biochem. Z., **281**, 186, 1935.
317. Coryell C. D., Stitt F., J. Am. Chem. Soc., **62**, 2942, 1940.
318. Theorell H., Arkiv Kemi Mineral. Geol., **16A**, No. 3, 1942.
319. Taylor D. S., J. Am. Chem. Soc., **61**, 2150, 1939.
320. Erdmann J. G., Corwin A. H., J. Am. Chem. Soc., **69**, 750, 1947.
320a. Granick S., Gilder H., Advances in Enzymol., **7**, 306, 1947.
321. Perutz M. F., Nature, **143**, 731, 1939.
322. Perutz M. F., Discussions Faraday Soc., No. 9, 423, 1951.
323. Pauling L., Coryell C., Dodson R. W., J. Phys. Chem., **43**, 825, 1939.
324. Wyman J., Federation Proc., **7**, 502, 1948.
325. Michaelis L., Federation Proc., **7**, 509, 1948.
326. Lancaster R., J. Anat. Physiol., **3**, 119, 1870.
327. Fox H. M., Roche J., Proc. Roy Soc. (London), **B114**, 161, 1934.
328. Griffith A. B., Compt. rend., **114**, 1277, 1892; quoted in Roche [1].
329. Mendes E. G., Pubbl. staz. zool. Napoli., **22**, 348, 1950; C. A., **45**, 3087, 1951.
330. Warburg O., Negelein E., Haas E., Biochem. Z., **227**, 171, 1930.
331. Warburg O., Negelein E., Biochem. Z., **244**, 239, 1932.
332. Fischer H., v. Seemann C., Z. physiol. Chem., **242**, 133, 1936.
333. Svedberg T., J. Biol. Chem., **103**, 311, 1933.
334. Roche J., Roche A., Compt. rend. soc. biol., **121**, 1512, 1936.
335. Krukenberg C. F. W., Centr. Med. Wissensch., **1880**, No. 23; quoted in Reinhold [5].
336. Griffith A. B., Compt. rend., **114**, 496, 1892; quoted in Roche [1].
337. Kobert R., Arch. ges. Physiol. (Pflügers), **98**, 411, 1903; quoted in Reinbold [5].
338. Halliburton W. D., J. Physiol. (London), **6**, 300, 1885.
339. Florkin M., Ann. physiol. physicochim. biol., **10**, 599, 1934.
340. Fredericq L., Compt. rend., **86**, 996, 1878; quoted in Roche [1].
341. Dhéré Ch., Compt. rend., **146**, 784, 1908.
342. Dhéré Ch., Compt. rend. soc. biol., **52**, 458, 1900; ibid., **64**, 788, 1905.
343. Henze M., Z. Physiol. Chem., **33**, 370, 1901.
344. Redfield A. C., Biol. Bull., **58**, 150, 238, 1930.
345. Redfield A. C., in Copper Metabolism, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1950, p. 174.
346. Dhéré Ch., Rev. suisse Zool., **35**, 280, 1928.

347. Hernler F., Philippi E., Z. physiol. Chem., **216**, 110, 1933.
348. Mazur A., J. Biol. Chem., **118**, 631, 1937.
349. Conant J. B., Chow B. F., Schoenbach E. B., J. Biol. Chem., **101**, 463, 1933.
350. Stedman Ed., Stedman E., Biochem. J., **20**, 949, 1926.
350a. Schulman M. P., Wald G., Biol. Bull., **101**, 239, 1951.
351. Rawlinson W. A., Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci., **18**, 131, 1940; **19**, 137, 1941.
352. Dhéré Ch., Compt. rend., **157**, 309, 1913.
353. Svedberg T., Heyroth F. F., J. Am. Chem. Soc., **51**, 539, 1929.
354. Roche J., Roche A., Adair G. S., Adair M. E., Biochem. J., **29**, 2576, 1935.
355. Pedersen K. O., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 140, 1950.
355a. Brohult S., J. Phys. Coll. Chem., **51**, 206, 1947.
356. Roche J., Arch. phys. biol., **7**, 207, 1930.
356a. Kubowitz F., Biochem. Z., **299**, 32, 1938.
357. Conant J. B., Dersch F., Mydans W. E., J. Biol. Chem., **107**, 755, 1934.
358. Florkin M., Recherches sur les hemerythrines, Thèse, Liége, 1933.
359. Krukenberg C., Vergleichende physiologische Studien, **1**, **III**, 79, 1880; **2**, **I**, 87, 1882.
360. Roche J., Bull. soc. chim. biol., **15**, 1415, 1933.
361. Florkin M., Arch. intern. physiol., **36**, 247, 1933.
362. Florkin M., Compt. rend. soc. biol., **112**, 205, 207, 705, 706, 1933.
363. Roche J., Roche A., Bull. soc. chim. biol., **17**, 1494, 1935.
364. Vegezzi G., Recherches sur quelques pigments des invertébrés, Thèse, Fribourg. 1916
365. Dhéré Ch., Vegezzi G., Compt. rend., **164**, 869, 1917.
366. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Physiol. (London), **60**, 221, 1925.
367. Roche J., Morena J., Compt. rend. soc. biol., **123**, 1215, 1218, 1936.
368. Baldwin E., Biochem. J., **32**, 1225, 1938.
369. Henze M., Z. physiol. Chem., **72**, 494, 1911; **79**, 215, 1913.
370. Califano L., Caselli P., Pubbl. staz. zool. Napoli, **21**, 261, 1950.
371. Griffith A. B., Compt. rend., **114**, 840, 1892; quoted in Reinbold [5].
372. Merejkowski, Compt. rend., **93**, 1029, 1881; quoted in Reinbold [5].
373. Dhéré Ch., Burdel A., J. physiol. et path. gén., **18**, 685, 1920.
374. Griffith A. B., Compt. rend., **115**, 259, 474, 738, 1892; **116**, 1206, 1892; quoted in Reinbold [5].

VII

БЕЛКИ В РЕАКЦИЯХ ИММУНИТЕТА

В. Бойд

W. C. Boyd, «The Proteins of Immune Reactions»
(vol. II, part B, pp. 755—844)

1. ИММУНИТЕТ

Белки по-разному принимают участие в механизме иммунитета. Белковые вещества крови иммунных животных могут связываться с проникшими микроорганизмами, в результате чего последние в большей степени поглощаются фагоцитами ретикуло-эндотелиальной системы. Белковые вещества крови могут также связываться с чужеродными клетками и вызывать их агглютинацию. Другие белки плазмы связываются затем с этими клетками и вызывают их гибель или лизис. Растворимые токсины и другие продукты обмена проникшего микроорганизма могут связываться и нейтрализоваться некоторыми белками крови хозяина. При соответствующих условиях растворимые продукты проникшего микроорганизма переводятся в нерастворимое состояние и осаждаются. Организм может вырабатывать белки, обладающие способностью повышать специфическую чувствительность некоторых его тканей (или тканей других индивидуумов, которым введена его плазма или сыворотка) к веществам, вырабатываемым проникшим микроорганизмом. Продуцированные хозяином белки, способные оказывать подобное действие, разделяются на два класса—антитела и комплементы.

Сыворотка и плазма содержат наряду с антителами и комплементами белковые вещества, которые усиливают агглютинацию клеток, как это было показано Мюиром и Браунингом [1], а также Борде и Геем [2]. Борде и Стренг [3] предложили термин «конглютинин» для термостабильных коллоидных веществ, вызывающих это действие. Конглютинин не действует в отсутствие комплемента (см. обзор Хоула и Кумбса [4]). Винер [5] расширил применение этого термина на находящийся в сыворотке и плазме фактор, вызывающий агглютинацию клеток, чувствительность которых повышена блокирующими антителами (см. стр. 504). Хоул и Кумбс [4] не согласились с таким расширенным пониманием термина «конглютинин». Дин [6] обнаружил подобную активность в фракции сыворотки, содержащей среднюю часть комплемента. Даймонд и Дентон [7] установили, что концентрированный сывороточный альбумин также обладает активностью. Активность обнаружена

и в других фракциях, например в γ-глобулине, а также у таких веществ, как камедь акации и желатина [8].

Кроме того, было показано, что растворимые продукты микроорганизмов и другие инфекционные агенты, вызывающие продуцирование антител у хозяина, сами часто являются белковыми веществами, хотя углеводы и, возможно, некоторые другие вещества могут действовать аналогично. Соединения, стимулирующие образование антител, назвали антигенами.

2. АНТИГЕНЫ

Антигенными свойствами обладают не только белки и углеводы, продуцируемые микроорганизмами и паразитами. Термин «антиген» применим к любому веществу, способному вызывать образование антител у хозяина. Белковые яды, подобные змеиному яду, могут стимулировать образование нейтрализующих антител; безвредные посторонние клетки, например эритроциты, и нетоксичные белки, подобные альбумину, также действуют как антигены. Известно, что в результате образования антител животное не всегда делается менее чувствительным; Портье и Риче [9] установили, что собаки, которым вводили ядовитые экстракты из щупалец некоторых морских анемонов, становились даже более чувствительными к ним, а морские свинки, которым вводили яичный альбумин, оказались нечувствительными к нему при первой инъекции, но гибли при повторной. Это, конечно, является основанием для включения рассмотренных случаев в общий класс иммунных явлений.

Иммунитет к ядовитому белку бобов клещевины (*Ricinus communis*) можно выработать путем кормления ими животного [10], а повышенная чувствительность к пищевым аллергенам, которые обычно являются белками, представляет собой результат поглощения антигена. Белки, гидролизованные пищеварительными ферментами (или другими путями) до составляющих аминокислот или простых полипептидов, уже не обладают антигенными свойствами. Таким образом, иммунизация в рассмотренных выше случаях является, видимо, результатом абсорбции белков, неизмененных или относительно неизмененных, из желудочно-кишечного тракта.

Поскольку гидролизованные белки не обладают антигенными свойствами, термин «антиген» обычно применяют к веществам, вызывающим образование антител, если они поступают относительно неизмененными в кровь или в ткани животного или же если они введены парентерально. В данной главе рассматриваются только белковые антигены.

Не все белки обладают антигенными свойствами. По крайней мере один из получаемых в промышленности белков—желатина не является антигеном [11]; протамины также не обладают антигенными свойствами [12]. Наряду с этими белками, которые не явля-

ются антигенами по отношению к любому животному, белки, обычно находящиеся в токе крови данного животного, или те же белки крови других представителей того же вида не являются антигенами по отношению к данному животному. Эрлих назвал этот принцип *horror autotoxicus*.

Несмотря на то что в крови животных не обнаружены антитела к белкам крови, некоторые иммунологи полагают, что они все же образуются. Если бы животное продуцировало антитела к собственному гемоглобину или к белкам плазмы, то эти антитела связывались бы с антигеном, обычно имеющимся в большом избытке, и соединения антитело—антиген быстро выводились бы из тока крови, поэтому не удавалось обнаруживать следов антитела. Таким образом, приходится допустить, что каждое животное постоянно производит антитела к собственному гемоглобину, сывороточному альбумину и сывороточным глобулинам и так далее и что эти антитела удаляются немедленно после образования. Однако по общим биологическим соображениям маловероятно, чтобы каждое животное постоянно вырабатывало в избытке определенным образом построенные молекулы, которые просто удалялись бы, не выполняя никакой полезной функции. Аминокислоты, которые входят в состав таких молекул, могли бы регенерироваться и вновь использоваться, но термодинамическая работа, затраченная на их получение, постоянно терялась бы. Очевидно, что в результате естественного отбора подобный бесплодный механизм должен был бы уже давно исчезнуть.

Экспериментальным доказательством несостоятельности предположения, что нормальные белки собственной крови являются антигенами для данного индивидуума, является тот факт, что некоторые белки тела обладают антигенными свойствами, но в обычных условиях антитела к ним не образуются. Казеин, который, как правило, не обнаруживается в токе крови, действует как антиген при введении другому индивидууму того же вида или даже тому же индивидууму, который его продуцирует.

Льюис [13] показал, что молочные козы образуют антитела по отношению к их собственному казеину. Белки линзы глаза, повидимому, также являются автоантигенными [14]. Было показано, что можно анафилактически повысить чувствительность морской свинки к белкам, содержащимся в одном ее глазу, и через некоторое время прекратить это действие путем инъекции белков из другого глаза [13].

Наряду с отсутствием антигенности у животных по отношению к белкам их крови было установлено также, что белки от родственных животных, аналогичные по химическому составу, не являются антигенами или, во всяком случае, обладают слабыми антигенными свойствами. Вообще лучшими антигенами являются белки организмов, таксономически отдаленных от подопытного животного. Большинство растительных белков являются хорошими антигенами.

Для кроликов, которые широко используются в качестве иммунологических контрольных животных, было установлено, что гемоцианин является очень сильным антигеном, в то время как, например, гемоглобин лошади—слабый антиген. Действительно, гемоглобин обладает настолько слабыми антигенными свойствами, что некоторое время его ошибочно считали не антигеном. Более тщательными исследованиями были доказаны его антигенные свойства [15, 16]. Как показали Хукер и Бойд [17], яичный альбумин курицы является хорошим антигеном для кроликов, но не для уток. Белки сыворотки лошади, особенно альбумины, являются хорошими антигенами для кролика, а также для человека. Очень малые количества сыворотки лошади (около 0,01 *мл*), содержащиеся в смесях токсин—антитоксин, применяемых для иммунизации к дифтерии, обычно повышают чувствительность больше чем у 25% индивидуумов, которым были произведены инъекции [18]. Кристаллический яичный альбумин не используют в качестве заменителя крови из-за аллергических реакций, которые он вызывает («сывороточная болезнь»). В противоположность этому только в одном случае удалось вызвать образование антител у шимпанзе при инъекции крови человека.

А. Условия антигенности

Можно надеяться, что когда-нибудь мы сумеем ответить на вопрос, что́ является причиной антигенных свойств данного белка по отношению к данному животному. В настоящее же время невозможно дать исчерпывающий ответ на этот вопрос. Если попытаться обобщить имеющиеся неполные данные, то можно высказать следующие положения [15].

1) Антигены должны быть чужеродными по отношению к крови экспериментального животного, и чем дальше отстоит таксономически данное животное от экспериментального, тем больше антигенность белка данного животного.

Белки, выполняющие очень близкие функции у различных видов, имеют сходный химический состав, и этим, несомненно, объясняются слабые антигенные свойства таких белков. Гемоглобин лошади—слабый антиген для кролика, но белки плазмы являются хорошими антигенами. Можно предположить, что белки плазмы, особенно глобулины, имеют более специфический характер по сравнению с гемоглобином, функция которого почти одна и та же у всех млекопитающих. Точно также инсулин даже от животных отдаленных видов, таких, как свинья и корова, редко является антигеном для человека [19]. Инсулин выполняет одну и ту же функцию у всех высших животных и поэтому не должен сильно изменяться в химическом отношении от вида к виду (см. гл. VIII).

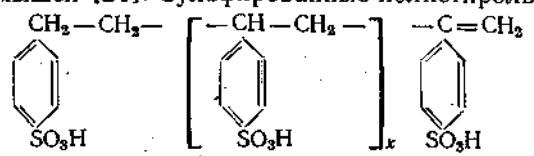
2) Антигены должны обладать определенными степенью сложности и молекулярными размерами. Это подтверждается тем, что

протамины и относительно простые молекулы желатины не являются антигенами, а также тем, что большие молекулы гемоцианинов обладают сильными антигенными свойствами.

По Гауровитцу [20], другой предпосылкой антигенности является жесткая структура детерминантных групп. Он полагает, что высокоспецифическое действие ароматических диазосоединений обусловлено жесткостью их бензольных колец. В то же время неспособность высокомолекулярных жирных кислот действовать в качестве детерминантных групп объясняется тем, что жирные цепи легко деформируются и их форма непрерывно меняется.

Делались различные предположения о причинах антигенности, и некоторые из этих гипотез вытекают из сравнения желатины с другими белками. Первое предположение такого рода высказали Обермайер и Пик [21]. В статье, которая часто неправильно цитируется, они пишут: «Вполне вероятно, что специфические для данного вида организмов группы в молекуле белка подвергаются воздействию групп, которые связаны с ароматическими ядрами белка. Следует настоятельно подчеркнуть, что наличие одних ароматических групп, естественно, недостаточно для объяснения того огромного числа возможных изменений, которые встречаются в природе, и что наша концепция о роли ароматических групп сводится к тому, что они являются как бы центром, вокруг которого группируются специфические группы боковых цепей отдельных видов; введение замещающих групп сглаживает эти видовые различия». Очевидно, что эти авторы больше касались вопросов специфичности, чем антигенности, но их часто цитируют [22] таким образом, как будто бы наличие ароматических аминокислот необходимо для проявления антигенных свойств.

Очевидно, что присутствие ароматических аминогрупп в антигене не является достаточным основанием для появления антигенных свойств, отсутствие их не означает также, что данное вещество не может быть антигеном. Белки, «рацемизированные» (что, вероятно, является результатом денатурации или гидролиза) путем обработки щелочью [23], теряют антигенные свойства, хотя некоторые ароматические аминокислоты, которые могли содержаться в них, остаются и после такой обработки. Пневмококковые полисахариды, не содержащие ароматических групп, являются антигенами для человека и мышей [24]. Сульфированные полистиролы, содержащие



Сульфированный полистирол

большое количество ароматических групп, не обладают антигенными свойствами [25].

Белки, измененные настолько, что они не дают больше абсорбционных полос, характерных для ароматических колец, еще остаются антигенами [26, 27].

Кэмпбелл и Балмен [28] полагают, что вещество, чтобы стать антигеном, должно быть хотя бы частично восприимчивым к действию гидролитических ферментов животного, которому оно вводится. Общая применимость этого правила сомнительна, но отсутствие антигенных свойств у сульфированных полистиролов согласуется с этим правилом.

Маловероятно существование «специфических боковых цепей для разных видов», предполагаемых Обермайером и Пиком [21]. Видовая специфичность, несомненно, связана с общими химическими различиями в молекулах антигена.

Более того, неантигенные белки могут становиться антигенами при такой обработке, когда в их состав не вводятся ароматические остатки. Белки, обработанные щелочью, могут снова приобретать антигенные свойства при нитровании [29] и иодировании [30]. Желатина приобретает антигенные свойства при взаимодействии с различными химическими веществами, например с арсаниловой кислотой [11]. Известно, что арсаниловая кислота является ароматическим соединением и соединяется с ароматическими группами (тирозин и гистидин) в белковой молекуле, но маловероятно, чтобы ароматический характер введенной группы имел бы такое же значение, как ее кислотные свойства [31].

Гауровитц [16] объясняет отсутствие антигенных свойств у желатины тремя причинами: 1) желатина представляет собой белок, денатурированный при нагревании и потому не обладающий определенной внутренней структурой; 2) желатина не остается в организме, в который она введена, а быстро удаляется из него; 3) желатина содержит большое количество глицина, единственной аминокислоты, не имеющей боковых цепей в α-положении. Подобные связи позволяют осуществлять свободное вращение вокруг продольной оси, в результате чего молекула не имеет определенной конфигурации [32]. Вполне вероятно, что антиген должен иметь определенную структуру, чтобы получился обратный отпечаток при механизме образования антитела.

Первое и третье условия сводятся к одному. Вполне вероятно, что белок без определенной структуры не может дать отпечатка, возникающего при образовании антитела. Однако две независимые группы исследователей определенно показали [11,33], что введение некоторых химических групп в желатину делает ее антигеном. Сомнительно, чтобы введение этих групп придавало молекуле желатины такую жесткую конфигурацию, которая отсутствовала до введения.

Известно, что после инъекции желатина быстро выводится из организма. По этим соображениям ее нельзя использовать в каче-

стве заменителя крови. Однако нет оснований предполагать, что желатина, связанная с арсаниловой кислотой, после инъекции более длительно удерживается в организме животного. Действительно, большинство антигенов быстро удаляется из крови, и обычно тем быстрее, чем лучшими антигенами они являются. Количество антигена, которое удерживается и служит шаблоном для построения антител, слишком мало для определения. Практически невозможно доказать, что такое малое количество желатины неспособно удержаться аналогичным образом. Кроме того, это соображение не следует понимать в обратном смысле. Камедь акации, которую применяли в качестве заменителя крови во время первой мировой войны, удерживается в организме довольно долго, однако она не вызывает образования антител. Мышь можно иммунизировать достаточными дозами полисахарида пневмококков, однако слишком большая доза не только не вызывает иммунизацию, но приводит к тому, что мышь становится вообще неспособной к иммунизации. Небольшое количество полисахарида, по-видимому, удерживаемое организмом и не обнаруживаемое обычными методами, не вызывает, однако, образования антител.

Ни одну из существующих в настоящее время теорий антигенности нельзя признать полностью приемлемой. Антигены должны быть чужеродными по отношению к крови организма и не должны обладать слишком простой структурой. Это почти все, что известно о них. Можно остановиться на проблеме антигенности производных желатины. Единственно возможное допущение сводится к тому, что химическая обработка делает структуру желатины более жесткой и доступной воздействию ретикуло-эндотелиальных клеток кролика. Нитрование и иодирование, по-видимому, недостаточны для этой цели.

Ни одна из специальных теорий антигенности не может объяснить слабых антигенных свойств инсулина и гемоглобина; очевидно, это вызвано близостью химических свойств этих белков, какого бы они ни были происхождения—лошади, быка или свиньи,—к соответствующему белку экспериментального животного.

Б. Природа антигенных детерминантов

Антигенная специфичность белковой молекулы не является функцией всей молекулы, а, по-видимому, ограничивается небольшими участками, которые получили название антигенных детерминантов. Это подтверждается тем фактом, что белковые антигены связываются с несколькими молекулами антител (см. ниже), показывая тем самым, что в молекуле антигена существует большое количество центров, с которыми специфически связываются молекулы антитела. В результате изучения гаптенов (см. ниже, стр. 493) было выяснено также, что антитела могут обладать специфичностью и реагировать

с молекулами гораздо меньших размеров, чем нативные молекулы белков.

Ландштейнер [34] изучал реакции антител для белков шелка с продуктами гидролиза белков шелка. Он нашел, что пептиды, полученные из шелка, с молекулярным весом порядка 600—1000 реагируют специфически с антителами для белков шелка. Антигенные детерминанты в неповрежденной молекуле шелка имеют, по-видимому, размеры того же порядка; возможно, что эти молекулы могут быть даже меньших размеров, поскольку вполне вероятно, что меньшие части молекулы могут принимать несколько иную пространственную конфигурацию, даже если они содержат те же аминокислоты и в таком же расположении, как и части исходной молекулы, обладающие функцией антигенных детерминантов. При распаде молекул могут разрываться межмолекулярные связи, например водородные связи и т. д. В таком случае имеет место другое расположение зарядов по отношению к антителу в сравнении с тем, которое было в неповрежденной молекуле, и поэтому они уже не являются иммунологически подобными.

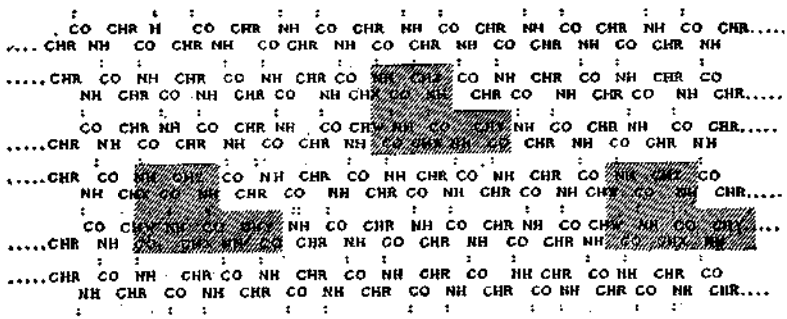
Нет оснований предполагать, что антигенные детерминанты в белках представляют собой простетические группы углеводов или другой небелковой природы. На поверхности глобулярных белков имеются отрицательно заряженные группы ($RCOO^-$) остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот и положительно заряженные группы (RNH_3^+) остатков лизина и аргинина. Кроме того, фенольные гидроксилы в тирозильных и имидазольных группах остатков гистидина имеют полярный характер. В работе Ландштейнера [31] по «синтетическим» антигенам было показано, что полярные группы имеют решающее значение для специфичности.

Меррек [35] полагает, что некоторые из этих аминокислотных остатков действуют совместно в образовании «активного центра» на поверхности антигена с достаточной полярностью для создания сильного связующего центра с характерным строением и распределением полярных групп, чтобы этот центр мог быть специфически характерным для данного белка. Он предполагает, кроме того, что существует ряд таких «активных центров» с одинаковой или очень близкой специфичностью (рис. 47).

Гауровитц [16] высказал предположение, что антигенные детерминанты белка образуются в результате определенного расположения групп тирозина, свободных аминогрупп и, возможно, других групп на поверхности белковой молекулы. В подобных детерминантах полярные группы играют основную роль.

Роль отдельных аминокислотных остатков в антигенных детерминантах нативных белков не выяснена. Возможно, что какая-то часть достаточно большой белковой молекулы может играть роль детерминанта, причем специфичность его определяется числом и расположением различных аминокислот. Клечковский [36]

нашел, что при введении атомов иода во все группы тирозина сывороточного глобулина лошади последний теряет способность соединяться с антителом против нативного сывороточного глобулина лошади. Это доказывает, по-видимому, что остаток тирозина представляет собой существенную часть детерминантных групп этих специфических белков (если принять, что галоидирование не вызывает других изменений). Очевидно, этот остаток не играет столь существенной роли в некоторых других белках.



Р и с. 47. Слой белковых полипептидных цепей, удерживаемых иминокарбонильными водородными связями.

R—аминокислотные остатки. Заштрихованные участки показывают площади (активные участки Меррека), где остатки аминогрупп W, X, Y и Z по каким-то причинам (возможно, в результате большей полярности) имеют большее значение для антигенных детерминантов; они повторяются с одним и тем же расположением через определенные интервалы.

Прессмен и Штернбергер [37] нашли, что гаптен, соединяющийся специфически с антителом, предохраняет последний от изменения его иодом. Поскольку введение небольших количеств иода действует только на остатки тирозина, гистидина и цистеина, то, по-видимому, некоторые или все из указанных остатков могут быть существенной составной частью специфических связывающих групп. Портер [38] установил, что, несмотря на то, что все остатки гистидина в γ-глобулине кролика и в яичном альбумине способны к соединению с фтординитробензолом, один остаток гистидина в антиовальбумине кролика не способен к этой реакции. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что гистидин образует часть связующей группы антитела или антигена.

1) ИЗМЕНЕННЫЕ БЕЛКИ

В целях выяснения химической основы антигенной специфичности изучались иммунологические реакции химически измененных белков. Ниже коротко суммированы результаты этих исследований.

Денатурация даже в случае сильных методов воздействия, таких, как обработка сильными кислотами, ацетоном, спиртом, мочевиной или нагреванием, не приводит к полному исчезновению антигенной специфичности белка (см. т. II, гл. VI). В зависимости от степени денатурации денатурированные белки могут реагировать в большей или меньшей степени с антителами против нативного белка. В некоторых случаях денатурированный белок не реагирует одним путем (осаждение), но реагирует другим образом (специфически ингибирует реакцию антитела с нативным антигеном) [21, 39—41]. Инъекция денатурированного белка в некоторых случаях может вызвать образование антител, реагирующих как с нативным, так и с денатурированным белком [42]. Нагревание большинства белков в растворе быстро делает их неспособными к явному взаимодействию с их антителами, хотя казеин выдерживает нагревание до 100°. Однако в подобных случаях антигенные свойства теряются неполностью, и такие прогретые белки при инъекции часто вызывают образование антител. В некоторых случаях антитела к прогретому белку реагируют с прогретыми белками других типов [31].

Гейдельбергер и другие [43—45] установили связь между изменением иммунологических свойств и изменением физических и химических свойств (вязкости, электрофоретической подвижности, седиментации в ультрацентрифуге) у яичных альбуминов, денатурированных путем дезаминирования и обработки кислотой. Ни один продукт не достигает конечной степени денатурации, которая, согласно Астбери и другим [46], сводится к полному нарушению любой специфической структуры. Исследования Гейдельбергера подтвердили предположение о существовании различных степеней денатурации.

Высказано предположение, что денатурация не всегда одинаково влияет на основную природу антигенных детерминантов белка, но в некоторых случаях денатурация может вызывать изменения одного и того же или близкого порядка в различных белках, в результате чего они приобретают ранее отсутствовавшие близкие иммунологические свойства. О природе подобных изменений известно немного. Большинство химических воздействий, рассмотренных ниже, приводит к денатурации белков в большей или меньшей степени, а также вызывает специфические химические изменения белков.

Окисление белков перманганатом приводит к образованию продуктов, способных вызывать иммунитет. Образуются антитела, которые осаждаются введенным антигеном, но не осаждаются ни другими белками, обработанными аналогичным образом, ни исходным белком [31]. Таким путем видовая специфичность сохраняется, хотя иммунологическая природа белка полностью изменяется. Остается невыясненным, какие изменения, вызываемые обработкой перманганатом, служат причиной этого явления.

Восстановление сывороточного альбумина тиогликолевой кислотой несколько уменьшает его серологическую активность, но, по-видимому, не изменяет активности яичного альбумина [47].

Переваривание белков ферментами (если оно зашло достаточно далеко) приводит к потере ими способности осаждаться антителами против исходного белка, но инъекция частично деградированного обработкой пепсином белка может вызвать образование антител, реагирующих с метабелком и с исходным белком [31].

Обработка белков кислотой и щелочью снижает их антигенную активность, причем щелочи в этом отношении более активны. Белки, обработанные кислотой, иногда приобретают способность реагировать с антителами не родственных белков, обработанных аналогичным образом [31].

Дезаминирование казеина не изменяет его наиболее характерных антигенных свойств [48]. Этот факт свидетельствует о том, что свободные аминогруппы не играют заметной роли в антигенных детерминантах этого белка. Гейдельбергер и Маурер [45] показали, что удаление приблизительно одной трети свободных аминогрупп из яичного альбумина не изменяет его серологической специфичности.

Плакальбумин образуется из яичного альбумина под действием фермента из *Bacillus subtilis* [49] с выделением одного пептида [50, 51]. Плакальбумин осаждает не все антитела в антисыворотке против яичного альбумина [52], что позволяет предположить, что пептид играет некоторую роль в антигенных детерминантах нативного яичного альбумина.

Обработка формальдегидом. Белки, обработанные формальдегидом, могут реагировать с антителами против белков других видов, обработанных формальдегидом. Джекобс и Соммерс [53] полагают, что изменения, вызванные формальдегидом, примерно того же порядка, что и изменения, возникающие при нагревании, в отличие от более значительных изменений, вызываемых галоидированием или нитрованием. Токсоиды, полученные при обработке токсинов формальдегидом, теряют токсические свойства, но сохраняют свою антигенность и способность осаждаться антителами почти неизмененными. Это подтверждает тот факт, что группы, измененные в результате обработки формальдегидом, являются существенными для токсических групп белка, но не для групп, определяющих их иммунологическую специфичность. Эти два типа групп, по-видимому, четко различаются.

Возможно, что свободные аминогруппы имеют значение для токсичности, но не для антигенности, хотя Хевитт [54] полагает, что реакция формальдегида с белками в таких случаях отличается от подобных реакций со свободными аминогруппами: она протекает

медленно и необратимо и при этом связываются меньшие количества формальдегида. Во всяком случае, другие обработки, которые связаны с реакциями со свободными аминогруппами (например, обработка газообразным кетеном), нейтрализуют токсичность токсина [55, 56].

Интересно, что оптическое вращение токсина не изменяется при обработке формальдегидом; это свидетельствует о том, что оптически активные атомы углерода, смежные с пептидными связями, не рацемизируются [57].

Этерификация белков при обработке спиртом в присутствии кислоты или при обработке диазометаном приводит к образованию нерастворимых продуктов, которые еще сохраняют антигенные свойства, но теряют способность реагировать с антителами против неизмененных белков [31].

Ацилирование уксусным ангидридом дает продукты, которые ведут себя как метилированные белки. Ландштейнер [31] пришел к выводу, что сильнее всего связываются амино- и гидроксильные группы. Установлены некоторые перекрестные реакции между видоизмененными белками, содержащими различные ацильные группы.

Введение бензольных групп путем обработки бензоилхлоридом приводит к появлению новой специфичности, общей для бензоилированных белков [58].

Гонт и Вормел [59], обрабатывая белки карбобензоксихлоридом, получили их карбобензоксипроизводные. Эти авторы считают, что реакция идет в основном за счет свободных аминогрупп. При этом начальная видовая специфичность почти полностью нарушается и антитела, полученные таким путем, реагируют с другими белками, обработанными аналогичным образом. Эти реакции полностью ингибируются карбобензоксиаминокислотами, что свидетельствует о том, что наиболее существенной составной частью нового детерминанта является $—NHCOOCH_2C_6H_5$. Это подтверждается тем, что фенилкарбамидаминокислоты также являются в некоторой степени ингибиторами.

Галоидирование белков изучено довольно широко [60, 61]. Иодированные белки приобретают новую специфичность, и соответствующие им антисыворотки реагируют с другими иодопротеинами. Бромированные белки мало отличаются от иодированных белков и дают с ними перекрестные реакции. Вормел [61] нашел, что реакции иодопротеина с его антителом специфически ингибируются 3,5-дииод- или 3,5-дибромтирозином. Снэппер и Грунбаум [62] установили, что любое вещество, содержащее 3,5-дииод-4-оксигруппы, также ингибирует эту реакцию. Таким образом, существенными группировками в антигенных детерминантах галоидированных белков является галоидированный тирозин (и, вероятно, галоидированный гистидин, который, по-видимому, ведет

себя аналогично). Возможно, однако, что продуцированные антитела исключительно специфичны не для галоидированного тирозина как такового, но для тирозина в структуре, непосредственно связанной с соответствующими группами белка.

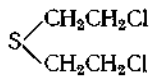
Белки, которые содержат небольшое количество иода, серологически ведут себя подобно нативным белкам и являются устойчивыми [63].

Нитрование белков осуществляют путем обработки азотной кислотой или тетранитрометаном [31, 61]. Ксантопротеины дают перекрестные серологические реакции друг с другом. Это, по-видимому, связано с наличием групп нитротирозина и нитротриптофана, так как Мутсаарс [60] установил, что они специфически ингибируются веществами, содержащими нитро- и гидроксильные группы в бензольном кольце вместе с карбоксильной группой, свободной или этерифицированной. Нитрование желатины, которая вследствие относительно небольшого содержания ароматических аминокислот связывает мало нитрогрупп, не приводит к появлению антигенных свойств [60, 64]; но нитрованная желатина ингибирует реакцию антител против других нитрованных белков с их антигенами.

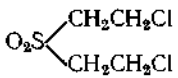
Остаточная нативная специфичность. В случае обработанных белков, как правило, образуется некоторое количество антител, специфических для необработанного белка. Даже антитела против введенной группы лучше реагируют с этой группой, если последняя соединена с тирозином. Хукер и Бойд [65] использовали антитела против белков сыворотки лошади, соединенные с арсаниловой кислотой, и казеин-арсаниловую кислоту в качестве пробных антигенов; они нашли, что специфическая ингибирующая активность, рассчитанная на моль вещества, быстро увеличивается в ряду: арсаниловая кислота, фенолазоарсаниловая кислота (или имидазолазоарсаниловая кислота), желатина-азоарсаниловая кислота. Ингибирующая способность гаптена тем больше, чем он ближе по своей природе к действующему детерминанту в антигене, определяющему продуцирование антител. Это указывает на то, что «антиарсаниловые» антитела направлены не только против введенной группы арсаниловой кислоты, но и по отношению к остаткам тирозил-(и гистидил-)азоарсаниловой кислоты и оказывает некоторое влияние и на другие (преимущественно смежные) части исходной белковой молекулы. Ландштейнер [31], используя антитела против метилированных, ацилированных, галоидированных и нитрованных белков в тех случаях, когда антитела против нативного белка совсем не продуцируются, пришел к выводу, что если опыт проводится с пониженными количествами антител, то реакция протекает интенсивнее только с вполне гомологичным антигеном; это свидетельствует о том, что специфичность зависит в некоторой степени от специфической белковой основы.

Диазотирование. Обработка белков азотистой кислотой приводит к дезаминированию и введению диазогрупп в ядра тирозина и триптофана (возможно, и гистидина) [66] и способствует образованию антигенов, которые почти не отличаются от нитропротеинов [31, 61, 67, 68].

Иприт соединяется с белками, как и соответствующий сульфон. В обоих случаях образуются соединения с новой специфичностью, хотя это и не является столь неожиданным, как в некоторых других случаях, описанных выше.



Иприт



Сульфон

Производные иприта и сульфонов не дают перекрестных реакций, что указывает на существенное значение кислорода или степени окисления серы [69]. Беренблюм и Вормел [69] считают, что реакция происходит за счет связывания свободных аминогрупп белков.

Фенилизоцианат связывается свободными аминогруппами лизина [70]. Хотя замещаются не все свободные аминогруппы, перекрестные реакции с необработанным белком значительно ослаблены (что указывает на значение аминогрупп для специфичности) и появляется новая специфичность. Реакции могут специфически ингибироваться соединениями фенилизоцианата с лизином или ε-аминогексановой кислотой; соединения других аминокислот менее эффективны. Антисыворотка слабо реагирует с измененными белками (включая желатину), полученными путем их обработки диазотированным анилином, вероятно вследствие сходства групп $-CONHC_6H_5$ и $-N=NC_6H_5$.

β-Нафтохинонсульфонат соединяется с белками и образует антигены, продуцирующие антитела, которые реагируют с инородными белками, обработанными аналогичным образом [71]. Предполагают, что в реакцию вовлекаются аминогруппы.

Веттер и Дейч [72] исследовали влияние на антиген (овомукоид) реакций ацетилирования, этерификации, иодирования и сочетания с диазосоединениями; Гребер и Каминский [73] изучали эффект перехода яичного альбумина в плакальбумин, влияние диазотирования, ацетилирования, тепловой денатурации, встряхивания и ультразвуковых колебаний.

Мелкил [74] исследовал действие ультразвуковых колебаний на вирус мозаики табака и пришел к выводу, что такая обработка приводит к возникновению некоторых новых антигенных групп в молекуле.

2) КОНЪЮГИРОВАННЫЕ БЕЛКИ

Конъюгированные белки отличаются (относительно) от измененных белков тем, что они дают возможность изучать реакции продуцированных ими антител с введенными в эти белки группами и их гомологами независимо от их белковой матрицы. Этим путем можно определить предел сложности химической структуры антигена, которая находит отражение в структуре антител, что является основным источником знания по этому важному предмету. Влияния антител, специфичных для белкового носителя (который обычно также продуцируется), можно избежать, изучая реакции антител с неродственными белками, обработанными аналогичным образом. Существуют три основных метода присоединения вводимых групп: а) соединение с органическими галоидопроизводными через сульфгидрильные группы, б) соединение с азидами, в) соединение с диазотированными аминами. Последний метод применяют значительно чаще первых двух.

а) Соединение через сульфгидрильные группы. Пиллимер с сотрудниками [75] вводил химические группировки в белки путем восстановления дисульфидной серы последних в сульфгидрильные группы с последующим взаимодействием этих групп с органическими галоидопроизводными, согласно уравнению

$$ASH + RX \longrightarrow ASR + HX.$$

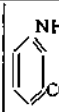
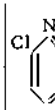
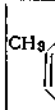
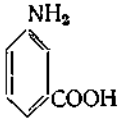
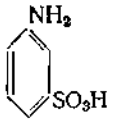
Этот метод оказался особенно пригодным для кератинов вследствие большого содержания в них дисульфидной серы.

б) Обработка азидами. Клаттон с сотрудниками [33,76] вводил в белки структурные единицы и их N-карбобензоксипроизводные путем обработки азидами. Это позволило изучить влияние введенной О-β-глюкозидо-N-карбобензокситирозильной группы $C_6H_{11}O_5OC_6H_4CH_2CHNH_2CO—$. При этом исходная специфичность полностью исчезала и появлялась новая. В результате такой обработки желатина приобретала антигенные свойства. Тироксильные, группы, введенные аналогичным путем в белки, образуют антигены, продуцирующие антитела, которые слабо реагируют с тироглобулином, что подтверждает предположение о том, что тироксин является важной составной частью антигенных детерминантов этого белка.

в) Обработка диазотированными аминами. Этим методом можно ввести в белок любое соединение, которое связывается с первичным ароматическим амином. Таким путем удалось изучить специфичность антител к пептидам, углеводам, алкалоидам, а также к таким простым соединениям, как дикарбоновые кислоты. Рассмотрим прежде всего выводы Ландштейнера [31], полученные им на основании изучения антисыворотки по отношению к белкам, соединенным с различными замещенными ароматическими аминами. Общее представление о достигнутых при этом результатах дает табл. 41.

Таблица 41

ПРИМЕР СПЕЦИФИЧНОСТИ АНТИСЫВОРОТКИ ПРОТИВ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЕМ БЕЛКОВ С ПРОСТЫМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ АМИНАМИ [331]

Антисыворотка, полученная против антигенов, содержащих ароматический амин	Испытано по отношению к антигенам, содержащим ароматический амин					
						
	0	+++	0	++++	+++	+
	0	0	0		0	++++

Примечание. 0 реакции нет, + реакция положительна, ++++ реакция протекает очень интенсивно.

В некоторых случаях, по-видимому, достигается полная специфичность, т. е. антитела реагируют только с гомологичным антигеном, но чаще всего происходят перекрестные реакции, хотя реакция с гомологичным антигеном почти всегда протекает более интенсивно. Механизм, в результате которого образуется антитело, как будто способен «различать» очень тонкие особенности структуры введенных группировок (гаптенов), но не является абсолютно специфичным. Очевидно, антитела, которые отражают каким-то образом электронную структуру гаптена, не отражают точно каждую деталь: «имеется некоторая расплывчатость очертаний».

3) ЗНАЧЕНИЕ ПОЛЯРНЫХ ГРУПП

Ландштейнер пришел к выводу, что природа кислотных заместителей в гаптене имеет решающее значение. Антитела против одного белка, обработанного сульфаниловой кислотой, реагируют с различными сульфоновыми кислотами, но незначительно взаимодействуют с карбоновыми кислотами, и наоборот. Определяющее значение групп арсаниловой кислоты еще сильнее.

Введение «нейтральных» групп, таких, как метильные, галоидные, метокси- и нитрогруппы, оказывало меньшее влияние. Среди такого рода соединений наблюдалось большое число перекрестных реакций; исключение составляли соединения, содержащие карбонильные или ацетиламиногруппы. Сильноосновные группы также оказывают определяющее влияние на специфичность [77].

Значение заряженных групп в гаптенах выяснили Ландштейнер и Ван-дер-Шир [78], которые показали, что антитела против «нейтральных» гаптенов реагируют также с белками, соединенными с метиловым эфиром *п*-аминобензойной кислоты, в то время как этот конъюгированный белок слабо реагирует с антителами против *п*-аминобензойной кислоты. При гидролизе этого белка, при котором удаляются метильные группы, образуется антиген, уже не реагирующий с антителами против «нейтральных» гаптенов и интенсивно реагирующий с антителами против *п*-аминобензойной кислоты.

Исключительно сильное влияние этерификации заставило Ландштейнера [31] сделать вывод, что концевая группа введенного гаптена имеет особенно большое значение для специфичности. Наличие кислотных групп, по-видимому, также усиливает специфичность ядер, в которых они находятся, в результате чего и другие заместители в этом ядре оказывают большее влияние, чем обычно.

4) ВЛИЯНИЕ ИЗОМЕРОВ

Большое значение имеет положение заместителей в бензольных ядрах. Это было показано для случая специфичности трех различных аминобензойных кислот и аминокоричных кислот. Положение кислотных групп по отношению к азогруппе (место присоединения к белку) определяет специфичность и возможность перекрестных реакций [31].

Ландштейнер исследовал гаптены, представляющие собой алифатические цепи, путем присоединения их к бензольному кольцу, несущему другую аминогруппу, обычно посредством связи —CONH—. Оказалось, что алифатическую часть можно изменять, как угодно [31].

Антитела против щавелевой и янтарной кислот обладают заметной специфичностью, но в случае высших кислот (адипиновой и субериновой) наблюдаются налагающиеся перекрестные реакции, и удлинение цепи на одну метиленовую группу не вызывает таких изменений, как в случае щавелевой кислоты [31].

Паулинг и Прессмен [79] изучали ингибирование гаптенами осаждения антисывороткой, гомологичной к *о*-, *м*- и *п*-азофениларсаниловым группам, и на основании интенсивности наблюдаемых перекрестных реакций пришли к выводу, что связующий центр антитела соответственно адаптирован пространственно

к гомологическому гаптену, однако он может, вероятно путем небольшого растяжения (около 1 Å), приспосабливаться к изомерным гаптенам. Они установили также хорошее соответствие между энергиями, рассчитанными из вандерваальсовых сил сцепления, и изменением свободной энергии $RT \ln K_0'$.

5) СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕПТИДОВ

Специфичность аминокислот и пептидов изучали [31] аналогичным образом путем конденсации их с ароматическими аминами. Полученные антитела были достаточно специфичны и давали перекрестные реакции только с очень близкими аминокислотами, например между глицином и аланином, валином и лейцином, аспарагиновой и глутаминовой кислотами, но даже эти родственные аминокислоты можно было легко различать.

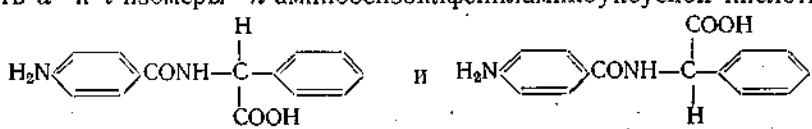
Антитела против дипептидов наиболее сильно осаждают гомологичный антиген, но дают налагающиеся реакции с другими пептидами, в которых содержится та же концевая аминокислота, как и в иммунизирующем антигене. Напротив, влияние концевой группы в гаптене (как и любого антигенного детерминанта) вполне доказано. Для пептидов с более длинными цепями наблюдались перекрестные реакции по отношению к некоторым неконцевым аминокислотам.

Опыты с пептидными гаптенами подтверждают представление о том, что антигенные детерминанты в нативных белках представляют собой участки, характеризующиеся определенным расположением аминокислот. Разнообразие, наблюдаемое в случае относительно простых изученных пептидов (до пентапептидов), подтверждает, что здесь имеется достаточная возможность для широкого набора специфичностей, наблюдаемых в белковых антигенах.

6) ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ИЗОМЕРОВ

Рассмотренные выше исследования по влиянию изомеров позволили установить важную роль пространственного расположения групп и их химической природы. Это положение подтверждается поведением ферментов и оптических изомеров лекарственных веществ и красителей. Следовательно, можно ожидать, что при образовании антител будет наблюдаться различие между оптическими изомерами.

Ландштейнер и Ван-дер-Шир [80] смогли серологически различить *d*- и *l*-изомеры *n*-аминобензоилфениламиноуксусной кислоты



Можно было также различить три формы винной кислоты: правую, левую и мезоформу. Полученная антисыворотка реагировала соответствующим образом с изомерами яблочной кислоты. Было показано, что при помощи серологических методов можно определять неизвестные оптические конфигурации в тех случаях, когда нет более доступных методов.

Гебель и Эвери [81] добились больших успехов в серологическом разделении стереоизомеров. Они приготовили антитела, которые дали возможность отчетливо отличать глюкозу от галактозы, и другие антитела, позволяющие дифференцировать α- и β-глюкозы. В последнем случае различие было менее четким, и можно предположить, что здесь был достигнут предел способности иммунного механизма определять стереоизомерные различия.

При замещении водорода у шестого атома углерода в β-глюкозиде ацетильной группой был получен новый гаптен, не реагирующий с антителами против α-глюкозида и реагирующий слабее, чем обычный гомологический гаптен с антителами против неацетилированного β-глюкозида. При изучении дисахаридов в качестве гаптенов [82] было установлено, что детерминирующие признаки определяются молекулярной структурой сахара в целом, пространственной и химической конфигурацией концевой гексозы и положением связи между двумя сахарами. Антитела против глюкозы и глюкуроновой кислоты сильно различаются между собой и не дают перекрестных реакций [83]. Это снова указывает на существенное влияние сильно полярных групп.

Были получены специфические антитела против различных органических соединений, включая гетероциклические соединения [84, 85], тироксин [33], производные пиразолона [86, 87], канцерогенные углеводороды [88], стрихнин и бруцин [89] и сульфонамиды [90, 91]; однако эти результаты не внесли серьезных изменений в существующие представления о природе и размерах антигенных детерминантов в нативных белковых антигенах.

Паулинг с сотрудниками [92] провел обширное исследование антител против искусственных антигенов, полученных введением *о*-, *м*- и *п*-арсаниловых кислот и *п*-(*п*-аминофенилазо)фениларсаниловой кислоты в различные белки. Были изучены их реакции с соответствующими гаптенами и выполнены количественные исследования, на основании которых был сделан вывод о поливалентности (или двухвалентности в некоторых случаях) антител и рассчитаны энергии связи для реакций гаптена с гомологическими антителами и антителами против изомерных гаптенов. Обычно наблюдаемое осаждение двухвалентных гаптенов, получаемых из диазотированной арсаниловой кислоты, Паулинг рассматривал как серьезное подтверждение поливалентности антитела (этот вопрос был тогда спорным). Однако позднее было показано [93, 94], что бо́льшая часть изученных двух- и трехвалентных гаптенов находилась в растворах

в агрегированном состоянии. В действительности Паулинг с сотрудниками [95] не смог получить подобные осадки (за исключением одного гаптена) с антителами, гомологичными по отношению к группе *п*-азобензойной кислоты, подтвердив тем самым более раннюю работу Хукера и Бойда [96].

Каруш [97] показал, что при добавлении к сыворотке больших количеств таких органических соединений последние адсорбируются альбумином, что сказывается на количественных расчетах реакций между антителами и ингибирующими или осаждающими гаптенами. Аналогичные данные получили Парде и Паулинг [98]. Меррек считает [99], что «расчеты Паулинга и его сотрудников, основанные на результатах опытов, в которых красители добавлялись к цельной сыворотке, не обоснованы. Расчеты, касающиеся ингибирования, неверны вследствие адсорбции ингибитора на альбумине; расчеты в отношении количества осадка, образуемого красителем с антисывороткой, неверны, поскольку не были учтены полимеризация красителя, адсорбция красителя на альбумине и дополнительное осаждение инертного белка». Эйзен и Каруш [100], обсуждая вопрос о больших количествах антител, полученных Кэмпбеллом с сотрудниками [101], а также Мерреком [99], полагают, что часть их составляет инертный белок, который осаждается и может быть переосажден применяемым красителем.

Парди и Паулинг [98] полагают, что в сыворотке равновесие между монодисперсным и агрегированным красителями смещено в сторону мономерной формы; Прессмен и Сигал [102] указывают на то, что большинство выводов, основанных на опытах с красителями в качестве гаптенов, хорошо обоснованы. В соответствии с этим Кэмпбелл и Балмен [28] показали, что краситель, содержащий две различные гаптеновые группировки R и X, не осаждается одной какой-либо сывороткой—анти-R или анти-X, которая должна была бы осаждать их в том случае, если бы они образовывали агрегат, но осаждается только смесью антисывороток.

В. Число антигенных детерминантов, приходящихся на одну молекулу белка

В настоящее время еще не возможно рассчитать, сколько антигенных детерминантов, или «активных центров», существует на поверхности данной белковой молекулы. Единственной экспериментальной основой является анализ специфических осадков, который позволяет определить число молекул антитела, взаимодействующих одновременно с одной молекулой антигена. Очевидно, что количество антигенных детерминантов на молекулу должно соответствовать по крайней мере полученному таким образом максимальному значению для данного антигена. Типичные результаты приведены в табл. 42.

Таблица 42

«ВАЛЕНТНОСТЬ», ВЫЧИСЛЕННАЯ ДЛЯ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВЫХ АНТИГЕНОВ

Антиген	Приблизительный молекулярный вес $\times 10^{-3}$ [a]	«Валентность»
Яичный альбумин	43—44	5
Сывороточный альбумин . .	70	6
Дифтерийный токсин . . .	70	8
Тироглобулин	650	40
Гемоцианин моллюска *Busycon*	6500	74
Гемоцианин живородящих	6500	231

[a] См. т. II, гл. II.

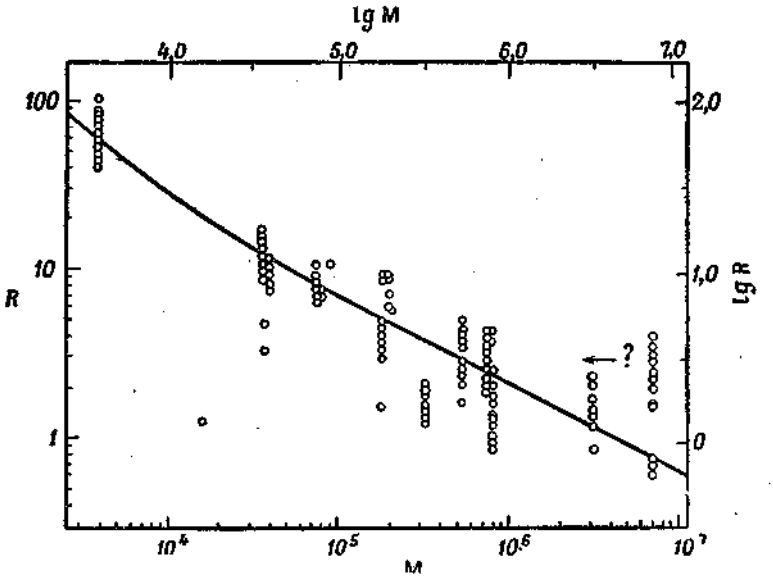
Из данных таблицы следует, что в первом приближении наблюдается известная зависимость между молекулярным весом и «валентностью» антигена. Действительно, если принять, что антитело имеет молекулярный вес порядка 160 000 и присоединяется к поверхности антигена, «располагаясь по его краю», то в том случае, когда антитело и антиген соединяются в эквивалентных соотношениях (см. ниже), можно показать, что соотношение между молекулярным весом (M) антигена и весовым отношением (R) антитела к антигену в таких соединениях «эквивалентной точки» выражается уравнением [103]

$$R = 37800\ M^{-0,8} + 179\ M^{-0,35}.$$

Это уравнение довольно хорошо согласуется с опытными данными (рис. 48).

Очевидно, что величины, приведенные в табл. 42, представляют собой только минимальные значения «валентности» антигенов, так как в точке, для которой поверхность антигена полностью покрыта и где приблизительно оправдывается приведенное уравнение, возможно существование еще не использованных связующих участков. Это подтверждается тем, что при добавлении дополнительных количеств антитела специфически связывается большее его количество и получаются соединения с более высоким содержанием антитела. Даже в том случае, когда связывается максимальное число молекул антитела, могут оставаться некоторые неиспользованные связующие центры, но антитело не может реагировать с ними из-за стерических препятствий, создаваемых уже связанными молекулами антитела. В противном случае это указывало бы на

довольно необычное расположение антигенных детерминантов на поверхности молекулы антигена. Они должны были бы располагаться на таких расстояниях, чтобы каждый из них был доступным молекуле антитела, и в этом случае поверхность была бы полностью покрыта молекулами антитела, «расположенными вертикально к ней», на что указывают аналитические данные. Более вероятно,



Р и с. 48. Соотношение между молекулярным весом (M) антигена и весовым соотношением (R) антитела к антигену в осадках, полученных в эквивалентной точке, рассчитанное из геометрических соображений.

○ экспериментальные данные.

что все же существуют некоторые незанятые центры и что при определении числа антигенных детерминантов, основанном на анализе осадков, получаются минимальные значения.

Г. Специфичность нативных белков

Наши представления о химической природе антигенных детерминантов нативных белков являются результатом выводов и экстраполирования из результатов описанных выше опытов. В целом они хорошо согласуются с известными фактами. Прежде чем перейти к обсуждению специфичности нативных белков, следует дать определение двух терминов, часто применяемых в этой связи: «функциональная специфичность» и «видовая специфичность».

1) ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Отдельные белки тела, адаптированные к различным физиологическим и химическим функциям, естественно, имеют различное химическое строение. Они могут различаться по относительному содержанию различных аминокислот или порядком расположения этих аминокислот в полипептидной цепи. Неудивительно поэтому, что они различаются и иммунологически. Антитела, образующиеся при инъекции этих белков животным различных видов, легко «различают» гемоглобин и сывороточный альбумин. Кроме того, сывороточные альбумины родственных видов, выполняющие, по-видимому, в основном одну и ту же функцию, химически близки между собой. В период второй мировой войны возникла идея использовать в качестве заменителя крови вместо сывороточного альбумина человека бычий сывороточный альбумин. Были проведены инъекции более ста добровольцам, прежде чем произошел первый несчастный случай. Позднее бычий сывороточный альбумин был введен двум обезьянам (*Macacus mullatus*) и не показал никакой реакции, хотя обезьяны находились под наблюдением в течение длительного времени [104]. По-видимому, сывороточные альбумины различных млекопитающих имеют сходные антигенные свойства, но они не полностью идентичны в этом отношении.

2) ВИДОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Даже в том случае, когда белки, насколько это известно, выполняют одну и ту же функцию у различных видов животных, они могут несколько различаться по антигенным свойствам. Данную функцию может выполнять не одна химическая структура, а, по-видимому, большое число близких, но все же различающихся структур. Каждый вид имеет свою собственную специфику белкового синтеза, и эта специфика почти никогда точно не воспроизводится. Если виды расходятся в процессе эволюции, то при этом развиваются и химические и морфологические различия.

Классические исследования видовой специфичности принадлежат Натталу [105], который изучал реакции антисыворотки кролика с сывороточными белками различных животных. Он нашел, что интенсивность перекрестных реакций изменяется параллельно таксономическому родству между видами. Если количество специфического осадка, полученного при смешении антисыворотки человека с испытуемым образцом сыворотки человека, принять за 100%, то количество осадка, полученного с сывороткой гориллы в качестве испытуемого антигена, составит 64%, а с сывороткой собаки—только 3% (табл. 43). Полученные результаты в некоторой степени зависят от индивидуальности применяемой сыворотки (практически все сыворотки брали от кроликов), но порядок величин более или менее сохраняется.

Таблица 43

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ КОЛИЧЕСТВА ОСАДКА, ПОЛУЧЕННОГО С ТРЕМЯ РАЗЛИЧНЫМИ АНТИСЫВОРОТКА ЧЕЛОВЕКА (КРОЛИКА) И РАВНЫМИ КОЛИЧЕСТВАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ [105]

Виды	Номер иммунной сыворотки[а]		
	1	2	3
Человек	100	100	100
Шимпанзе	—	—	130[б]
Горилла	—	—	64
Орангутанг	47	80	42
Cynocephalus mormon	30	50	42
Cercopithecus petaurista	30	50	—
Ateles vellerosus	22	25	—
Кошка *(Felix domesticus)*	11	—	3
Собака *(Canis familiaris)*	11	—	3

[а] Количество осадка, полученное с кровью человека, условно принято за 100.

[б] Рыхлый осадок.

Рейхерт и Браун [106] при изучении кристаллографии гемоглобинов установили различия в кристаллических формах для всех изученных ими гемоглобинов, хотя, как и следовало ожидать, гемоглобин мула был кристаллографически подобен гемоглобину лошади и осла. Гейдельбергер и Ландштейнер [107] установили, что антитела против гемоглобинов лошади, осла и мула обнаруживают точно такие же различия и сходство. По-видимому, кристаллографические и серологические свойства почти одинаково хорошо отражают химические различия между молекулами этих белков.

В настоящее время известно не менее пяти видов гемоглобина человека [108] с различными электрофоретическими подвижностями, а иногда и различной растворимостью. Гемоглобин эмбрионов (гемоглобин F) отличается от гемоглобина взрослых [109]. У людей, страдающих серповидной анемией—этой редкой болезнью, которая распространена только в Африке и в отдельных областях Индии,— наблюдается образование так называемого гемоглобина S. Другой аномальный гемоглобин, названный ранее гемоглобином III, а теперь гемоглобином С, по-видимому, является результатом действия доминантного гена [110]. Имеется сообщение еще об одном типе гемоглобина, который не связан с каким-либо заболеванием [111].

3) ТОКСИНЫ

Антигенные яды, называемые токсинами, рассмотрены отдельно в гл. IX. Наряду с токсическими веществами, выделяемыми бактериями, и животными ядами, подобными яду змеи, скорпиона и паука, изучались иммунологически и растительные токсины, такие, как рицин из бобов клещевины (*Recinus communis*) и абрин из семян индийского лакричника (*Abrus precatorius*).

Слотта и Фрэнкель-Конрат [112] получили животный токсин гремучей змеи (*Crotalus tirrificus*) в кристаллическом состоянии. Выделенный белок представлял собой гомогенный продукт с молекулярным весом около 30 000 [113]. Токсичность и гемолитическое действие *in vitro*, вероятно, зависят от лецитиназной активности молекулы. Яд кобры очищали таким же образом, как и токсин гремучей змеи.

Иммунологическое поведение токсинов существенно не отличается от поведения других белковых антигенов. При инъекции их для образования антител следует вначале вводить малые дозы во избежание гибели экспериментальных животных, но в других отношениях иммунология токсинов не имеет характерных особенностей. Нейтрализация токсинов антитоксинами рассматривается ниже (стр. 536).

Неизвестны токсины, в которых токсические свойства определялись бы отдельной простетической группой. Токсичность, очевидно, является общим свойством молекулы, зависящим, по-видимому, от специфического расположения аминокислот. Интересно, что это расположение в случае дифтерийного и некоторых других токсинов может быть нарушено при действии формальдегида или кетена, причем антигенные свойства и способность молекул к связыванию антител остаются без изменения.

3. АНТИТЕЛА

Млекопитающие (а возможно, и другие организмы) продуцируют модифицированные γ-глобулины в ответ на инвазию бактерий и часто на искусственную иммунизацию. Эти γ-глобулины обладают способностью прочно и специфически соединяться с антигенами, вызывающими их образование.

Антитела определяют по их специфической реакции с антигенами. Природа реакции может быть одной и той же во всех случаях, но результаты взаимодействия, как это можно наблюдать в пробирках, часто различны. Антитела при реакции со своими антигенами могут действовать следующим образом: а) осаждать их (в том случае, если антигены представляют собой растворимый белок или углевод); б) агглютинировать их (в случае микроорганизмов или других специальных антигенов); в) вызывать «связывание» комплемента

(практически в случае любого соединения антитело-антиген); г) сенсибилизировать их к литическому воздействию комплемента; д) покрывать связующие участки антигенов таким образом, чтобы предотвратить предполагаемое действие другого антитела с такой же специфичностью (блокирующие антитела); е) вызвать образование системы, способной агглютинироваться или осаждаться антителом против этого антитела.

А. Множественность функций антител

Различные названия антител—преципитины, агглютинины, лизины, амбоцепторы и т. д., которые встречаются в литературе по иммунологическим вопросам,—еще не свидетельствуют о том, что эти антитела обязательно отличаются друг от друга. Вначале то или иное название давалось в соответствии с предполагаемой причиной каждого серологического явления, но позднее было установлено, что одна и та же молекула антитела может выполнять все или большинство этих различных функций. Например, Гейдельбергер и Кебет [114] нашли, что действующее количество антитела в антипневмококковой сыворотке типа I под названием преципитина в одном и агглютинина в другом случаях представляет собой одно и то же вещество. Дерр и Расс [115] показали, что анафилактическое сенсибилизирующее действие антисыворотки количественно соответствует содержанию преципитина, а Чоу, Ли и Ву [116] установили, что иммунологически чистый преципитин, который защищает мышь от пневмококков типа I, вызывает анафилактическую сенсибилизацию или связывает комплемент.

Было показано, что один и тот же гомогенный антиген может вызвать образование нескольких антител, и, по-видимому, в действительности это обычно и происходит [117—123]. Однако каждое из этих антител может, как правило, выполнять все перечисленные ниже функции. Имеются все же некоторые основания полагать, что отдельные виды антител, например агглютинины и лизины, при некоторых обстоятельствах могут хотя бы частично различаться между собой.

1) ОСАЖДАЮЩИЕ АНТИТЕЛА (ПРЕЦИПИТИНЫ)

Смешение некоторых антител с антигенами приводит к образованию осадка. Анализ таких осадков показывает, что они представляют собой определенные молекулярные соединения антитела и антигена. Такие антитела получили название преципитинов. Углеводы и белковые антигены в равной степени могут осаждаться соответствующими антителами. Природа протекающих при этом химических реакций рассматривается ниже (стр. 531).

2) АГГЛЮТИНИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА (АГГЛЮТИНИНЫ)

Антитела против патологических микроорганизмов (а также против безвредных посторонних клеток, таких, как эритроциты) часто вызывают образование агрегатов из частиц, с которыми они реагируют. Это явление получило название агглютинации. Нет особых оснований предполагать, что агглютинация существенно отличается от преципитации. По-видимому, один из реагентов, бактерии или эритроциты, состоит из относительно больших частиц и соединение подобных частиц и приводит к наблюдаемому явлению.

3) НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА

Антитела против токсинов (антитоксины) нейтрализуют токсическое действие при смешении их с токсинами в соответствующих пропорциях. Это можно показать путем инъекции смесей чувствительным животным. Нейтрализацию литических антител можно показать при помощи пробы со смесью лизин—антилизин по отношению к чувствительным клеткам в присутствии комплемента.

Токсины химически не изменяются при соединении с антитоксинами, что доказывается разложением антитоксина и регенерацией токсина [124—126]. Функция антитоксина сводится, вероятно, только к тому, что он покрывает поверхность молекулы токсина и тем самым не позволяет его токсическим группам соединяться с чувствительной тканью. Было высказано предположение [127], что антитела, нейтрализующие вирусы, препятствуют внедрению вируса в чувствительную клетку.

Некоторые ферменты сильно ингибируются антителами, специфически направленными против них [128, 129]. Кребс и Неджер [129] полагают, что в некоторых из таких случаев одной из точек присоединения антитела к антигену является «активный центр» фермента. Другие ферменты сохраняют 70—90% активности при соединении с антителом даже в том случае, когда происходит осаждение фермента антителом [130].

В случае таких ферментов, как уреаза, это не вызывает сомнений, поскольку молекулы субстрата достаточно малы, чтобы войти в промежутки между молекулами фермента и антифермента и таким образом прийти в соприкосновение с ферментативно активными группами.

4) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КОМПЛЕМЕНТЫ

При взаимодействии антител с их антигенами группа белков, получившая общее название комплемента (см. стр. 554), обычно связывается с комплексом. В случае реакций осаждения это не приводит к видимому эффекту, и только в 1940 г. Гейдельбергеру с сотрудниками [131] удалось измерить по содержанию азота относи-

тельно малое количество реагирующего белка. Для литических антител (т. е. антител, которые вызывают разрушение и частичное растворение клеток, против которых они направлены) присутствие комплемента играет существенную роль. Лизис эритроцитов так называемым гемолизином фактически вызывается не гемолитическими антителами, а комплементом, который связывается с клеткой вследствие того, что она была связана с антителом. Большинство систем антитело—антиген соединяются с комплементом («связывают комплемент» по терминологии иммунологов), но наблюдаются и некоторые исключения [132]. При наличии клеток, чувствительных к лизису, связывание комплемента обычно завершает образование системы и происходит лизис.

5) БЛОКИРУЮЩИЕ АНТИТЕЛА

Известны антитела, которые специфически соединяются со своим антителом, не вызывая видимого эффекта [133]. В большинстве изученных примеров это—антитела против эритроцитов человека или других млекопитающих [134—136]. В некоторых случаях добавление концентрированного (15—20%) сывороточного альбумина вызывает агглютинацию клеток, которые связываются с этим антителом (это относится к сывороточному альбумину человека, а также быка и, вероятно, других животных). В других случаях факт связывания антитела можно установить только по ингибированию агглютинирующего действия другого антитела с той же специфичностью. В таких случаях говорят, что первое антитело «блокирует» действие второго. Процесс сводится к тому, что блокирующее антитело, соединяясь с рецепторами («активные центры») на поверхности клетки, предотвращает связывание второго антитела, которое при соединении с этими рецепторами вызывает агглютинацию. Создается впечатление, что блокирующее антитело при взаимодействии с рецептором вызывает большее понижение свободной энергии, чем в случае взаимодействия с агглютинирующим антителом. Блокирующие антитела имеют довольно большое значение при изучении Rh-групп крови у человека.

Неясно, чем отличаются блокирующие антитела от агглютинирующих. Возможно, что их химические свойства (например, растворимость) таковы, что взаимодействие их с клеткой не вызывает агглютинации. Существует и другое предположение, что блокирующие антитела обладают только одной связующей группой по отношению к антигену (они «одновалентны») [137] и поэтому, будучи способны соединяться с частицей, они неспособны вызвать соединение частиц в агглютинат. Этот вопрос будет рассмотрен при обсуждении механизма серологических реакций (стр. 521), однако отметим, что это предположение кажется маловероятным.

Проба Кумбса. Ряд авторов, в частности Кумбс [138], показали, что если антитела связываются с клеткой, но не вызывают агглютинацию, то агглютинацию все же можно вызвать при добавлении антитела против этого антитела. При этом молекулы антитела могут соединяться между собой, в результате чего происходит соединение клеток, а следовательно, и их агглютинация. Возможно также, что просто наличие избытка молекул белка на поверхности клетки будет осаждать ее, или изменит ее поверхностный заряд, или вызовет иное изменение, обусловливающее агглютинацию (стр. 537). В пробе Кумбса антитело человека, не обладающее агглютинирующей способностью, добавляют к эритроцитам человека. Затем эритроциты отмывают до удаления неспецифических белков человека и к ним добавляют антитело кролика против γ-глобулина человека. Если реакция положительная, то эритроциты агглютинируют.

Возможно, что «антитела Кумбса» и блокирующие антитела существенно не различаются между собой и важную роль играет интервал концентраций, при которых проводятся опыты. Вполне вероятно, однако, что блокирующие антитела отличаются от агглютинирующих антител, так как было установлено, что блокирующие антитела более устойчивы к нагреванию [139] и высокому давлению [140] по сравнению с агглютинирующими антителами.

Хилл, Гебермен и Гуи [141] предложили термин «криптагглютиноиды», или «антитела третьего порядка», для антител, которые могут связываться антигеном, но не оказывают блокирующего действия и не вызывают агглютинации.

Было высказано предположение о существовании и других типов антител, но относящиеся к этому данные слишком противоречивы и нет необходимости подробно останавливаться на этом.

Следует отметить, что хотя антитело в определенном смысле противоположно его антигену, но антитело против данного антитела не идентично с исходным антигеном. Отличие антитела от «нормального» γ-глобулина невелико (см. табл. 44) и, очевидно, не может быть распознано по механизму образования антител для других видов. Так, например, если антитело вводить различным видам животных, то механизм образования антител «отмечает» только основные черты введенного белка, и в результате образуется простой анти-γ-глобулин, который сам по себе представляет γ-глобулин, характерный для второго вида.

Число специфических связующих групп в молекуле антитела невелико, фактически не больше двух (см. стр. 531), и отличия этих групп от остатка молекулы глобулина могут быть такими, что их трудно установить при помощи механизма, формирующего антитела у другого животного. Неудивительно поэтому, что доказательства наличия таких антител неубедительны, хотя иногда предполагают, что антителá против антитéла до некоторой степени направлены против специфической связующей группы [142].

Серологические различия между антителом (антипневмококки I и II) и нормальным глобулином были обнаружены Эриксоном и Нейратом [143]; эти авторы пришли к выводу, что антитело и нормальный глобулин отличаются химическими свойствами. Они установили, однако, что «эти группы белка, определяющие активность антитела, не характерны для структуры антигена».

6) АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА (РЕАГИНЫ)

При аллергических состояниях антитела часто можно обнаружить в крови больного. Поведение этих антител отличается в некоторых отношениях от поведения обычных антител, и ряд авторов применяет к ним необычный термин «аллергические антитела» [144]. Они не осаждают и не нейтрализуют антиген (хотя среди них можно найти и нейтрализующие антитела). Антитела обнаруживаются вследствие своей способности пассивно сенсибилизировать человеческую кожу.

До сих пор неизвестно, в какой степени химические и физические свойства аллергических антител отличаются от свойств обычных антител. Возможно, что единственным различием является присутствие аллергических антител в очень малых количествах, слишком малых, чтобы их можно было обнаружить обычными методами осаждения или нейтрализации. Кебет и Лендоу [145] показали, что количество антитела, содержащее 0,01 μg азота, достаточно для повышения чувствительности участка кожи, применяемого в обычных тестах. Наиболее чувствительным тестом—фиксацией комплемента—можно обнаружить количество антитела, в 20 раз превышающее указанное количество; пробы на агглютинацию и осаждение еще менее чувствительны. Это утверждение, однако, принимают не все иммунологи.

Кунс и Паппенгеймер [146] установили, что сильнодействующая антитоксическая сыворотка человека может быть двух основных типов. У лиц с приобретенной или наследственной аллергией, а иногда и у тех и других можно было обнаружить антитела, вызывающие сенсибилизацию кожи, которые остаются на инъецированном участке кожи в течение многих недель. Это антитело не осаждается своим антигеном и слабо связывает комплемент. Нагревание его до 56° в течение 4 час. приводит к нарушению сенсибилизирующего действия на кожу. У других лиц был найден иной тип антитела, не сенсибилизирующего, но преципитирующего типа.

Воен и Кебет [147] не согласны с тем, что антитело, сенсибилизирующее кожу в таких опытах, непременно относится к «неполному», или непреципитирующему, типу. В своих опытах по изучению способности антиовальбумина кролика сенсибилизировать кожу человека они установили, что способность антисыворотки к сенсибилизации совершенно не связана с присутствием анти-

овальбумина и, по-видимому, зависит от наличия одного, а возможно, и двух антител (преципитирующего типа), направленных против примесей в кристаллическом овальбумине. Эти примеси не являются кональбумином, овомукоидом или лизоцимом.

При некоторых аллергических состояниях, например при аллергии к лекарству, не удалось обнаружить с достаточной достоверностью каких-либо антител.

7) ОПСОНИНЫ

Установлено [148], что разрушение бактерий фагоцитами значительно усиливается, если к лейкоцитам добавить иммунную сыворотку. Термин «опсонины» относится к гипотетическим веществам, которые делают бактерии более доступными действию лейкоцитов. Было высказано предположение, что опсонины состоят из двух частей: одной термостабильной и другой термолабильной при 56°. Термостабильная часть, по-видимому, представляет собой обычное антитело, а термолабильная—какую-то часть комплемента, хотя между ними наблюдается некоторое различие [149—151].

8) ПРИРОДНЫЕ АНТИТЕЛА И ЛЕКТИНЫ

Вещества, реагирующие с данным инфекционным агентом или с химическими веществами, полученными из него, иногда встречаются в крови животного, которое, насколько это известно, не было ни иммунизировано, ни инфицировано этим специфическим агентом. Так, вещества, действующие на эритроциты других видов или даже других индивидуумов того же вида, встречаются довольно часто. Наиболее известными примерами являются изоагглютинины групп крови человека. Все эти вещества по своему действию очень близки к антителам и получили общее название нормальных, или природных, антител.

Эти природные антитела, несомненно, делятся на два класса. К первому классу относятся антитела, появившиеся в результате слабой («субклинической») инфекции, которая не была замечена, но вызвала образование некоторого количества антитела. Для этого достаточно проникновения вещества, вызывающего незначительное заболевание. Другой причиной существования таких антител является проникновение микроорганизмов, которые антигенно близки к интересующим нас патогенным микроорганизмам, или наличие микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте. Очевидно, некоторые патогенные организмы могут находиться в желудочно-кишечном тракте, не вызывая заболевания [152].

Винер [153] предполагал, что изогемагглютинины у человека являются следствием иммунизации антигенами, родственными к веществам А и В, определяющим группы крови. Другие авторы [154,

155] высказали предположение, что агглютинины образуются в результате прямого воздействия генов групп крови, которыми обладает данный индивидуум.

Наряду с природными антителами явно иммунного происхождения, несомненно, существует и другой класс подобных веществ, которые развиваются без какого-либо антигенного стимула. Ландштейнер [31] предполагает, что большинство нормальных гемагглютининов и гемолизинов, действующих на кровь неродственных видов, относятся именно к этому классу. Это подтверждается некоторыми закономерностями при зоологическом распределении этих веществ. Например, некоторые растения [156—163], особенно бобовые, содержат белки, действующие специфически на эритроциты некоторых видов или индивидуумов. Бойд [162, 163] исследовал некоторые сорта лимской фасоли, которые дают белок, почти исключительно специфичный для антигена А, находящегося в группе II крови.

Возможно, что специфичность природных антител второго класса является случайной. Поверхность их может иметь один или несколько участков, на которых аминокислоты расположены таким образом, что образуют антидетерминант, соответствующий молекулярной конфигурации какого-нибудь антигена. Возможно, что здесь нет элементов определенного рельефа; это явление может быть лишь отражением того факта, что варианты расположения зарядов на данном участке белковой поверхности хотя и многочисленны, но не бесконечны и что некоторые варианты могут случайно повторяться. По крайней мере сейчас еще нельзя утверждать, что анти-А лимской фасоли образовалось в ответ на стимул, вызванный присутствием вещества А из группы II крови.

Вопрос о том, в какой степени вещество, образовавшееся в ответ на введенный антиген, может быть названо антителом, даже в том случае, если оно является белком и связывается специфически только с определенными антигенами, по-видимому, относится уже к области семантики. Может быть, удобнее обозначать эти вещества другим термином; автор данной главы предложил термин «лектин» от латинского слова *lectus* (причастие от глагола *legere*, означающего «выбирать, отбирать»).

Б. Химические свойства антител

1) АНТИТЕЛА КАК БЕЛКИ

Наиболее характерным для химии иммунных антител является то, что они представляют собой белки, относящиеся, за небольшими исключениями сомнительного характера, к сывороточным глобулинам. Большинство из них являются γ-глобулинами (см. ниже). Изменения (см. стр. 531), которые сообщают антителам их спо-

собность специфически соединяться с антигенами, какого бы характера они ни были, по-видимому, не оказывают влияния на химические свойства антител. Если, как полагает Паулинг [164], эти изменения сводятся только к развертыванию полипептидных цепей, оставляя неизменным порядок чередования аминокислотных остатков в цепи, то нет оснований ожидать заметного влияния их на химические свойства антител. Если же, как полагают Александер [165], Мад [166], Брейнл и Гауровитц [167], молекула антитела содержит участок, где аминокислоты расположены несколько иначе, то это еще не должно заметно сказываться на их химических свойствах, поскольку величина этих активных участков должна быть мала по сравнению с поверхностью всей молекулы глобулина (стр. 511); маловероятно (стр. 517), чтобы таких участков было больше двух-трех в каждой молекуле [35].

По своей чувствительности к большинству денатурирующих и деструктирующих агентов антитела не отличаются от других белков [35]. Они изменяют свою структуру при нагревании, и этому процессу соответствует большая теплота активации. Нагревание вызывает агрегацию белков иммунной сыворотки [168], так же как и действие высоких давлений (3000 —5000 *am*) [140]. Обработка спиртом при комнатной температуре вызывает быстрое разрушение антител, но при низких температурах их можно осаждать и фракционировать из водно-спиртовых смесей [169]. Обработка соединениями диазония, иодом, бромом, формальдегидом или кетеном обычно снижает или подавляет их специфическую активность.

Введение 3—5 атомов галоида в каждую молекулу антитела практически не меняет его активность, что позволяет для количественных исследований метить антитела радиоактивным иодом [170].

Предполагают, что антитела в основном более устойчивы к действию протеолитических ферментов [171—173]. Это свойство используется при очистке антител (см. стр. 524). Гауровитц [20] считает, что более высокая устойчивость антител к действию протеолитических ферментов указывает на то, что укладка их пептидных цепей создает более устойчивую конфигурацию, чем укладка цепей других сывороточных глобулинов.

2) АНАЛИЗЫ АНТИТЕЛ

Различные антитела анализировали на содержание общего азота, амидного азота, азота моно- и диаминогрупп и аминокислот. Таблица, суммирующая результаты, полученные до 1938 г., приведена в книге Меррека [35]. Найденные различия не выходят за пределы ошибок опыта, обусловленных тем, что разные авторы применяли различные препараты неодинаковой степени чистоты. Смит и Грин [174] нашли, что антитела содержат те же аминокислоты, что и нормальные сывороточные глобулины.

Таблица 44

СОСТАВ ИММУННЫХ БЕЛКОВ (ПО СМИТУ И ЕГЕРУ [175])

Данные выражены в граммах определяемого компонента на 100 *г* безводного белка. Значение для γ_2-глобулина быка представляет среднее для двух препаратов. Данные для иммунных лактоглобулинов быка—средние для двух препаратов, одни из которых получены из молока, а другие—из молозива.

Компонент	γ-Глобулин человека II-1	γ-Глобулин человека II-1,2	γ-Глобулин человека II-3	γ_2-Глобулин быка	Т-(γ_1)-глобулин быка	Иммунный эулактоглобулин быка	Иммунный псевдолактоглобулин быка	γ_2-Глобулин лошади	Т-(γ_1)-Глобулин лошади
Аргинин	4,8	5,1	3,7	5,8	4,8	4,9	3,5; 5,6[а]; 5,2[б]	3,8	2,8
Аспарагиновая кислота	8,8	—	—	—	—	—	9,4[а]; 9,3[б]		
Цистин(+цистеин)	3,1	2,6	2,7	2,9	2,8	3,2	3,0	2,6	2,5
Глутаминовая кислота	11,8	—	—	—	—	—	12,3[а]; 10,7[б]		
Глицин	4,2	—	—	—	—	—	—	—	—
Гистидин	2,50	2,01	1,91	2,05	2,01	1,89	2,1; 2,3[а]; 2,2[б]	2,44	2,43
Изолейцин	2,7	2,8	2,0	3,2	3,0	3,1	3,1	4,4	3,3
Лейцин	9,3	9,3	9,5	7,4	8,6	10,4	9,1; 8,5[а]; 8,3[б]	9,0	7,5
Лизин	8,1	7,2	6,3	6,7	6,4	6,3	7,2; 6,1[а]; 6,1[б]	8,6	6,7
Метионин	1,06	1,12	0,87	1,18	1,00	0,98	1,08; 1,3[а]; 1,1[б]	0,95	0,72
Фенилаланин	4,6	4,5	4,7	3,2	4,5	3,6	3,8; 3,9[а]; 4,3[б]	4,4	4,1
Пролин	8,1	—	—	—	—	—	10,0[а]		
Серин	11,4	—	—	—	—	—	—	—	—
Треонин	8,4	8,8	7,4	10,0	9,5	10,5	10,1; 9,0[а]; 10,2[б]	11,1	8,7
Триптофан	2,86	2,6	2,8	2,6	2,6	2,4	2,7; 3,2[а]	2,7	2,8
Тирозин	6,75	—	—	—	—	—	6,7[а]	6,8[в]	6,8[в]
Валин	9,7	9,7	9,7	10,0	9,5	10,4	9,4; 8,7[а]; 9,3[б]	10,1	10,4
Гексоза	—	2,3	2,3	2,1	2,5	2,9	2,8	2,5	2,6
Гексозамин	—	1,27	1,23	1,31	1,50	1,45	1,32	1,18	1,53

[а] По данным Хансена с сотрудниками [332].
[б] По данным Гендерсона и Снелла [333].
[в] По данным Смита и Егера [175].

Результаты изучения аминокислотного состава антител приведены в табл. 44 [175].

3) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС АНТИТЕЛ

Антитела, продуцированные кроликами (и, вероятно, также антитела человека), имеют, по-видимому, молекулярный вес около 160 000, а в некоторых случаях и несколько выше [176—179]. Для антипневмококкового антитела человека найдена константа седиментации, равная 7,4, и рассчитан молекулярный вес—195 000 [176]. Дэвис с сотрудниками [180] нашел, что антитело Вассерманна (сифилитический реагин) человека, полученное при диссоциации осадка антитело—антиген, состоит из двух компонентов с константами седиментации 7 и 19 соответственно.

Антидифтерийный токсин лошади имеет константу седиментации около 7 и молекулярный вес примерно 160 000 [181]. Антипневмококковое антитело лошади, однако, обладает константой седиментации 18, и молекулярный вес его равен приблизительно 1 000 000 [182]. Это одна из характерных особенностей антипневмококковой сыворотки лошади, хотя небольшие количества глобулина с таким высоким молекулярным весом встречаются и в нормальных сыворотках лошади, быка и, вероятно, даже человека. Различие этих двух видов антител у лошади объясняется различными способами инъекции, применяемыми при иммунизации [183]. Белковые антигены, например токсины, обычно вводят подкожно, бактерии же, такие, как пневмококки, как правило,—внутривенно.

У кролика, независимо от способа инъекции, редко образуются большие антитела [184]. Однако Пайк [185] нашел, что скорость седиментации в ультрацентрифуге антиовечьего гемолизина кролика соответствует молекулярному весу 420 000 при условии сферической формы молекулы. Но поскольку молекула, по-видимому, не имеет сферической формы, ее истинный молекулярный вес должен быть еще больше. Пайк предполагает, что этот лизин отличается от белков сыворотки кролика и в других отношениях. Результаты определений молекулярного веса некоторых антител ультрацентрифугированием приведены в табл. 45 [28, 186].

Филитти-Вюрмсер, Обель-Лезюр и Вюрмзер [187] определили константы седиментации для агглютинина анти-В (β), который находится в сыворотке людей группы О и группы А. Наблюдается значительная разница для сыворотки анти-В у лиц генотипов A_1O, A_1A_1 и ОО. Для этих трех типов сывороток анти-В получены константы седиментации s_{20}, равные 15,5, 11 и 6,5 соответственно. Из этих данных авторы рассчитали молекулярные веса, которые оказались равными 500 000 для анти-В генотипа A_1O, 300 000 для анти-В генотипа A_1A_1 и 170 000 для анти-В генотипа ОО.

Таблица 45

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЕСА И КОЭФФИЦИЕНТЫ ДИССИММЕТРИИ ДЛЯ МОЛЕКУЛ АНТИТЕЛ [334]

Расчет молекулярных весов по этим данным требует знания парциальных удельных обьемов белков. Парциальные удельные объемы многих белков равны приблизительно 0,75 *см*³/*г*. Для антипневмококкового антитела лошади эта величина равна 0,715, для сывороточного γ-глобулина человека—0,739 [352].

Источник антитела	Антиген	Содержание белка в растворе (подвергнутого ультрацентрифугированию), %	Константа седиментации s_{20}, единицы Сведберга	Константа диффузии $D_{20} \times 10^7$, *см*²/*сек*	Молекулярный вес × 10⁻³	Коэффициент диссимметрии f/f_0	Размеры, Å₂,г
Лошадь	Пневмококк[а] [335—337]	0,22	19,3	1,80	920	2,0	946×47
»	Дифтерийный антитоксин[б] [338]	—	7,2	3,90	184	1,4	286×39
»	Антитоксин[в] [339] . . .	—	5,7	5,0	113	1,3	204×36
»	Антитоксин[д] [340, 341]	—	5,5	5,7	90	1,23	166×35
Корова	Пневмококк [336, 337]	0,64	18,1	1,69	910	2,0	—
Свинья	Пневмококк [336, 337]	0,58	18,0	1,64	930	2,0	—
Кролик	Пневмококк[а] [335—337]	0,19	7,0	4,23	157	1,4	272×37
»	Яичный альбумин [335—337]	0,53	6,5	3,75	165	1,6	244×24
»	Эритроциты овцы [342]	—	18,9	—	—	—	—
Обезьяна	Пневмококк[а] [336, 337]	0,31	6,7	4,08	157	1,5	312×34
Человек	Пневмококк[а] [336] . . .	0,39	7,4	3,60	195	1,5	338×37
»	Изоагглютинин [344] . .	—	19,8	—	—	—	—
»	Сифилитический Вассермана [343]	0,2	18,5—19,1 6,5—7,0	—	—	—	—

[а] Антитело получено при диссоциации специфических преципитатов (солью).
[б] Водорастворимая фракция.
[в] Водорастворимая фракция после обработки пепсином.
[г] Рассчитано для модели вытянутого безводного эллипсоида вращения.
[д] Кристаллический препарат, полученный в результате обработки трипсином осадков токсин—антитоксин.

4) ФОРМА МОЛЕКУЛ АНТИТЕЛ

Молекулы исследованных антител имели асимметричную форму. У молекулы антитела кролика короткая ось имеет длину 37 Å, длинная ось 274 Å, отношение осей 7,5 [188]; соответствующие значения для антипневмококкового антитела человека составляли 37, 338 и 9,2Å. Однако при этих расчетах не учитывалась гидратация, а также предполагалось, что молекулы имеют форму вытянутого эллипсоида вращения; поэтому были получены максимальные значения коэффициента асимметрии (Нейрат, частное сообщение). Для антитоксина лошади вычисленное отношение осей равно 7,0 [178]. Для антипневмококкового антитела лошади, по расчетам Нейрата [188], длины осей равны 47 и 950 Å, а отношение осей—20. Таким образом, молекула антипневмококкового антитела лошади почти втрое длиннее молекулы антитоксина. Мелкил [74] получил электрономикрофотографии осадка, образующегося при взаимодействии вируса мозаики табака со специфическим антителом (кролик), и установил, что молекулы вируса, отчетливо видные в микроскопе, были разделены на определенные равные участки длиной около 270 Å, соответствующие длине молекулы антитела.

Кэмпбелл и Балмен [28] рассчитали по уравнению Перрена отношение осей для различных антител. Результаты приведены в табл. 45.

5) ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ТОЧКИ АНТИТЕЛ

Антитела кролика имеют изоэлектрическую точку, по-видимому близкую к изоэлектрической точке нормального γ-глобулина кролика, т. е. около 6,6 [189, 190]. Антипневмококковое антитело лошади, наоборот, отличается от нормального глобулина лошади и имеет изоэлектрическую точку около 4,8 [190—192] вместо 5,7 [190] для нормального глобулина.

6) ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ПОДВИЖНОСТЬ

Электрофоретические подвижности молекул антител соответствуют их изоэлектрическим точкам. В большинстве случаев измерения проводили при следующих условиях:—$1{,}0 \cdot 10^{-5}$ *см*^{2}/*сек*·*в*, pH ~ 8,0, ионная сила 0,15. После длительной иммунизации, особенно лошадей, часто появляется быстро движущийся компонент (Т) с подвижностью между $-1{,}0 \cdot 10^{-5}$ и $-2{,}0 \cdot 10^{-5}$. Подробное обсуждение электрофоретических свойств нормальной и иммунной сывороток можно найти у Вильямса [172]. Антитела обычно перемещаются вместе с другими γ-глобулинами, но в антибелковой сыворотке лошади (такой, как, например, антитоксин) часть антител движется вместе с β-глобулинами [192—195]. Зейберт и Нельсон [196] нашли в сыворотке кролика антитело против туберкулина, который

движется вместе с α-глобулинами. Однако присутствие этих веществ при критическом рассмотрении [186] кажется маловероятным. Дэвис с сотрудниками [180] нашел, что антитело Вассерманна (сифилитический реагин) имеет подвижность, среднюю между подвижностями β- и γ-глобулинов.

При иммунизации лошадей путем подкожной инъекции некоторых токсоидов, сывороточного альбумина кролика, яичного альбумина или гемоцианина [197] полученные антитела находятся главным образом в глобулиновой фракции, осаждаемой сульфатом аммония при 33—50% насыщения. При электрофоретическом исследовании подобной иммунной сыворотки часто наблюдается увеличение Т-, или γ_1-глобулиновой фракции. Такие антитела отличаются от антител кролика и от антител лошади, полученных путем повторной внутривенной инъекции бактерий, нуклеопротеида пневмококков, полисахарида бактерий и глобулина кролика [197—200], в том отношении, что при смешении со своими антигенами они дают очень узкую зону преципитации. Преципитация в подобных случаях ингибируется избытком антитела или антигена. Бойд [200] предложил называть такие антисыворотки типом Н в противоположность обычному типу R.

Данные измерения электрофоретических подвижностей различных антител приведены в табл. 46.

Таблица 46

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДВИЖНОСТИ КОМПОНЕНТОВ СЫВОРОТКИ, ПОЛУЧЕННОЙ ОТ РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ [192, 193]

Вид	Антитела против	$AN/\Sigma N^{Д}$, %	μ·10б, *см²/сек·в*				
			Al	α	β	Т	γ
Лошадь	Пневмококков (типов I, II, V, VII, VIII, XXIII)	20—30	5,1	3,6	2,9	—	0,9
Лошадь[а]	[г]	0	5,7	3,8	3,1	—	1,0
Свинья[а]	Пневмококков (типа I)	1,6	5,7	3,5	2,7	—	1,1
Кролик[а]	Яичного альбумина	36,4	6,0	3,6	2,9	—	1,1
Обезьяна[а]	Пневмококков (типа III)	6,6	5,2	4,3	3,0	—	0,7
Лошадь[б]	Дифтерийного токсина	18,9	—	4,9	—	2,6	—
Лошадь[в]	» »	—	—	4	—	—	—

[а] Определяли при pH 7,72±0,02 в буфере, содержащем 0,15 *М* NaCl и 0,02 *М* PO_4^{3-}; температура 0,5°.

[б] Определяли при pH 7,35 и ионной силе 0,1.

[в] При pH 7,3

[г] Нормальная сыворотка лошади: α,β,γ—фракции глобулина, А—антитело, Al—альбумин, Т—компонент (специфический) антитела в антибелковой сыворотке лошади.

[д] Отношение азота антитела к общему азоту в %.

По-видимому, по своим свойствам антидифтерийный токсин лошади аналогичен $\beta(\beta_2)$- или γ-глобулину. Эти два типа антитоксина обнаруживают определенное различие в серологическом отношении. Чистый β-антитоксин осаждается токсином медленнее, чем γ-антитело, и имеет меньшее отношение L/L_f (это отношение является приблизительной мерой эффективности токсина *in vivo*). Осадок, образующийся в наиболее быстро осаждающейся смеси антитела и токсина, содержит только половину антитела (измеренного биологическим методом) в случае применения β_2-антитоксина по сравнению с тем случаем, когда применяется γ-антитоксин [194, 195].

7) ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНТИТЕЛ К ФЕРМЕНТАМ

Некоторые антитела более устойчивы к действию отдельных ферментов, например к пепсину, по сравнению с нормальными сывороточными белками [98]. В результате обработки пепсином дифтерийной сыворотки, содержащей антитоксин, до тех пор пока 70—80% белка не перестанет коагулировать при нагревании, получают продукт со значительно большим содержанием иммунологически активного белка [171]. Однако аналогичная обработка антипневмококковой сыворотки лошади практически полностью разрушает ее защитную способность для мышей, хотя при этом сохраняется в значительной степени ее преципитирующее действие [193]. Переваренное пепсином антипневмококковое антитело (типов I и II) соединяется с удвоенным количеством специфического полисахарида (при расчете на 1 *мг* азота антитела) по сравнению с необработанным белком [201]. Петерман и Паппенгеймер [201] нашли, что независимо от молекулярного веса антитела в исходном материале константа седиментации продукта после обработки пепсином равна 5,2, что соответствует конечному молекулярному весу меньше 100 000. В более поздней работе Вильямс, Болдуин, Саундерс и Сквайр [202] установили, что γ-глобулины, обработанные пепсином, являются значительно более гетерогенными, чем исходные белки. Они намеренно не приводят значений среднего молекулярного веса этого продукта. Практически в нем сохранилась полная активность антитела (*in vitro*), откуда следует, что обработка ферментом разрушает преимущественно иммунологически неактивные участки молекулы. Подобные выводы вытекают также из работы Нортропа [203], который обрабатывал пепсином осадок дифтерийного токсина с антитоксином и получил полноценный активный антитоксин, молекулярный вес которого вдвое меньше молекулярного веса исходного антитоксина. Выделенное вещество было способно кристаллизоваться. Препарат Нортропа представляет собой единственное антитело, полученное в кристаллическом виде, и его способность к кристаллизации является отчасти результатом обработки ферментом. Трудность кристаллизации большинства антител

может быть следствием их слишком большой неоднородности (стр. 522). Нортроп и Гэбель [204] при осаждении кислым фталатом натрия с последующим фракционированием сульфатом аммония получили препарат антипневмококкового антитела лошади, полностью осаждаемый полисахаридами гомологического типа I.

Одна фракция препарата этого антитела была выкристаллизована в виде плохо оформленных закругленных розеток, которые, однако, по составу не были чище, чем остальной белок. Выделение кристаллов сопровождалось образованием нерастворимого белка.

Сравнение этих различных по растворимости в солевых растворах или по иммунологическим реакциям фракций показывает, что иммунная антипневмококковая сыворотка лошади содержит много различных белков, которые способны осаждаться специфическими полисахаридами пневмококков, но обладают различным защитным действием для животного, дают различные реакции с антилошадиной сывороткой и показывают неодинаковую растворимость в растворах солей.

Другим методом определения гетерогенности антигенов или антител является метод диффузии в агар-агар, разработанный Оудином и Оухтерлони [205]. По этому методу антисыворотку добавляли к раствору агар-агара и оставляли в маленькой пробирке до образования студня. Затем на гель агар-агара наливали раствор антигена. Антиген, диффундируя в агар-агар, содержащий антитело, давал видимый осадок, граница которого со временем перемещалась. В случае гетерогенного антигена, а также при содержании в антисыворотке в агар-агаре различных антител образовывались две и более граничных зоны. Смит и Егер [175] показали, однако, что этим методом не удается определить небольшие количества примесей и что он имеет и некоторые другие ограничения.

Установлено, что разные антитела отличаются по устойчивости к нагреванию, действию кислот и щелочей [206, 207]. Бойд [140] нашел, что анти-Rh антитела человека «неполного» или «блокирующего» типа выдерживают давления на 1000 *am* больше, чем агглютинирующие антитела. Пока не выяснено, каким структурным элементам молекулы можно приписать эти различия.

8) ВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ АНТИТЕЛАМИ

Можно было ожидать, что антитела будут проявлять видовые различия, которые характеризуют нормальные белки плазмы различных изучаемых видов, и это действительно подтвердилось. Антитела против антител реагируют с нормальными глобулинами животного, от которого был получен исходный препарат антитела; антитела против нормального γ-глобулина осаждают антитела тех видов животных, от которых получен этот γ-глобулин. Кроме того, наблюдаются перекрестные реакции в той степени, как это предполагалось.

Антитела из различных видов животных могут иногда показывать характерные различия в своем поведении. Антитоксин лошади является более растворимым белком («псевдоглобулин») по сравнению с антитоксином кроликов. Антипневмококковые антитела лошади, коровы и свиньи представляют собой большие молекулы (молекулярный вес порядка 930 000), в то время как антитела человека, кролика и обезьяны имеют молекулярный вес, близкий к нормальным глобулинам—около 160 000 [184].

Гуднер и Хорсфолл [208] разделили антипневмококковые антитела различных видов на две группы по способности к фиксированию комплемента и по липидному составу. Они нашли, что гемолитический комплемент морской свинки фиксируется антителами кролика, крысы, морской свинки и овцы, но не фиксируется антителами человека, лошади, собаки, мыши, кошки и козы. Дингл с сотрудниками [209] наблюдал подобные же различия. Хорсфолл и Гуднер [132] нашли, что способность к связыванию и осаждению у антипневмококковой сыворотки лошади зависит от присутствия лецитина, в то время как для активности антипневмококковой сыворотки кролика необходим кефалин.

Были обнаружены также и другие видовые различия. Морская свинка дает небольшое количество преципитирующих антител [210], но иногда продуцирует антисыворотки, обладающие хорошими бактерицидными свойствами *in vivo*, хотя они неспособны вызывать осаждение или агглютинацию [209].

Различие в растворимости между антибелковыми антителами лошади и кролика сказывается на их поведении при осаждении [183, 200]. Этот вопрос будет обсужден ниже (стр. 541).

9) ВАЛЕНТНОСТЬ МОЛЕКУЛ АНТИТЕЛ

В данном случае под валентностью подразумевается число специфически связующих групп («антидетерминантов») на одну молекулу, направленных против данного антигена.

Вначале предполагалось, что антитела, естественно, являются поливалентными, и был предложен ряд теорий, основанных на предположении о «поливалентности» неспецифического характера [35, 211]. Однако такие теории (образования антител) не всегда позволяли легко объяснить, какова структура поливалентных молекул специфического антитела.

При рассмотрении этого вопроса наметились две основные точки зрения. Гейдельбергер и Кендалл [211] и Меррек [35] полагали, что антитело «поливалентно»; Гауровитц [212], а также Хукер и Бойд [213] (несмотря на то, что в 1934 г. они проводили расчеты, принимая антитело четырехвалентным [214]) нашли, что допущение о поливалентном антителе не объясняет ряд полученных ими данных. Исходя из принципа *entia non multiplicanda*, Хукер и Бойд [213]

выдвинули в качестве простейшей гипотезы представление об одновалентности антител. Этот вопрос был окончательно выяснен экспериментально за последние 20 лет, прошедшие с того времени, как начались дискуссии о валентности антитела. Было доказано, что представление о «поливалентности» является правильным, если под «поливалентностью» авторы этих гипотез понимали двухвалентность. В настоящее время можно считать экспериментально доказанным, что большинство антител двухвалентно.

Первым экспериментальным доказательством послужили работы Паппенгеймера, Ландгрена и Вильямса [181], которые исследовали продукты реакции антидифтерийного токсина лошади и дифтерийного токсина в ультрацентрифуге. Их результаты согласуются с представлением, что молекула антитоксина способна связывать две молекулы токсина и поэтому является двухвалентной.

Паулинг с сотрудниками [92] рассчитал валентность антител на основе анализа осадков, полученных с различными прицепитирующими гаптенами, и пришел к выводу, что антитело двухвалентно, но что вероятна примесь трехвалентных молекул (согласно теории Паулинга о реакциях между антителом и антигеном); однако Бойд и Бенке [93] отметили, что некоторые из этих гаптенов агрегируются в растворе и поэтому состоят в основном из поливалентных агрегатов, которые осаждаются подобно другим поливалентным молекулам, как например белковые антигены. Кебет [215] также указал на то обстоятельство, что Паулинг при проведении реакции не всегда выдерживал время, необходимое для достижения равновесия.

Эйзен и Каруш [100] строили график зависимости между обратными значениями числа молей одновалентного гаптена (*n*-(*n*-оксифенилазо)фениларсоновой кислоты) на моль антитела ($1/r$) и обратными значениями концентрации свободного гаптена ($1/c$), экстраполировали значения $1/c$ до нуля и получили значения $1/r$ порядка $0{,}5 \pm 10\%$, что указывает на валентность антитела, равную двум.

Меррек, Хох и Джонс [216] получили доказательство двухвалентности антитела на основании электрофоретических исследований соединений, образующихся при избытке антигена (кристаллические сывороточные альбумины лошади и быка) и антитела. Они полагают, что вторая валентность молекулы антитела слаба и усиливается только при избытке антитела в результате неспецифического притяжения, обусловленного тем, что полярные группы антитела находятся одна против другой и взаимно притягиваются, вместо того чтобы притягивать молекулы воды.

Плещиа, Бекер и Вильямс [217] определили количественное соотношение между антигеном и антителом в препаратах, полученных при растворении осадка сывороточного альбумина человека и его антитела (кролик) в избытке антигена, путем электрофоретического определения количества свободного антигена и расчета

отношения антиген : антитело по разности. Предельная величина по мере увеличения избытка антигена стремится приблизительно к 2 (2,04); для системы с бычьим альбумином получено более высокое значение (2,81), и нет уверенности, что верхний предел уже достигнут; однако авторы указывают на то, что трудности анализа при больших избытках антигена не позволяют получить достаточно точные результаты.

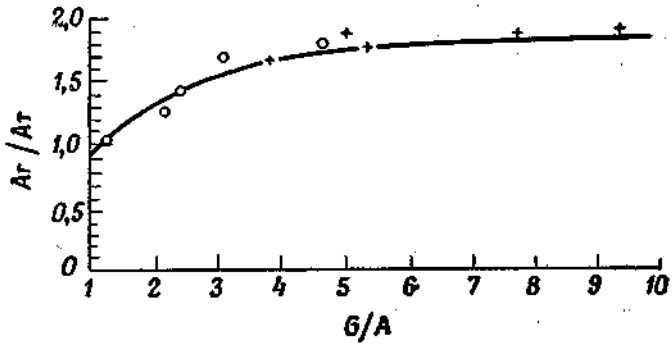


Рис. 49. Наблюдаемые молярные отношения антигена к антителу в области избытка антигена по сравнению с величинами, рассчитанными по уравнению Гольдберга и Вильямса [219].

○ ультрацентрифуга; +электрофорез;—— теоретическая кривая.

Зингер и Кэмпбелл [218] на основании электрофоретических исследований и опытов в ультрацентрифуге полагают, что растворимый комплекс антиген-антитело в системе слабоиодированный бычий сывороточный альбумин—антитело из антибычьей сыворотки кролика представляет собой в основном AG_2.

На рис. 49, взятом из работы Гольдберга и Вильямса [219], видна тенденция, обнаруженная различными исследованиями, к максимальной валентности, равной двум; эту величину можно считать уже твердо установленной, если не учитывать необычных случаев антител (таких, как антипневмококковое антитело лошади с большим молекулярным весом), указывающих на существование антител с более высокой валентностью.

В ряде случаев [131, 137, 220] были обнаружены антитела, обладающие способностью связываться с антигеном без образования осадка. Эти антитела по своему поведению близки к блокирующим антителам, находящимся в агглютинирующих системах. Такого рода антитела получили различные названия, например неполноценные, несовершенные и одновалентные. Некоторые авторы [131], применявшие термин «одновалентный», установили, что его следует

понимать не в буквальном смысле. Здесь могут иметь значение и другие факторы, такие, как различия в растворимости.

При изучении Rh-групп крови [136] были получены антитела, способные связываться с эритроцитами, но не вызывающие агглютинации.

В 1944 г. Даймонд [134] установил, что препарат концентрированного глобулина из анти-Rh сыворотки дает эффект презоны и неспособен инактивировать сыворотку, содержащую анти-Rh агглютинин более высокого титра. Позднее Рейс [135] и Винер [136] независимо друг от друга выяснили это явление и определили его природу. Сыворотка, которая может инактивировать другие анти-Rh сыворотки, содержит антитело, которое может связываться с Rh-положительными эритроцитами и предотвращать их агглютинацию анти-Rh сывороткой, блокируя, таким образом, реакцию обычной агглютинирующей сыворотки. Поэтому Винер назвал такие антитела «блокирующими» антителами. По терминологии Рейса, это «неполноценные» антитела.

Паппенгеймер [137] в 1940 г. обнаружил непреципитирующее антитело в сыворотке лошади, иммунизированной против кристаллического яичного альбумина. Полагая, что это антитело должно быть одновалентно, он назвал его «неполноценным» антителом. Он считал, что в этом случае образуется антитело, которое по каким-то причинам не могло развить свой собственный комплемент с двумя связующими группами. Гейдельбергер, Трефферс и Майер [131] применяли термин «неполноценное» антитело по тем же соображениям. Винер [5] опубликовал диаграммы, в которых «неполноценное» антитело представлено просто в виде половины «полноценной» двухвалентной молекулы.

Точное определение молекулярного веса «неполноценных» антител еще не произведено. Предварительные исследования автора показали, что молекулярный вес не только не меньше молекулярного веса нормального антитела, но даже несколько превышает его.

Если «неполноценное» антитело проявляет свои особые свойства, будучи одновалентным, то можно представить процесс, вызывающий полимеризацию молекул белка с превращением «неполноценного» антитела в «полноценное» агглютинирующее антитело. Известно, что при высоком давлении (4000 — 5000 *am*) происходит значительная полимеризация молекул сыворотки. Тем не менее Бойд [140] установил, что самое высокое давление вплоть до давлений, вызывающих полную инактивацию «неполноценного» антитела, не обеспечивает превращения «неполноценного» антитела в агглютинирующее антитело. Давление, необходимое для инактивации «неполноценного» антитела, приблизительно на 1000 *am* больше по сравнению с соответствующим давлением для агглютинирующего антитела.

Было установлено, что суспендирование эритроцитов в альбумине [6] или обработка трипсином [221] приводит к агглютинации их «неполноценными» антителами. Эти наблюдения делают менее вероятной гипотезу, что неспособность «неполноценных» антител вызывать агглютинацию связана с наличием только одной связующей группы на каждую молекулу.

В 1950 г. Рейс и Сангер [222] установили, что «неполноценное» анти-DRh антитело быстро и довольно сильно агглютинирует эритроциты человека, которые, по-видимому, имеют Rh-формулу —D—/—D—. Возможно, что с простыми типами антигенов «неполноценные» антитела могут вызывать агглютинацию. Паппенгеймер [223] считает, что «неспособность «блокирующего» антитела агглютинировать необработанные клетки не следует связывать с его одновалентностью» и что еще не доказано, что поведение непреципитирующих и неагглютинирующих антител можно правильно описать на основе представлений об их одновалентности.

Гольдберг и Вильямс [219] установили, что изучение систем антитело — антиген в ультрацентрифуге имеет то преимущество, что оно дает прямое доказательство присутствия ряда различных комплексов антиген-антитело в растворе, что не достигается при электрофорезе. Они полагают, что на данной стадии развития электрофоретические исследования дают бóльшую точность, особенно при большом избытке антигена. На основании изучения имеющихся в настоящее время экспериментальных данных они приходят к выводу, что максимальная валентность преципитирующего антитела равна двум (см. рис. 49, стр. 519).

Гитлин и Эдельхох [224] изучали реакцию между сывороточным альбумином быка и антителом лошади посредством измерения светорассеяния. Они нашли, что при смешении реагентов в зоне избытка антигена равновесие достигается быстрее, чем в зоне избытка антитела. Большие комплексы из растворимых агрегатов антигена и антитела могут существовать, по-видимому, при всех возможных соотношениях антигена и антитела.

Гольдберг и Кэмпбелл [225] изучали осаждение бычьего сывороточного альбумина антителом кролика методом светорассеяния. Они нашли, что скорость агрегации молекул антитела и антигена в большие комплексы зависит от соотношений, в которых смешиваются антитело и антиген. Эти авторы пришли к выводу, что, по крайней мере в первом приближении, реакции протекают по бимолекулярному типу.

Методы светорассеяния рассмотрены Эдсаллом (т. II, гл. II).

10) ГЕТЕРОГЕННОСТЬ АНТИТЕЛ

Точно не известно, является ли специфическая конфигурация аминокислот антигенным детерминантом при механизме образования антител, но известно, что в одной и той же молекуле существует несколько видов детерминантов. Поэтому один и тот же антиген может вызывать образование нескольких антител. Установлено, что это действительно происходит.

Антитела против белков, искусственно конъюгированных с гаптенами (стр. 492), могут быть трех видов: против нативного белка, против гаптена и (иногда) против обоих одновременно. Антисыворотка против чистых нативных белков часто действует так, как будто бы в ней содержится ряд антител с различной специфичностью [17, 226].

Бойд [64] полагает, что следует рассматривать эти различные антитела против одного и того же антигена не как антитела различных видов, а как члены довольно большого семейства с различной степенью отклонения от среднего. Некоторые из них могут быть направлены против одного антигенного детерминанта, другие — против другого, и даже те, которые направлены против одного и того же детерминанта, могут различаться по точности воспроизведения (в обратном виде) полной электронной конфигурации исходной структуры. Очевидно, что слабо реагирующие молекулы антитела отражают недостаточно совершенно структуру детерминанта, в то время как более «авидные» молекулы передают ее более точно. Хукер и Бойд [227] установили, что степень специфичности антител против гаптена уменьшается по мере усиления иммунизации.

Работа Нортропа и Гэбеля [204] по фракционированию антипневмококкового антитела лошади, по-видимому, указывает на наличие различных молекул антител, поскольку ни одна из полученных фракций не была подобна другой. В работе Кенна, Брауна и Киркwуда [228] по фракционированию антител методом электрофоретической конвекции также была показана их неоднородность.

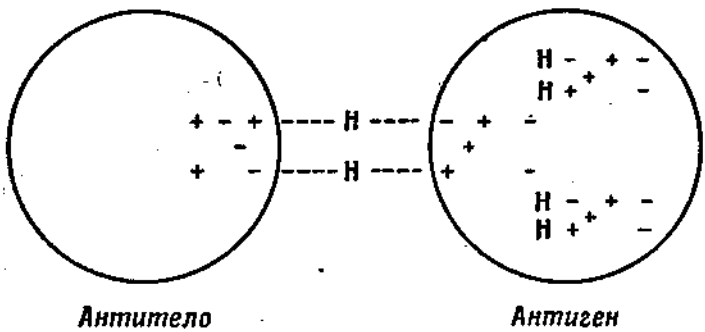
В. Природа детерминантов антител

До сих пор нет экспериментальных данных о химической природе специфических реакционноспособных групп (детерминантов или, возможно, более точно «антидетерминантов»). Можно надеяться, что определение специфичности отдельных частей молекул антитела, полученных при ферментативном расщеплении и другими методами расщепления молекул, в соединении с аминокислотным анализом позволят в дальнейшем выяснить этот вопрос. В этой связи могут быть частично использованы природные антитела («лектины») из растений (стр. 507).

В настоящее время сведения о структуре антидетерминантов молекул антител основаны на гипотетических представлениях

о механизме образования антител (стр. 526) и о силах, вызывающих соединение антител с антигенами (стр. 531).

Предполагают, что специфические группы антител, подобно аналогичным группам антигенов, характеризуются определенным расположением аминокислот в определенных точках или, скорее, в определенных участках на поверхности молекул. При объяснении высокой специфичности, проявляемой антителами, особенно их способности «различать» стереоизомеры, следует учитывать заряды



Р и с. 50. Схематическое представление механизма, при помощи которого заряды противоположного знака и группы, способные образовывать водородные связи, могут определять специфическую реакцию между антигеном и антителом.

как положительные, так и отрицательные, а также места образования водородных связей. Специфичность, возникающую у антигенных детерминантов при введении небольших химических групп, рассматривают частично как результат собственной структуры группы и частично как следствие изменения местного электрического поля [35].

Чисто схематическое представление одного простейшего случая соответствия между антителом и антигеном показано на рис. 50. Оно основано на предположении, что специфическая связующая группа антитела содержит заряженные группы, соответствующие (в обратном порядке) зарядам антигенного детерминанта и участкам образования водородных связей, причем все они расположены в форме зеркального изображения.

Не доказано, что антитела содержат специфические простетические группы, и вообще предполагается, что реакционноспособные участки представляют собой часть всей белковой структуры. Гауровитц [229] считает, что поверхность антитела соответствует поверхности антигена, как электротипия соответствует электроду сложной формы. Хукер и Бойд [214], а позднее Паулинг [92] предложили схемы, согласно которым гаптен и антигенный детерминант

заполняют выемку в антителе, причем предполагается, что заполнение это очень плотное (рис. 51).

Нейрат [188] установил, что эта тесная связь позволяет проявляться силам Ван-дер-Ваальса, которые начинают действовать только на близких расстояниях.

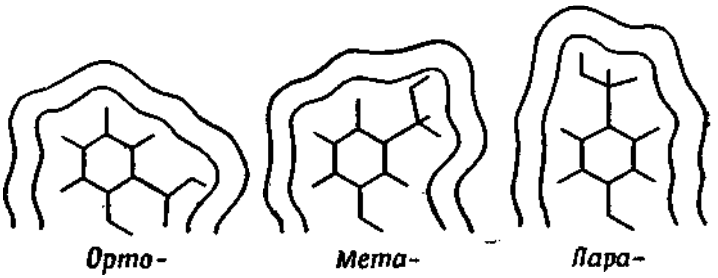


Рис. 51. Схемы гипотетических углублений в антителе, специфических для гаптенных групп *о-*, *м-* и *п*-азофенилларсаниловой кислоты, с периферическими контурами, указывающими на близкое соответствие; радиальные расстояния порядка 1,0 Å (по Паулингу [92]).

Г. Очистка антител

Чисто химические методы очистки антител никогда не приводили к 100-процентному выходу очищенного антитела, т. е. антитела, полностью осаждаемого соответствующим ему антигеном. Были использованы методы высаливания [230], осаждения спиртом на холоду [231, 232] и неспецифической адсорбции.

Препараты антитела высокой чистоты получаются только при помощи методов, основанных на реакции антитела с антигеном и отмывании полученного осадка (или агглютината) до удаления неспецифических белков с последующим применением химических способов разрушения или удаления антигена. В некоторых случаях нагревание суспендированного комплекса приводит к отщеплению значительных количеств антитела; в других случаях оказалось эффективным изменение концентрации соли [233]. Иногда можно разрушить антиген, не изменяя существенно свойств антитела. Таким путем Рамон [234] и Лок, Мэйн и Гирш [235] получили свободный антитоксин из осадков токсин—антитоксин. Самнер и Кирк [236] выделили антитело из осадков уреаза—антиуреаза путем перевода уреазы в нерастворимое состояние обработкой кислотой. Основными методами концентрирования антитела в больших количествах являются высаливание и фракционирование смесями этиловый спирт—вода или метиловый спирт—вода на холоду.

Адсорбцией агглютинирующих антител против эритроцитов на прокипяченных эритроцитах или строме, полученной из эритроцитов, в хроматографических колонках с последующим элюированием растворами углеводов или другими соответствующими реактивами удалось выделить весьма чистые изогемагглютинины [237].

Наиболее удобными методами являются методы с использованием растворимого антигена. В этом случае осадок антитело—антиген после промывки снова растворяют, а затем антиген вновь осаждают, используя некоторые его специфические реакции. Для отщепления антител из осадков пневмококка с антипневмококком лошади Гейдельбергер и Кендалл [238] применяли высококонцентрированные растворы солей (1,71—3,42 *M* NaCl). Фелтон [239] осаждал антигенные полисахариды из растворов осадков полисахарид пневмококков—антипневмококк путем добавления хлорида кальция или стронция при определенных значениях pH. Стернбергер и Прессмен [240] предложили более общий метод, применимый к системам белок—антибелок. По этому методу антиген связывается в комплекс с соответствующим количеством химического реагента, с которым вводится большое количество сильно полярных групп (например, его можно обработать диазотированной арсаниловой кислотой). Эти инородные группы не защищают нативные антигенные детерминанты независимо от их химической природы от взаимодействия с антителом нативного антигена. Конечный осадок промывают и растворяют при pH$\sim$12, и модифицированный антиген осаждают добавлением алюмината кальция. Затем pH надосадочной жидкости снова доводят до его физиологического значения. Метод, по-видимому, является общим для получения препаратов антител высокой чистоты. Таким путем можно выделить около 30% присутствующего антитела.

Кирквуд с сотрудниками [241] разработал новый метод, комбинируя электрофорез и конвекцию. Этот метод позволяет в некоторых случаях разделять антитела, не поддающиеся разделению физическими методами. Таким путем удалось разделить блокирующие антитела и «криптагглютиноиды» анти-Rh сыворотки человека. При применении комбинированного электрофоретического метода к антиарсаниловой сыворотке кролика было достигнуто некоторое разделение антитела против арсанилового гаптена и антитела против нативного белкового носителя (бычий сывороточный глобулин). Подобно всем электрофоретическим методам, этот метод дает ограниченное количество материала и неприменим в качестве способа очистки антител в больших масштабах.

Получены данные [156—162], что природные антитела, обладающие полной специфичностью против антигена группы крови A, находятся в некоторых семенах (например, в лимской фасоли) и могут быть экстрагированы в практически неограниченных количествах с высокой степенью чистоты (в некоторых случаях, вероятно,

в кристаллическом состоянии). Эти семена могут явиться источником очищенных антител в количествах, не известных до настоящего времени, что может облегчить количественное исследование реакций антитело—антиген и химической природы специфических связующих групп антитела.

Д. Количественное определение антител

Ву с сотрудниками [242] впервые, а затем Гейдельбергер и Кендалл [243] применили определение азота по микрометоду Кьельдаля для анализа осадков антитело—антиген, образуемых антигеном, который не содержал азота или содержал меченые атомы, позволяющие рассчитать количество антигенного азота в осадке. Анализ специфических осадков (или агглютинатов) подобными методами получил широкое применение [186].

Количество антитела в сыворотке кролика может изменяться от очень малых количеств, не поддающихся определению, до количеств порядка 12 *мг/мл* [244], 14 *мг/мл* или в среднем до 18 *мг/мл* у гипериммунных животных [245]. В сыворотке одного кролика было обнаружено 42 *мг/мл* белкового антитела [245].

Е. Образование антител

Можно предполагать, что антитела образуются в той же части организма, где образуются и белки сыворотки. Медден и Уиппл [246], рассмотревшие этот вопрос заново, считали, что наиболее важным органом для образования белков плазмы является печень.

Имеются серьезные основания полагать, что антитела образуются в ретикуло-эндотелиальной системе: эта система представляет собой макрофаговые клетки, находящиеся в селезенке, лимфатических железах, зобной железе, печени, лимфатических синусах, капиллярах надпочечной железы, питуитарном синусе, а также в свободно движущихся клетках крови. Делались попытки доказать это положение опытами, имевшими целью «блокировку» ретикуло-эндотелиальной системы животного, например путем инъекции неантигенного специфического материала или удаления (а иногда трансплантации) лимфатических узлов. Было проведено химическое исследование введенных антигенов, особенно меченых антигенов; при этом исходили из предположения, что синтез антитела происходит там, где обнаружен данный антиген. Наибольший интерес в этой связи до развития методики с мечеными атомами имели работы Гауровитца и Брейнла [247], которые применяли антигены, содержащие мышьяк, Роуса и Бирда [248] с антигенами, содержащими парамагнитное железо, и Сабина [249] с интенсивно окрашенными антигенами.

Гауровитц и Крэмптон [250] изучали отложение в органах кролика инъецированного яичного альбумина, содержащего J^{131}. В печени было обнаружено около 2000 молекул яичного альбумина на одну клетку (аналогичные результаты получены для селезенки); изучение скорости удаления показало, что в течение 300 дней содержание в клетках снизилось до 200 молекул, а через 3000 дней—до 20 молекул на клетку. Антиген сначала был связан с микросомами, а затем все больше и больше его находили в митохондриях. Большое значение придается высокой концентрации антигена в цитоплазматических гранулах.

Обнаружение γ-глобулина в лимфоцитах привело к исследованиям содержания антител в лимфоцитах иммунизированных животных [251, 252]; было показано, что экстракты лимфоцитов иммунизированных животных содержат специфические антитела против введенного антигена, иногда в бо́льших концентрациях, чем в сыворотке. Экстракты лимфоцитов от нормальных животных не содержат антител.

Далее было показано, что удаление антител из лимфоцитов регулируется адренокортикотропными гормонами, так же как и удаление нормальных γ-глобулинов [253].

Тем не менее все современные данные показывают, что скорее плазма клетки, чем лимфоциты, является основным источником продуцирования антител. Это положение Фагрез [254] сформулировал следующим образом: 1) Инъекция антигена, например яичного альбумина, кроликам вызывает резкое повышение числа клеток плазмы в селезенке, в то время как инъекция аналогичных, но не антигенных веществ, таких, как желатина, пептон и декстран*, не вызывает такого эффекта. 2) Цитологическими исследованиями было показано, что в качестве вторичного ответа на антиген вначале наблюдается образование больших ретикулярных клеток при увеличении цитоплазматических базофилов (переходные клетки) с последующим развитием их в типичные клетки плазмы. В период, когда продуцирование антител идет наиболее активно, одновременно наблюдается преобладание незрелых клеток плазмы. 3) В опытах с тканевыми культурами из кусочков селезенки иммунизированных животных красная пульпа продуцирует больше антител, чем белая пульпа, и способность красной пульпы продуцировать антитела непосредственно связана с содержанием клеток плазмы, особенно со степенью их зрелости. Бьёрнебе, Гормсен и Линдквист [257] нашли, что у гипериммунизированных животных содержание анти-

---

* Декстраны, несомненно, являются более слабыми антигенами, чем белки, например яичный альбумин, и могут действительно не быть антигенами для кроликов [255]. Однако у людей при введении декстранов наблюдаются резкое повышение чувствительности и продуцирование преципитинов, что указывает на антигенные свойства декстранов для человека [256].

тел в тканях связано с числом клеток плазмы, обнаруживаемых на гистологических срезах.

Барнет и Феннер [258] суммировали современное положение вопроса о продуцировании антител следующим образом. 1) Продуцирование антител против специфических антигенов, введенных в отдельные ткани, является преимущественно функцией клеток плазмы в лимфатических узлах, дренирующих эту область. 2) Селезенка также играет существенную роль в том случае, когда антигенный материал циркулирует в крови. 3) Антитела, продуцированные в лимфатических узлах, попадают в кровоток в значительной степени через цитоплазму лимфоцитов и клеток плазмы в выносящем токе лимфы. 4) Освобождение антител из этих клеток определяется частично или полностью растворением цитоплазмы, вызываемым или регулируемым адренокортикотропными гормонами.

Барнет и Феннер полагают, что эти выводы относятся только к сывороточным антителам, образующимся в ответ на введение специфических антигенов. Они считают, что пока нет определенных сведений о том, где продуцируются антитела, обусловливающие сенсибилизирующие реакции или образующиеся в ответ на пересадку тканей, и что фактически не ясно, каким образом они переносятся к основным тканям тела.

Во многих новейших теориях образования антител высказывается предположение, что молекула антитела образуется в контакте с молекулой антигена (или клеткой, модифицированной подобной молекулой). Вообще теория Гауровитца [16] кажется наиболее правдоподобной и лучше согласующейся с современными данными по синтезу белка. Гауровитц полагает, что синтез белка происходит внутри или вокруг ядрышек и в мелких гранулах цитоплазмы. (Синтез белка имеет место, конечно, и в частицах вируса, но этот вопрос здесь не рассматривается.) В этих местах белкового синтеза содержится большое количество дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Гауровитц считает, что на основании современных данных высокую степень специфичности синтезированного белка можно приписать тому, что клетка содержит повторяющиеся функциональные участки, которые действуют подобно матрице. Более того, представление о том, что репродуцирование белков может иметь место только в вытянутом состоянии—в мономолекулярной пленке [259, 260], является единственной концепцией, совпадающей с нашим современным представлением о межмолекулярных силах. Следовательно, одним из первых возникает вопрос о том, что удерживает матрицу (и молекулу антигена) в вытянутой мономолекулярной форме. Гауровитц полагает, что эту роль выполняют молекулы нуклеиновой кислоты, которые имеют полярный характер и, как известно, способны связываться с белками.

Первой стадией образования антитела по Гауровитцу является расположение аминокислот на поверхности матрицы, причем каж-

дая аминокислота располагается над соответствующей аминокислотой в матрице. Этот процесс аналогичен процессу кристаллизации, который часто сам по себе довольно специфичен. Затем эти отложенные аминокислоты соединяются между собой в полипептидную цепь при помощи ферментов типа катепсинов. Новая молекула включается в ток крови и, освобожденная от действия полярных сил нуклеиновой кислоты, может принять свою типичную глобулярную структуру.

При образовании антител, если матрицей служит молекула антигена, новая молекула, будучи позитивной репликой, должна быть не молекулой антитела, а другой молекулой антигена. На самом деле этого не наблюдается. Гауровитц полагает, что матрицей фактически служит некоторый природный шаблон тела клетки, адаптированный для целей направления синтеза в сторону образования других молекул, подобных ей самой, но измененного строения из-за присутствия данного антигена. Важно именно это изменение, и оно, повторенное в новой молекуле, образует «активные центры» молекулы антитела.

Были предложены и другие теории образования антител, но большинство из них, кроме двух, имеют только исторический интерес. Барнет и Феннер [258] полагают, что некоторые ферменты организма при разрушении введенных инородных антигенов изменяются специфически и что эти «тренированные ферменты» приобретают способность синтезировать специфические антитела.

Барнет и Феннер [258] принимают, что антитела могут образовываться и в отсутствие антигена. Согласно этой теории: а) ферменты, участвующие в разложении составных частей нормального организма, адаптируются к воздействию на аналогичные молекулы инородных веществ; б) эти адаптированные ферменты сами репродуцируются и продолжают размножаться после удаления антигена; в) антитела (ферментативно инактивные) частично являются репликами этих адаптированных ферментов.

Гауровитц выдвигает ряд возражений против этой точки зрения. Из них наиболее серьезным является то обстоятельство, что могут получаться антитела против искусственных гаптенов, которые не идентичны каким-либо составным частям организма и для разложения которых в организме не существует соответствующих ферментов. Следовательно, возражения Барнета против общепринятых теорий образования антител основаны частично на нежелании допустить, что молекулы антигена или фрагменты подобных молекул могут существовать в теле животного столько же времени, сколько продолжается продуцирование антител (более 50 лет в случае вируса желтой лихорадки). Тем не менее точно установлено, что пневмококковый антиген может оставаться в теле некоторых животных (мыши) в течение всей жизни, а частички угля и пигменты могут иногда оставаться в теле в течение длительных периодов времени.

Паулинг [164] выдвинул гипотезу, что в процессе продуцирования антител образующаяся молекула глобулина сначала денатурируется, и, таким образом, характерный для нее способ упаковки частично нарушается. Если она затем «ренатурируется» в контакте с молекулой антигена, повторяется тот способ укладки, при котором некоторые полярные группы антитела снова приспосабливаются (в обратном порядке) к конфигурации антигена и превращаются таким путем в молекулу антитела. Порядок расположения аминокислот в цепи не изменяется, но изменяется способ упаковки цепей при свертывании в глобулярную молекулу. Паулинг считает, что существует множество таких способов упаковки с одной и той же внутренней энергией, и поэтому все они равновероятны; наличие антигена в теле просто определяет, какой из этих способов осуществится*.

Специфическое расположение аминокислот в каком-либо антителе до сих пор еще не выяснено. Однако Портер [38] нашел, что γ-глобулин из сыворотки кролика, содержащей антиовальбумин, имеет то же расположение аминокислот на конце цепи (аланил—лейцил—валил—аспарагил, причем остаток глутамина, вероятно, занимает пятое место), что и иммунологически неактивный γ-глобулин того же животного. Тот факт, что порядок расположения аминокислот в полипептидной цепи антитела не отличается от расположения их в нормальном γ-глобулине, в конечном счете не противоречит гипотезе Паулинга.

Паулинг утверждает (для автора настоящей главы не ясно, на чем основано это утверждение), что его теория образования антител требует, чтобы оба конца молекулы глобулина изменялись одновременно, и что при наличии двух различных антигенов или детерминантных групп А и В наряду с анти-А и анти-В должны образоваться антитела, один конец которых модифицирован под влиянием А, а другой—под влиянием В (анти-АВ). Экспериментально это положение не подтвердилось [261].

Паулинг и Кэмпбелл [262] пытались проверить эту теорию экспериментально; они сообщили, что синтезировали *in vitro* антитела путем контактирования денатурированного глобулина с простыми антигенами, ренатурируя глобулин и удаляя затем антиген. В тече-

* Паулинг [164] полагает, что возможность большого числа конфигураций с почти равной энергией имеется только для концов полипептидной цепи и что данная конфигурация определяется различием в составе аминокислот на концах и в середине цепи. Он считает, что «концевые участки молекулы глобулина содержат очень большие количества (около $^1/_8$ или $^1/_2$) пролина, оксипролина и других остатков, которые препятствуют образованию стабильной поверхностной конфигурации». Это положение легко проверить, исходя из внутреннего строения γ-глобулинов, например путем анализа частично переваренных антител, которые все же полностью сохраняют свою активность. В настоящее время таких аналитических данных еще не получено.

ние 10 лет, прошедших со времени опубликования этой работы, ее данные не подтвердились [263, 264] даже в лаборатории самого Паулинга. Ввиду очень большого практического значения любого метода получения антител *in vitro* отсутствие подтверждения этого опыта показывает, что его, по-видимому, не удалось повторить.

Схема Паулинга для выемки в антителе, специфически адаптированной по форме к антигенному детерминанту, показана на рис. 51.

Существование природных растительных антител с высокой специфичностью [156—163], хотя и не противоречит приведенной выше концепции образования антител, все же вызывает ряд интересных вопросов. Особенно интересно выяснить, в чем состоит сходство между этими растительными лектинами и иммунными антителами. Возможно, что расположение аминокислот на некоторых участках поверхности этих растительных белков случайно позволяет им специфически соединяться с антигеном.

4. СОЕДИНЕНИЕ АНТИТЕЛО—АНТИГЕН

Имеется ряд специфических особенностей для реакций между антителом и антигеном, которые позволяют разбить эту реакцию на две стадии. Это не обязательно означает, что эти две стадии полностью отделены друг от друга или что механизм их различен.

Существуют следующие соображения для этого деления. 1) Первая стадия протекает без видимых изменений и может быть обнаружена только косвенным путем по некоторым вторичным эффектам, в то время как вторая стадия является явной и легко обнаруживается. 2) Для большинства низкомолекулярных гаптенов, реагирующих только с антителами, вторая стадия вообще не наблюдается. 3) При некоторых условиях, например при малой ионной силе, соединение происходит, но последующие стадии, которые приводят к агрегации, могут и не протекать [265]. 4) Скорости реакции на обеих стадиях могут сильно различаться между собой, причем первая стадия протекает всегда очень быстро, а вторая—часто довольно медленно. 5) Изменения энергии почти целиком связаны с первой стадией. 6) В некоторых случаях специфичность второй стадии, по-видимому, меньше. 7) Силы, обусловливающие агрегацию, слабее сил, вызывающих первичное взаимодействие между антителом и антигеном [266].

А. Первая стадия: соединение

1) ДЕЙСТВУЮЩИЕ СИЛЫ

Силы, вызывающие соединение молекул антитела с их антигенами, вероятно, являются сложными. Здесь могут играть роль силы электростатического притяжения заряженных групп (например,

взаимодействие между $—COO^-$ и $—NH_3^+$), вандерваальсовы дисперсионные силы притяжения, образование водородных связей и стерические затруднения, зависящие от размеров и формы молекул. Силы, соединяющие искусственно введенные группы $—N=N—C_6H_4AsO_3H^-$ с их специфическими антителами, сводятся к притяжению между отрицательно заряженной группой и положительно заряженным антителом; водородная связь с антителом образуется за счет недиссоциированного водорода группы; вандерваальсовы силы возникают между группой и прилегающими участками антитела; возможно, что водородная связь образуется между одним из атомов азота группы $—N=N—$ и группой антитела, играющей роль донора водорода. Стерические факторы обеспечивают соответствующие расстояния между атомами группы гаптена и атомами антитела.

По-видимому, наиболее прочные связи образуются за счет кулоновых сил взаимодействия между отрицательно и положительно заряженными группами. В случае природных антигенов можно допустить наличие в каждом детерминанте, или «активном центре», некоторого числа заряженных групп, имеющих, несомненно, разные знаки заряда. Это подтверждается рядом опытных данных, например сильным влиянием полярных групп на специфичность (см. выше) и большими теплотами реакции между антителом и антигеном (стр. 533).

Гэбель и Хочкис [267] нашли, что антипневмококковые сыворотки лошади типов I, III и VIII дают сильную преципитацию с искусственными антигенами, содержащими радикалы бензокарбоновых и сульфоновых кислот; они предполагают, что это связано с притяжением между ионизированными карбоксильными группами уроновых кислот и ионизированными аминогруппами антитела. Такое представление подтверждается тем фактом, что обработка антител формальдегидом, который, по-видимому, реагирует с аминогруппами, нарушает специфические преципитирующие свойства этих антител; ацетилирование оказывает почти такое же действие.

Клейншмидт и Бойер [266], изучая влияние pH на специфическое образование осадка, пришли к выводу, что заряженные группы остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот и лизина имеют значение для реакции между яичным альбумином и его антителом, а остатки гистидина не играют при этом заметной роли. Однако 25—30% аминокислот яичного альбумина можно удалить без заметного снижения его специфической реакционной способности [43—45].

Опыты с тонкими пленками антигена и антитела, разделенными инертными «барьерами», позволили Розену [268] сделать предположение о наличии дальнодействующих сил при реакции между антителом и антигеном. Эти опыты были подвергнуты критике Зингером [269], Кэмпбеллом, а также Балменом [28], которые считают, что, «поскольку бо́льшая часть иммунохимических эксперименталь-

ных данных согласуется с достоверно установленными принципами сил ближнего действия, в настоящее время нет достаточных оснований принимать специфические силы дальнего действия». Автор согласен с этим мнением.

Филитти-Вюрмзер и другие [270] полагают, что теплота реакции, рассчитанная ими для соединения анти-В агглютинина из сыворотки индивидуума генотипа A_1O (ΔH=—16 *ккал*), соответствует образованию 3—4 водородных связей или 16 вандерваальсовых связей.

2) СКОРОСТЬ РЕАКЦИИ

Если добавить агглютинин к клеткам и содержимое пробирок немедленно центрифугировать, то агглютинация будет не менее сильной, чем если оставить пробирки на некоторое время до центрифугирования; исключение составляют некоторые слабые антитела, например полученные в Rh-системе. Это подтверждает тот факт, что бо́льшая часть антитела связывается за несколько секунд. При смешивании преципитина и антигена осадок часто появляется немедленно. Гейдельбергер, Трефферс и Майер [131] нашли, что соединение между антителом против яичного альбумина с его антигеном заканчивается в течение 20 сек. даже при 0°. Майер и Гейдельбергер [271] считают, что взаимодействие между полисахаридами пневмококка и их антителами протекает, по крайней мере, на 90% менее чем за 3 сек. при 0°. Скорость выделения тепла при взаимодействии антитела и антигена (см. ниже) также доказывает, что реакция даже в большом объеме—порядка 800 *мл*—заканчивается за 3 мин. и даже раньше.

3) ТЕПЛОТА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИТЕЛО—АНТИГЕН

Бойд с сотрудниками [272] измерил теплоту реакции антигемоцианина лошади с гемоцианином от *Busycon canilicutatum* при 31°. В области избытка антитела, где, например, с антибелковыми антителами лошади не образуется осадка, выделяется около 3 *кал* тепла на 1 *г* азота антигена. Молекулярный вес этого гемоцианина, по данным Сведберга [273], составляет 6 800 000, следовательно, это количество тепла соответствует 3300 *ккал/моль* антигена. При экстраполировании результатов анализа специфических осадков, образующихся в этой системе, было рассчитано, что полученный результат соответствует приблизительно 40 *ккал/моль* антитела. Найденное большое значение свидетельствует о том, что в соединении каждой молекулы антигена с молекулой антитела участвует большое количество электрических зарядов, как и предполагалось выше.

После работы Бойда [272] ряд авторов рассчитали изменение энергии для других реакций антитело—антиген из равновесных измерений и пришли к различным выводам. Результаты, взятые из работы

Меррека [99], даны в табл. 47. Для сравнения приведено значение энергии соединения бычьего сывороточного альбумина с красителем оранжевым I. Как видно, числовые значения этих величин значительно колеблются, хотя порядок их остается одним и тем же.

Найденные Гауровитцем [20] положительные изменения энтропии показывают, что при соединении антитело—антиген освобождаются молекулы воды. В результате агрегации могут происходить отрицательные изменения энтропии; данные указывают на возможность ограничения вращательных степеней свободы молекул белка в результате агрегации, а также на возможность связывания в результате реакции некоторого количества молекул воды.

Кэмпбелл и Балмен [28] высказали предположение, что расчеты Гауровитца с сотрудниками [274] нельзя принимать безоговорочно, пока не будет показано, что уравнение, принимаемое авторами, фактически соответствует протекающей реакции и что изменение растворимости комплексов с температурой само по себе не оказывает решающего влияния.

Таблица 47

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ВЕЛИЧИНЫ, ИЗМЕРЕННЫЕ ИЛИ РАССЧИТАННЫЕ ДЛЯ РЕАКЦИЙ АНТИТЕЛО—АНТИГЕН (ПО МЕРРЕКУ [99])

Антиген	Антитело	ΔF, ккал/моль	ΔH, ккал/моль	ΔS, э. ед.	K
Гемоцианин [272]	Антигемоцианин лошади	—10[a]	—40	—100	
Арсанилазоглобулин бычьей сыворотки [274]		—8,5 (прибл.)	—2	21	10^6—10^7
Сульфанилазоовальбумин	Антисыворотка кролика	—8,5	—2,8	21	10^6—10^7
Антранилазоглобулин бычьей сыворотки [345]			—70		
Гаптен [346]	Антитело кролика	—7,7			$3{,}5 \cdot 10^5$
Оранжевый I [347]	Сывороточный альбумин быка	—6,36	—3,91	8,75	$9{,}93 \cdot 10^4$
Двухвалентный арсаниловый гаптен [348]	Антитело кролика	—7,6			

[a] Предполагаемое значение.

Тщательные тонкие исследования Филитти-Вюрмзер [270] с сотрудниками заслуживают подробного описания. Эти авторы использовали модифицированный метод Эшби для расчета числа

свободных и агглютинированных эритроцитов в смеси эритроцитов с сывороткой для определения степени агглютинации в смесях при разных температурах. Из определений степени агглютинации как функции концентрации свободного агглютинина при разных температурах было рассчитано изменение энтальпии ΔH.

Из этих расчетов следует очень интересный вывод, что при взаимодействии анти-В (β) агглютинина, даже если он гомогенен в какой-нибудь сыворотке, с антигенными участками эритроцитов группы В выделяются различные количества теплоты в зависимости от группы или подгруппы крови индивидуума, продуцирующего агглютинин; изменения наблюдаются даже в пределах группы А в соответствии с генотипом индивидуума. Эти результаты приведены в табл. 48.

Филитти-Вюрмзер полагает, что гомогенность агглютининов у любой особи противоречит явлению гетерогенности антител, продуцируемых в ответ на иммунизацию антигеном, и объясняет это тем, что изоагглютинины продуцируются как результат прямого воздействия гена.

Предполагалось, что разница в порядке величин теплот реакций для различных агглютининов в основном определяется различиями в специфических реакционноспособных группах. Филитти-Вюрмзер и другие, наоборот, допускают, что повышение энтропии, которое наблюдается при взаимодействии анти-В сыворотки группы О с В, связано с перестройкой всей молекулы белка. Возможно, что изменения специфических групп имеют характер обратимой денатурации, в результате которой увеличивается неупорядоченность и поглощается тепло. Эти эффекты маскируют выделение тепла и уменьшение энтропии при локальных реакциях специфических групп. В случае бо́льших молекул анти-В от индивидуума генотипа A_1O (стр. 509) изменение, вызванное в специфической группе, недостаточно для заметного изменения всей молекулы.

Таблица 48

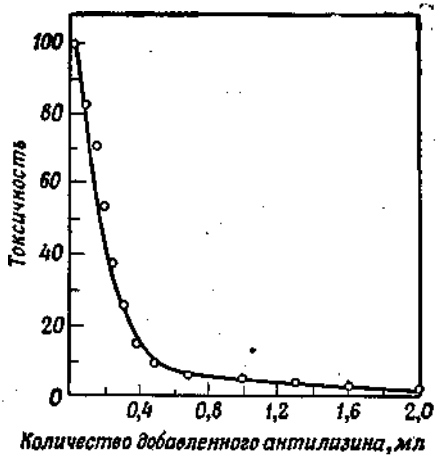
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ВЕЛИЧИНЫ ДЛЯ АНТИ-В (β) АГГЛЮТИНИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ИНДИВИДУУМОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ГРУППАМИ И ПОДГРУППАМИ КРОВИ [270]

Группа подгруппы	ΔF, ккал/моль	ΔH, ккал/моль	ΔS, э. ед.	K (при 37°)
A_1O	−9,8	−16,0	−20	$0{,}8 \cdot 10^7$
OO	−9,2	−1,7	+24	$3 \cdot 10^6$
A_1A_1	—	−8,0	+ 8	—
A_2	—	−9,0	—	—
A_3	—	−3,0	—	—

4) ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Борде [275] предполагал, что для агглютинации бактерий необходимо наличие солей, но что соединение антитела с бактериями происходит в отсутствие солей. Ландштейнер и Велецкий [276] нашли, что соединение гемолизина с эритроцитами в значительной степени подавляется гипертоническими растворами (1 *M* NaCl), в то время как Гейдельбергер и Кебет [277] установили, что значительные количества антитела могут отщепляться от специфических осадков и от агглютинированных пневмококков при действии 2,5 *M* раствора NaCl.

Меррек [35] полагает, что уменьшение связывания антигена и антитела при высоких концентрациях солей можно объяснить образованием атмосферы ионов электролита вокруг противоположно заряженных полярных ионов взаимодействующих групп антитела и антигена, снижающих их взаимное притяжение.



Р и с. 52. Относительная токсичность постоянного количества тетанолизина после добавления различных количеств антитела [305].

Б. Вторая стадия: преципитация, агглютинация, нейтрализация и т. п.

1) НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ТОКСИНОВ И ВИРУСОВ

Антитоксины соединяются с токсинами в различных соотношениях в зависимости от того, в каких пропорциях смешаны реагенты. При определении токсичности различных смесей можно подсчитать отношения, в которых соединяются оба реагента. Данные типичных опытов приведены на рис. 52.

Было показано, что количество антитоксина, которое связывается с единицей токсина, возрастает при увеличении отношения антитоксина к токсину в исходной смеси, но зависимость не имеет линейного характера. Подобные результаты типичны для случая веществ с многочисленными связующими группами. На этом основании было показано, что уравнения адсорбционного типа, например $R=kx^n$, где R—отношение антитоксина к связанному токсину, x—конечная концентрация свободного антитоксина в смеси, а k и n—константы, хорошо описывают экспериментальные результаты.

Авидность. Наблюдалось, что защитное действие сыворотки антитоксина в опытах с животными не всегда соответствует содержанию антитоксина, определяемого титрованием *in vitro*. Краус [278] в 1903 г. нашел, что для нормальной сыворотки козы или лошади нейтрализация токсина вибриона Назика требует около часа, в то время как иммунный антитоксин нейтрализует его немедленно. Краус полагает, что иммунная сыворотка имеет бо́льшую авидность к токсину. Гленни и Бэрр [279] считают, что существенной мерой авидности является прочность соединения антигена с антителом.

Очевидно, что практически очень важно, чтобы антисыворотка содержала не только адекватное количество антитела, но и чтобы это антитело обладало достаточной авидностью. Аналогичные условия предъявляются наряду с другими случаями [280] и при оценке реагентов для определения групп крови.

2) АГГЛЮТИНАЦИЯ

Гейдельбергер и Кебет [281] рассчитывали количество антитела, участвующего в реакциях агглютинации, по определению азота агглютинированных и неизмененных бактерий. Пневмококки в количествах, при которых удаляется бо́льшая часть агглютинина из сыворотки, содержат 0,2—1,9 *г* азота антитела на 1 *г* бактериального азота. Даже небольших количеств—порядка 1/100 от этой величины—уже достаточно для того, чтобы вызвать агглютинацию.

Зоны агглютинации. Если агглютинирующая сыворотка достаточно разбавлена, она, конечно, не вызывает больше агглютинации клеточных суспензий. «Зона» концентраций антитела, при которых не наблюдается агглютинации из-за недостатка антисыворотки, называется «постзоной».

Для некоторых сывороток имеется «презона», в которой находится слишком много антисыворотки. В некоторых случаях это объясняется наличием ингибирующих веществ, которые взаимодействуют с агглютининами, снижая силы сцепления между бактериями, после того как они соединились с антителом. Это взаимодействие носит специфический характер. Джонс и Оркэт [282] путем прямых измерений силы сцепления между мазками бактерий на предметных стеклах установили, что наличие подобного ингибирующего вещества снижает силы сцепления между мазками бактерий, обработанных агглютинином, до величин, наблюдаемых у необработанных бактерий. У обработанных таким образом пленок можно изменить силы сцепления до нормальной величины путем промывки, и тогда обработанные бактерии из «презоны» агглютинируют после промывки. Джонс и Оркэт отмечают интересный факт, что в присутствии такого ингибирующего вещества не происходит увеличения объема бактерий, связанных с антителом, хотя такое увеличение наблюдается в присутствии агглютинина. Таким образом, можно предположить,

что или пленка ингибитора очень тонка, или (и это более вероятно) что она состоит из небольшого количества молекул, рассеянных по поверхности бактерий.

В сыворотках различных групп крови, особенно в анти-Rh сыворотке [134—136], часто обнаруживаются специфические ингибирующие вещества. Было высказано предположение, что они состоят из одновалентных антител, которые способны соединяться со специфическими связующими центрами эритроцитов, но, поскольку у них имеется только одна связующая группа на молекулу, они не могут способствовать соединению клеток между собой и тем самым вызывать агглютинацию. Если это верно, то такой механизм должен отличаться от механизма, изученного Джонсом и Оркэтом. Следует отметить, что Рейс и Сангер [222] получили данные, которые не согласуются с представлением об одновалентности этих блокирующих антител (стр. 521).

3) ПРЕЦИПИТАЦИЯ

При смешении растворимого антигена с его антителом образуется нерастворимое соединение обоих веществ. Это явление использовано в большей части теоретических исследований серологических реакций.

а) Количество осадка; зоны. Количество осадка, полученного в этих случаях, зависит от абсолютных количеств обоих реагентов и соотношений, в которых они смешаны. Осадок обычно определяют по микрометоду Кьельдаля [186, 283], но Гейдельбергер и Макферсон [284], применяя фенольный реагент Фолин-Чиколто, предложили метод, который позволяет определять весьма малые количества (порядка 10 μg) белка. При смешении антитела с антигеном в «эквивалентных» соотношениях оба обычно осаждаются количественно.

Если оба реагента смешаны в «неэквивалентных» количествах, то осаждение бывает неполным или совсем не происходит. При избытке антигена, т. е. при недостаточном количестве антитела для осаждения присутствующего антигена, также не наблюдается осаждения и появляется «постзона». К сожалению, ее обычно называют «презоной», так как при изучении преципитирующих систем принято пользоваться постоянным количеством антитела для определения различных разбавлений антигена, исходя из его более концентрированных растворов. В этих случаях говорят, что сильные антигены «ингибируют» осаждение.

Избыток антитела не влияет значительно на полноту осаждения антигена ни в случае антител кролика, ни в случае антиполисахаридных антител лошади. Для антибелковых антител лошади, например антитоксинов, оказалось, что избыток антитела оказывает препятствие осаждению или предотвращает его, и в результате обра-

зуются растворимые вещества из антитела и антигена. Это рассматривают как ингибирование, осуществляемое избытком антитела.

Вследствие различий в поведении двух типов антител количественные исследования реакции преципитации приводят к различным результатам для таких антител. В случае антител типа R (антитела кролика и антиполисахаридные антитела лошади) добавление возрастающих количеств антитела к данному количеству

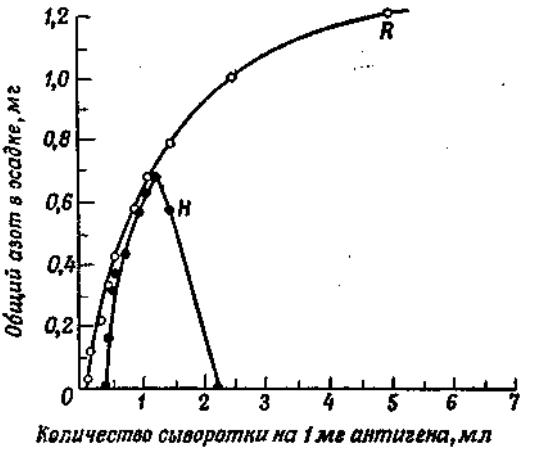


Рис. 53. Количество осадка, образующееся при добавлении возрастающих количеств антитела к постоянному количеству антигена.
R—антитело кролика (антиовальбумин), H—антитело лошади (антитоксин).

антигена приводит к увеличивающимся количествам осадка, так как образуются и осаждаются соединения с большим содержанием антитела. В случае антител типа H (антибелки лошади) добавление возрастающих количеств антитела вызывает увеличение количества осадка до максимума, после чего количество осадка резко снижается, поскольку соединения с большим содержанием антитела растворимы. Это показано на рис. 53.

б) Зоны эквивалентности. Обычно существует соотношение или несколько соотношений, при которых два реагента могут быть смешаны (вероятно, в случае чистых антигенов и чистых антител), так что фильтрат после отделения осадка содержит неопределяемое количество антитела или антигена (или следы обоих). Такое соотношение и получило название зоны эквивалентности [285]. Эта величина должна совпадать с соотношением, которое получается при максимальном осаждении антитела из данного объема антисыворотки.

в) Состав осадка. В большинстве случаев специфический осадок состоит в основном из антитела (стр. 498). Кроме того, наряду с антителом и антигеном могут быть небольшие количества других веществ, например липидов и компонентов комплемента (стр. 554).

Влияние молекулярного веса антигена на состав осадка обсуждалось достаточно широко (стр. 497). Для больших молекул антигена отношение веса антитела к весу антигена в осадке вообще мало (<1); для небольших молекул антигена это отношение стремится к значительной величине (10—100).

Отношение количеств антитела и антигена в осадке возрастает пропорционально количеству добавленного антитела для определенного количества антигена. Полученные величины довольно хорошо описываются адсорбционным уравнением Фрейндлиха [286]

$$R = a\,(A)^b,$$

и Лэнгмюра [287]

$$R = \frac{ab\,(A)}{1 + a\,(A)}.$$

Здесь R—количество антигена в осадке; (A)—концентрация антитела в растворе; a и b—константы. Типичные результаты приведены в табл. 49.

Таблица 49

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОТНОШЕНИЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНУ В ОСАДКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ДЛЯ ДВУХ РАЗНЫХ СИСТЕМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СООТНОШЕНИЯХ АНТИТЕЛО—АНТИГЕН [349]

Во всех опытах брали 1 *мл* антисыворотки. А—антитело, Т—токсин, S—специфический капсулярный полисахарид пневмококка типа III, N—азот. Цифры в скобках—приблизительные значения

Лошадиная антипневмококковая сыворотка S III				Лошадиная сыворотка против дифтерийного токсина			
добавлено S, *мг*	ΣN осадка, *мг*	R= =(N/S)6,25	реагент в избытке	добавлено N токсина, *мг*	ΣN осадка, *мг*	R=N антитела/N токсина	реагент в избытке
0,02	0,45	140	A	0,023	0		A
0,04	0,79	124	A	0,046	0		A
0,05	0,97	121	A	0,069	0,386	(6,9)	(A)
0,06	1,08	112	A	0,081	0,554	5,8	(A)
0,08	1,29	101	A	0,092	0,564	5,1	
0,10	1,54	96	A	0,103	0,579	4,6	
0,12	1,68	87	A	0,138	0,612	3,4	
0,15	1,71	71	A	0,184	0,661	2,6	(T)
0,20	1,75	?	S	(0,196)		(2,4)	(T)
				0,207	0,652		(T)
				0,230	0,359		T
				0,276	0		T

г) Молекулярный состав осадков. Данные анализа специфических осадков и известные молекулярные веса антител и антигенов позволяют рассчитать молекулярный состав специфических осадков. Типичные результаты для нескольких систем приведены в табл. 50.

Очевидно, что осадок, полученный в любой точке ряда соотношений антитело—антиген, представляет смесь двух или более этих соединений.

Таблица 50

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ СОЕДИНЕНИЙ АНТИТЕЛО—АНТИГЕН [350]

R—кролик, H—лошадь, A—антитело, G—антиген; формулы в скобках приблизительные

Антиген	Антитело	Эмпирический состав осадка в различных зонах				Состав растворимого соединения в зоне частичного ингибирования
		большой избыток антитела	зона эквивалентности		зона частичного ингибирования	
			избыток антитела	избыток антигена		
Яичный альбумин . .	R	A_5G	A_3G	A_5G_2	A_2G	(AG)
Краситель—яичный альбумин	R	(A_5G)	(A_3G)	A_5G_2	A_3G_4	(AG_2)
Сывороточный альбумин	R	A_6G	A_4G	A_3G	A_2G	(AG)
Тироглобулин . . .	R	$A_{40}G$	$A_{14}G$	$A_{10}G$	A_2G	(AG)
Гемоцианин живородящих	R	—	$A_{120}G$	$A_{83}G$	$A_{36}G$	—
Вирус мозаики табака	R	$A_{900}G$	$A_{450}G$	—	—	—
Дифтерийный токсин	H	A_8G	A_4G	A_5G_2	AG	(AG_2)
Яичный альбумин . .	H	(A_4G)	A_2G	—	AG	(AG_2)

д) Растворимость осадка. Специфические осадки, образуемые антителом и антигеном в обычных соотношениях, очень мало растворимы (порядка 0,05—0,005 *мг* белкового азота на 1 *мл* солевого раствора). Тем не менее при определениях малых количеств антител необходимо вносить поправки на растворимость осадка. При образовании в избытке антигена или (в случае антибелковых антител лошади) в избытке антитела осадки могут быть настолько хорошо растворимы, что их получение, промывка и анализ становятся затруднительными. Более растворимые части этих осадков могут вымываться, а оставшиеся вещества не дают представления о составе целого.

е) Скорость осаждения: оптимальные условия. Существует определенное количественное соотношение антитело : антиген, при котором образование осадка происходит с наибольшей скоростью. Определение времени осаждения смесей антитело—антиген представляет практический и теоретический интерес. Первый такой метод разработал Рамон [288], который применил его для титрования токсинов и антитоксинов. Различные количества антитоксина добавляли к определенному количеству токсина и определяли соотношение, при котором флоккуляция идет наиболее быстро. Английские исследователи назвали этот метод β-методом [35].

Дин и Уэбб [289] добавляли различные концентрации антигена к постоянному количеству антитела и определяли, в какой смеси флоккуляция идет быстрее всего. Английские ученые назвали этот метод α-методом [35]. Оба метода не дают точно совпадающих количественных отношений антитело—антиген для α- и β-оптимумов; легко показать математически, почему не следует ожидать такого совпадения [290].

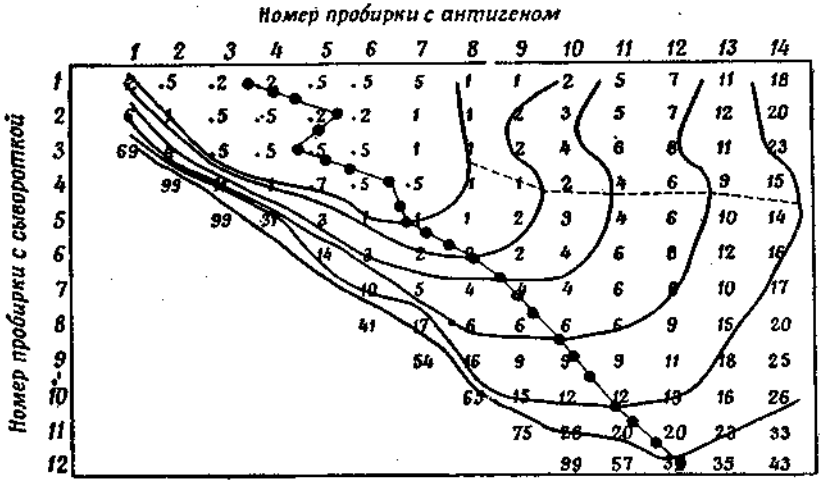
α-Оптимум (количество сыворотки постоянно; применяется серийное разбавление антигена) используется для титрований антитело—антиген, но для титрования дифтерийного токсина (или токсоида) против антитоксина лошади чаще применяют разработанную раньше β-систему (количество антигена постоянно, количество антисыворотки уменьшается).

Только антисыворотки типа H (антитела, которые ингибируют осаждение, если они присутствуют в избытке) дают хорошо выраженные и α- и β-оптимумы. Сыворотки типа R (антисыворотка кролика и антиуглеводная антисыворотка лошади) дают хорошо выраженный оптимум типа α, а тип β не наблюдается или проявляется очень слабо. Типичные результаты опытов показаны на рис. 54, где сплошная линия соответствует α-оптимуму, а пунктирная линия—β-оптимуму.

Данные, получаемые α-методом, можно найти по времени осаждения в колонках, соответствующих постоянным количествам антитела; данные для β-метода—в колонках, соответствующих постоянным количествам антигена. Очевидно, что они довольно сильно различаются между собой.

Для сывороток крайнего типа H, таких, как дифтерийный антитоксин (лошади), кривые на рис. 54 имеют вид эксцентрических парабол, и разница между оптимумами, определяемыми двумя методами, очень мала, ее трудно определить экспериментально. Это привело к тому, что некоторые авторы [291], работавшие в основном с токсинами, отрицали различие между обоими оптимумами, но тщательное измерение показывает, что небольшая разница есть и в этом случае. Сыворотка крайнего типа H представляет частный случай более общего явления.

Теорелл [292] предложил математическую теорию скоростей серологического осаждения, которая основана на правдоподобном допущении, что скорость осаждения зависит от количества осажденного антигена [293]. Она позволяет довольно хорошо предсказывать форму наблюдаемых изохрон для сывороток обоих типов H и R.



Р и с. 54. Время флоккуляции (в мин.) смесей различных количеств антитела и антигена при разных концентрациях.

Сыворотка против гемоцианина; контурные линии для интервалов 1, 2, 4, 8, 16 и 32 мин. Линия с кружочками соединяет точки оптимума при постоянном количестве антитела (α). Пунктирная линия соединяет точки оптимума при постоянном количестве антигена (β). Сплошные линии соединяют точки равных времен флоккуляции. Полученное отношение концентрации антитела к концентрации антигена довольно постоянно для α-оптимума и смещается для β-оптимума [64].

ж) Связь между оптимумом флоккуляции и нейтрализацией. Практическое применение β-оптимума связано с тем фактом, что смеси, дающие β-оптимум, обычно являются нейтральными (токсин нейтрализован, но не «перетитрован»). Однако это не всегда имеет место. Гленни и О'Келл [294] нашли, что некоторые смеси, где флоккуляция протекает наиболее быстро, могут быть нейтральными, другие—токсичными, а третьи—«перетитрованными». Подобные результаты были получены и другими авторами [295—297]. Дин и Уэбб [289] не обнаружили ни антигена, ни антитела в растворах над осадками при α-оптимуме. Аналогичные данные получены и другими авторами [35, 200]. По-видимому, точка оптимального соотношения только случайно совпадает с точкой нейтральности смеси.

з) Механизм реакции преципитации. Предложены три основные теории реакции преципитации. Наиболее ранняя, но представляющая интерес и в настоящее время—теория Борде [275], который

обратил внимание на сходство между серологическими и коллоидными реакциями.

Понижение ζ-потенциала коллоидных частиц до определенной величины при добавлении, например, электролита вызывает их коагуляцию; по аналогии Борде предположил, что взаимодействие антитела с антигеном вызывает понижение заряда частиц антигена и позволяет им соединяться между собой. Для объяснения точки зрения Борде следует указать, что многие суспензии антигенов сами по себе не очень устойчивы, особенно некоторые суспензии бактерий и эритроцитов, которые часто агглютинируются самопроизвольно, и поэтому нежелательны для экспериментатора. При этом нет необходимости сильно изменять поверхностные свойства частиц, уже близких к агглютинации, чтобы вызвать их видимую агрегацию.

Против теории Борде свидетельствует тот факт, что подобная агрегация потерявших заряд частичек антигена, согласно его взглядам, должна быть неспецифической. Иными словами, антиген А плюс антитело против А, смешанное с антигеном В, плюс анти-В должны были бы давать гетерогенные частицы, содержащие одновременно А и В. Этот опыт был проверен рядом авторов, и, хотя предсказанное явление иногда и наблюдалось, во многих случаях получались гомогенные частицы, содержащие А или В, но редко оба вместе [298]. Эти факты вызывают сомнение в применимости гипотезы Борде в качестве единственного механизма второй стадии процесса.

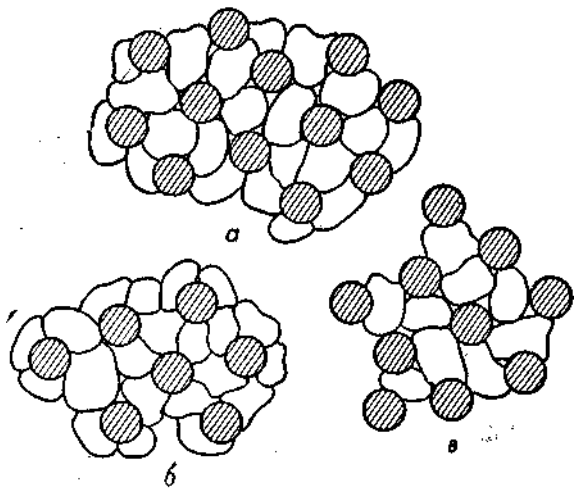
Если представления Борде о механизме преципитации верны, то при смешении независимых серологических систем, например антигена А и анти-А с В и анти-В, осаждение должно произойти быстрее, чем в случае одной системы вследствие образования смешанных агрегатов; это действительно наблюдалось в работах Хукера и Бойда [213] и Дункана [299]. Однако Ленни [300] при изучении смешанных осадков в микроскопе с затемненным полем установил, что смешанные агрегаты не возникают до тех пор, пока образующиеся частицы не будут достаточно велики для осаждения. Таким образом было установлено, что агрегация носит специфический характер почти в течение всего процесса.

Паулинг, Кэмпбелл, Прессмен [302] в опытах с эритроцитами, в которые вводили небольшое количество химических групп (порядка 60 на клетку), нашли, что антитело против введенной группы агглютинирует клетки. Можно рассчитать, что антитело, связанное с клетками, воздействует не более чем на 1% поверхности. Этого уже достаточно, чтобы вступил в действие механизм Борде.

Другую теорию механизма второй стадии предложили независимо один от другого Меррек [35] и Гейдельберг и Кендалл [211]. Согласно представлениям этих авторов, антитело с двумя или более связующими группами на молекулу специфически соединяет молекулы антигена (или клетки), образуя «решетку». Эта гипотеза предполагает попеременное расположение в трех направлениях

антитело—антиген—антитело—антиген...; Хукер и Бойд [96] назвали эту теорию «альтернационной».

Меррек высказал предположение, что силы притяжения между антителом и антигеном, которые вызывают их агрегацию, связаны не с потерей растворимости, а со специфическим притяжением между ними: «Это взаимное притяжение связано с образованием связей с молекулами антигена...» [35]. Схема процесса показана на рис. 55.



Р и с. 55. «Теория решетки» Меррека, объясняющая соединение антитела с антигеном.

а—типичный осадок; *б*—избыток антитела; *в*—избыток антигена (заштрихованные поверхности—антиген, незаштрихованные—антитело) (по Мерреку [35]).

Гейдельбергер [285] высказал предположение, что реакция преципитации зависит от того, что антиген (G) и антитело (A) химически и иммунологически поливалентны один по отношению к другому. Эту реакцию рассматривают как серию последовательных бимолекулярных реакций, которые протекают до преципитации. Закон действующих масс здесь проявляется в том, что скорости образования продуктов этих реакций пропорциональны концентрациям реагирующих веществ.

Первую предполагаемую реакцию можно записать так:

$$G + A \rightleftarrows GA,$$

вслед за которой в зоне избытка антитела следуют бимолекулярные конкурирующие реакции, определяемые взаимной поливалентностью компонентов:

$$GA + A \rightleftarrows GA.A,$$

$$GA + GA \rightleftarrows GA.GA.$$

За ними следуют другие стадии:

$$\begin{aligned} GA.A + A &\rightleftarrows GA.A.A, \\ GA.GA + A &\rightleftarrows GA.GA.A, \\ GA.A + GA.A &\rightleftarrows GAA.GAA, \\ GA.A + GA.GA &\rightleftarrows GAA.GA.GA,' \\ GA.GA + GA.GA &\rightleftarrows GAGA.GAGA. \end{aligned}$$

Образующийся продукт имеет трехмерную структуру, «решетку», по терминологии Меррека. «Процесс агрегации, так же как и исходную реакцию между гаптеном и антителом, рассматривают как химическую реакцию между определенными молекулярными группировками» [211].

Очевидно, что теория Гейдельбергера эквивалентна постулату о необратимости реакций. Иными словами, полученный результат не зависит от порядка, в котором протекают гипотетические бимолекулярные реакции (являются ли они конкурирующими), и закон действия масс применяется к равновесию между составом осадка и концентрацией реагентов, оставшихся в растворе. Это соображение высказали Паулинг, Кэмпбелл и Прессмен [302].

Теорелл [292] предложил теорию, которая (см. стр. 551) обходит это возражение. Согласно этой теории, антитела, даже если их рассматривать как двухвалентные вещества, ведут себя как одновалентные, и для них устанавливается одновременно ряд равновесных состояний:

$$\begin{aligned} A + G &\rightleftarrows AG \quad \text{с константой диссоциации } K_n, \\ A + AG &\rightleftarrows A_2G \quad » \quad » \quad » \quad K_{n-1}, \\ A + A_2G &\rightleftarrows A_3G \quad » \quad » \quad » \quad K_{n-2}, \\ A + A_{n-1}G &\rightleftarrows A_nG \quad » \quad » \quad » \quad K_1. \end{aligned}$$

Преципитация вызывается просто нерастворимостью таких соединений, как AG или A_2G, а не образованием «решетки».

Имеется ряд случаев, для которых выводы этих трех теорий не совпадают, поэтому интересно сопоставить эти выводы с экспериментальными данными.

Уже указывалось на некоторые возражения против неспецифического механизма реакции, предложенного Борде (стр. 543 и сл.). Вопреки теории Борде [275] альтернационная теория предполагает, что антиген (или гаптен) с двумя или более связующими группами должен обладать способностью образовывать осадок, поскольку он может принимать участие в образовании «решетки» с поливалентным антителом. Это положение было проверено экспериментально [92, 104, 303, 304], и оказалось, что, хотя некоторые двухвалентные гаптены не осаждаются антителами, другие—осаждаются. В случае осаждения можно допустить, что вещество в растворе находилось не в молекулярном, а в агрегированном состоянии, так что действие

оказывал поливалентный гаптен. Один из таких гаптенов исследовали методом диффузии [93], и было установлено, что он агрегирован в частицы, содержащие до 55 молекул. Ландштейнер и Вандер-Шир [78] еще ранее указывали на коллоидный характер одного из гаптенов, который вызывал осаждение. Тем не менее установлено, что двухвалентные гаптены способны к специфической преципитации, а одновалентные гаптены не обладают этим свойством. Это обстоятельство свидетельствует в пользу альтернационной теории.

Альтернационную теорию подтверждают также и опыты Гейдельбергера [285], показавшего, что пневмококки типа I, агглютинированные избытком антитела, промытые до исчезновения свободного антитела в промывных водах и после этого снова суспендированные, могут опять агглютинироваться при добавлении свежего пневмококка типа I или специфического полисахарида типа I. Подобная агглютинация не происходит при добавлении гетерологичного пневмококка или углеводов других типов. Предполагают, что здесь проявляется роль промежуточных связей, обусловленная присутствием нескольких связующих групп на молекулу антитела, при образовании специфических агрегатов антитело—антиген.

и) Математическая теория вопроса. Первую попытку создания количественной теории для реакции антитело—антиген предпринял Аррениус [305] еще до того, как стало известно о молекулярных весах реагентов или о молекулярных соотношениях, в которых они соединяются. В его теории делается ряд допущений, которые в настоящее время признаны неправильными.

Первая теория, согласующаяся с современными представлениями, принадлежит Гейдельбергеру и Кендаллу [220, 306]. На основе положений о «взаимной поливалентности антитела и антигена» они развили теорию реакции преципитации, которая приводит к уравнению

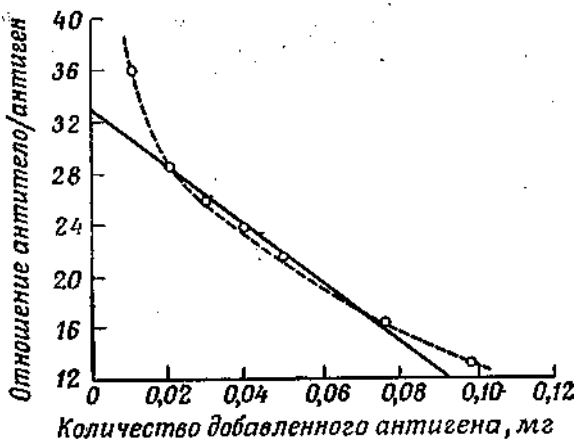
$$R = a - b \cdot G,$$

где R—количественное отношение антитела к антигену в осадке; G—количество (*мг*) антигенного азота в осадке; a и b—константы, определяемые экспериментально.

Вывод этого уравнения основан на допущении о необратимости реакций, ведущих к образованию осадка, что является спорным, поскольку осадки легко растворяются, если сначала добавить такое количество антигена, которое способно предотвратить образование осадка [307]. Кроме того, уравнение применимо только для зоны избытка антитела и должно быть «обращено», когда антиген находится в избытке. Ни в прямом, ни в обращенном виде оно не применимо для систем с антителами типа H.

Уравнение Гейдельбергера и Кендалла довольно хорошо согласуется с экспериментальными данными в ограниченной области,

хотя это уравнение предполагает линейную зависимость между R и G, а эта зависимость фактически не имеет линейного характера, как показано на рис. 56.



Р и с. 56. Отношение между составом осадка (R) и количеством антигена, добавленного к определенному количеству антитела.

○ экспериментальные точки; ——— теоретическое линейное отношение по Гейдельбергеру и Кендаллу; ——— кривая, соответствующая уравнению для нелинейной зависимости [64].

Уравнения типа

$$R = a + bG + cG^2$$

лучше согласуются с экспериментальными данными в указанном интервале [64], чем уравнение Гейдельбергера и Кендалла (см. рис. 55), и эти авторы [220, 306] сами установили лучшее соответствие с опытом, применяя уравнение

$$R = a - bG_a^{1/2},$$

где G_a—количество (*мг*) добавленного антигенного азота.

Уравнения типа уравнений Фрейндлиха [286] и Лэнгмюра [287] (стр. 540) в некоторых случаях дают даже лучшее совпадение с экспериментальными данными, как это видно из табл. 51.

Гершей [308] предложил более строгую математическую теорию реакции преципитации. Он показал, что если принять серию реакций вида

$$G + A \rightleftarrows GA,$$
$$GA + A \rightleftarrows GA_2,$$
$$\cdots\cdots\cdots\cdots$$
$$GA_{n+1} + A \rightleftarrows GA_n$$

и допустить, что в этих реакциях достигается равновесие независимо от явления агрегации, то получается уравнение

$$R = abA/(1 + bA),$$

идентичное с уравнением Лэнгмюра. Было показано [64, 308], что простое допущение о том, что константы диссоциации для реакций между молекулами антитела и различными активными центрами антигена равны между собой, приводит непосредственно к уравнению Лэнгмюра. Этот вопрос подробно рассматривал Клотц (т. II, гл. V).

Таблица 51

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ ДОБАВЛЕННЫМ АНТИГЕНОМ (БРУЦЕЛЛА), ОСАЖДЕННЫМИ АНТИГЕНОМ И АНТИТЕЛОМ И СОСТАВОМ ОСАДКА [351] СРАВНИТЕЛЬНО С РЕЗУЛЬТАТАМИ, ВЫЧИСЛЕННЫМИ ИЗ РАЗНЫХ УРАВНЕНИЙ

Для вычисления количества осажденного антитела применялись следующие уравнения:

$R = 1{,}325 - 0{,}714\ G_a$ [306, 306a], (1)

$R = 1{,}58 - 0{,}968\ G_a^{1/2}$ [306], (2)

$R = 14{,}84\ p/(1 + 957\ p)$ [287, 309], (3)

$R = 1{,}57\ p^{0{,}31}$ [286]. (4)

В этих уравнениях R—отношение веса антитела к весу антигена в осадке, G_a—количество добавленного антигена, p—концентрация неосажденного антитела; Σx^2—сумма квадратов отклонений от наблюдаемых величин.

Все значения в таблице выражены в миллиграммах

Добавленный антиген	Осажденный антиген	Осажденное антитело (наблюдаемое значение)	«Свободное антитело» (p)	Осажденное антитело				Антитело: антиген в осадке (R)
				уравнение (1)	уравнение (2)	уравнение (3)	уравнение (4)	
0,05	Полностью	0,066	0,557	0,064	0,068	0,066	0,066	1,32
0,10	То же	0,128	0,495	0,125	0,127	0,128	0,127	1,28
0,15	» »	0,175	0,448	0,182	0,180	0,189	0,184	1,16
0,20	» »	0,229	0,394	0,236	0,229	0,244	0,236	1,14
0,30	» »	0,324	0,299	0,333	0,318	0,324	0,324	1,08
0,50	0,338	0,362	0,261	0,367	0,349	0,375	0,352	1,06
0,70	0,616	0,506	0,117	0,545	0,505	0,505	0,498	0,82
1,00	0,946	0,575	0,048	0,614	0,605	0,464	0,576	0,61
1,20	0,998	0,580	0,043	0,611	0,612	0,449	0,579	0,58
Σx^2	—	—	—	4,428	2,156	29,991	0,297	—

Гершей пришел к выводу, что даже в том случае, если образовавшееся вначале соединение затем агрегируется с образованием

осадка, исходное равновесие заметно не нарушается и это уравнение остается в силе. Аналогичное уравнение он получил для области избытка антигена.

Уравнения такого типа больше соответствуют характерной линейной зависимости между количественным отношением антитела и антигена в осадке и концентрацией антитела (или концентрацией антигена в области избытка антигена) в растворе над осадком, показанной на рис. 57 и 58.

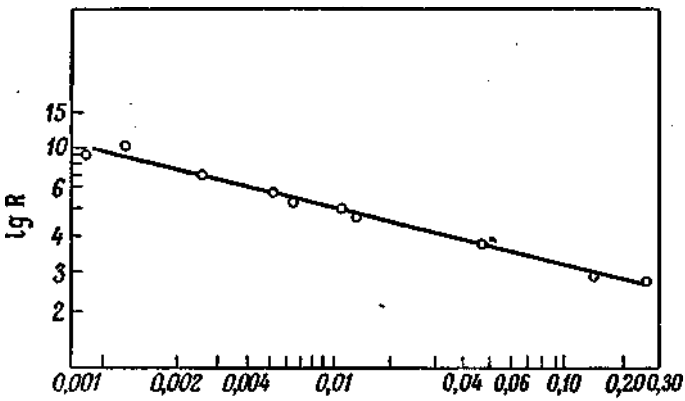


Рис. 57. Линейное соотношение между lg R (отношение азота антитела к азоту антигена в соединении) и логарифмом количества свободного антитела в надосадочной жидкости (область избытка антитела) [64].

Гош [309] вывел уравнение для реакций антитело—антиген, алгебраически также идентичное с уравнением Лэнгмюра [287]. Предпосылки Гершея помогают объяснить применимость «адсорбционных» уравнений, особенно уравнения Лэнгмюра, к результатам количественного анализа осадков.

Паулинг с сотрудниками [92] предложил разобрать гораздо более простой случай. Они рассматривают две реакции:

$$A + G \rightleftarrows AG \quad \text{с константой равновесия } 4k,$$
$$AG + G \rightleftarrows AG_2 \quad » \quad » \quad k.$$

Предполагая, что AG нерастворимо, а AG_2 растворимо, и постулируя, что прочность связей в G—A—G та же, что и в A—G, а константы равновесия отличаются только энтропийным фактором 4, они получили уравнение

$$AG_{\text{осадок}} = G - s - \frac{1 + 2ks}{2 + 2ks}\{G - A + [s(1 + ks)/k + (G - A)^2]^{1/2}\},$$

где AG—количество осадка, A и G—общие количества (на единицу объема) антитела и антигена, а s—растворимость осадка. Паулинг нашел, что это уравнение хорошо согласуется с результатами, полученными им для простых гаптенов, но не приложимо к случаям антител и белковых антигенов.

Теорелл [292] вывел уравнение для реакции антитело—антиген, предположив, что реакция обратима и протекает по стадиям

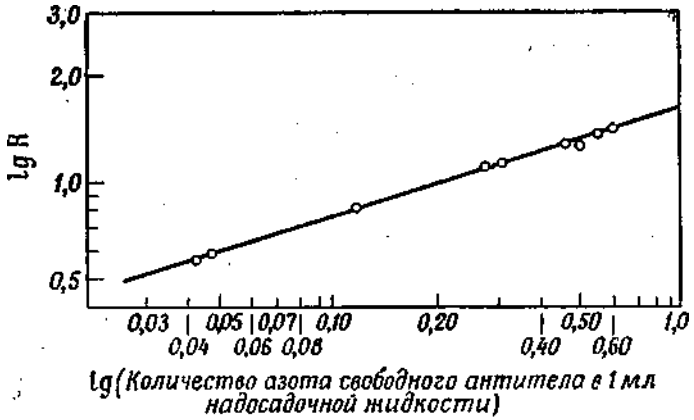


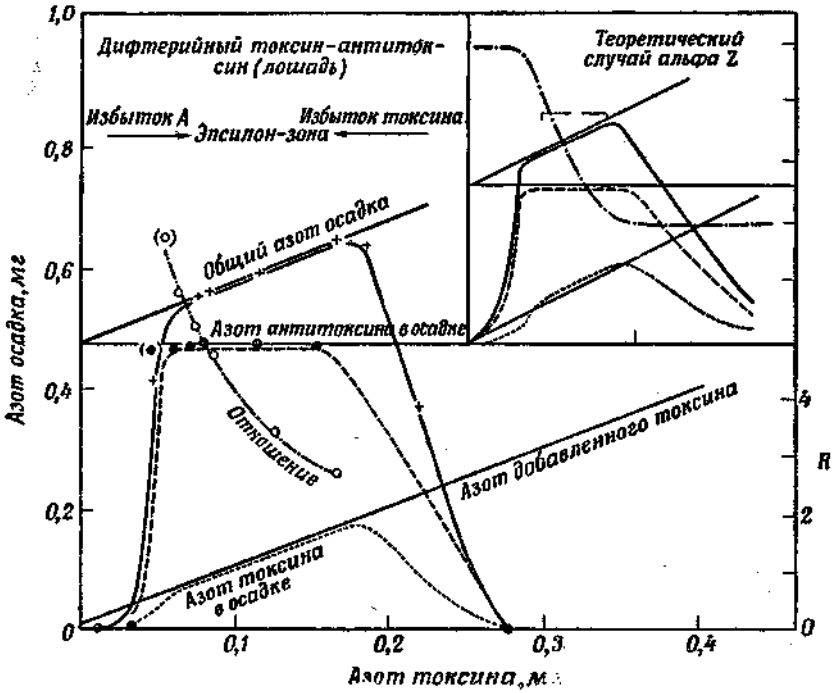
Рис. 58. Линейное соотношение между lg R (отношение азота антитела к азоту антигена в соединении) и логарифмом количества свободного антигена в надосадочной жидкости (область избытка антигена).

с образованием определенных соединений и что к ней, таким образом, применим закон действующих масс (см. стр. 545). Рассуждения в основном идентичны со случаем диссоциации слабой многоосновной кислоты. Принимается, что антитело ведет себя как одновалентное соединение. Теорелл получил уравнение

$$(A) = A - (G)(p_1 + p_2 + \ldots),$$

где (A)—концентрация свободного антитела в надосадочной жидкости; A—общее количество добавленного антитела; (G)—концентрация свободного антигена в надосадочной жидкости; p_1, p_2 и т. д.—значения $(A)/k_n$, $(A)/k_n \cdot k_{n-1}$ и т. д., в которых k_n, k_{n-1}—различные константы равновесия. Большое количество расчетов, проведенных по этому уравнению, если принять допустимые значения для растворимости и валентности антигена, показали очень хорошее совпадение с экспериментальными данными. Уравнение Теорелла является единственным, которое позволяет описать достаточно точно весь процесс реакции преципитации даже в случае антител типа H. Пример приведен на рис. 59.

Моралес, Боттс и Хилл [310], принимая антиген поливалентным и антитело одновалентным, на основании соответствующих статистических методов вывели определенные соотношения между измеряемыми концентрациями реагентов и константой диссоциации, характеризующей равновесие. Было высказано предположение, что



Р и с. 59. Удачные результаты, полученные при применении уравнения Теорелла ко всей области реакции преципитации, включая зону эквивалентности и зоны избытка антитела и антигена. Выбранный пример (антитоксин лошади) нельзя описать при помощи других уравнений [292].

следует учитывать некоторые явления, которыми обычно пренебрегают, например взаимодействие между смежными молекулами антитела на одной и той же молекуле антигена.

Во всех этих математических выводах оказалось удобным игнорировать известный факт гетерогенности антител, находящихся в иммунной сыворотке.

Гольдберг [311] применил к системам антиген—антитело метод расчета наиболее вероятного распределения частиц различных видов, который был использован Флори [312] и Штокмейером [313] для изучения распределения молекул по величине в разветвленных полимерах. Этот метод настолько хорошо обоснован математи-

чески и данные теории Гольдберга так удовлетворительно согласуются с экспериментом, что ее следует рассмотреть более подробно.

Предполагается, что антитело двухвалентно, а антиген поливалентен, хотя не исключается и существование некоторого количества одновалентных антител.

Принимается также, что антитело и антиген соединяются с образованием цепей и разветвленных структур, пока система не достигнет «критической точки», при которой содержащиеся в ней преимущественно мелкие агрегаты соединяются с образованием небольшого числа очень крупных агрегатов и начинается преципитация.

Гольдберг учитывает также влияние различий в растворимости между антителами лошади и кролика, которое было отмечено Бойдом [200], но не учитывалось в большинстве других количественных теорий реакции преципитации.

Было высказано предположение о невозможности реакций между агрегатами, которые приводят к образованию циклических структур с определенным числом связей в агрегате данного размера. Предполагалось также, что любой нереагирующий центр так же реакционноспособен, как и другой центр, независимо от размеров или формы агрегата, в состав которого он входит. Эти допущения необходимы для упрощения математической обработки; при этом предполагалось, что они не вносят каких-либо значительных ошибок.

На основании сделанных допущений Гольдберг нашел, что m_{ijk} (число агрегатов, каждый из которых состоит из i двухвалентных молекул антитела, j одновалентных молекул антитела и k молекул антигена) должно быть равно

$$m_{ijk} = fG \frac{(fk-k)!}{(fk-2k+2-q-j)!\,k!\,q!\,j!} r^{k-1}\rho^{k+i-1} \times$$

$$\times p^{k+i+j-1} (1-p)^{fk-k-i-j+1} (1-\rho pr)^{i-k+1} (1-\rho),$$

где $$i = k-1+q, \quad 0 \leqslant q+j \leqslant fk-2k+2;$$

G—число молекул антигена в системе; f—число эффективных реакционных центров (валентность) каждой молекулы антигена; q—число свободных центров антитела на агрегате; p—число антигенных центров в системе, вступивших в реакцию (которое называют также глубиной реакции); ρ—часть центров на антителе в системе, которые принадлежат двухвалентным молекулам антитела; $r=fG/2A$, где A—число молекул антитела в системе с двумя активными центрами (двухвалентные антитела); $s=fG/D$, где D—число молекул антигена с одним активным центром.

Это выражение позволяет определить число агрегатов любого рода в системе, содержащей свободные антитело и антиген, если известны исходный состав системы, валентность антигена и глубина протекания реакции.

Глубина протекания реакции, при которой вещество переходит в форму очень больших агрегатов, зависит от валентности антигена и исходного состава системы.

Теория Гольдберга имеет ряд преимуществ по сравнению с рассмотренными выше теориями. Она не содержит произвольных параметров для построения кривой. Вычисленные количественные отношения антитело—антиген находятся в соответствии с экспериментальными данными для системы любого состава. Она применима к системам, состав которых изменяется с изменением содержания антитела. Теория дает метод определения пределов ингибирования при избытке антигена или антитела.

Два примера соответствия теории с экспериментальными данными приведены в табл. 52 [311] и 53 [311]. Количественное отношение антитело—антиген (в молях) в осадке (R) для систем с различными исходными отношениями антитела к антигену сравнивается с отношением i/k для максимальной глубины реакции и критической точки. Гольдберг показал, что экспериментальное значение R должно находиться между соответствующими значениями i/k. В целом совпадение вполне удовлетворительное.

Уравнение Гольдберга позволяет удовлетворительно предсказывать состав комплексов антитело—антиген в области избытка антигена (см. рис. 49).

5. КОМПЛЕМЕНТ И СВЯЗЫВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТА

Комплементом называется совокупность веществ, необходимых для явлений лизиса, наблюдаемых в некоторых серологических реакциях; их можно разделить на четыре различных компонента в зависимости от чувствительности к действию различных реагентов. Компонент, обозначаемый через C_1' (который называют также «средней частью»*), нерастворим в воде, не содержащей электролитов, разлагается при нагревании в растворе до 56° в течение 30 мин. и адсорбируется на фосфате свинца и двуокиси титана [316]. Фракция C_2' («концевая часть») растворима в чистой воде, также инактивируется при нагревании до 56° в течение 30 мин. и адсорбируется на каолине и окиси магния (как и C_1'). Клетки дрожжей адсорбируют еще и третий компонент комплемента—C_3'. Этот компонент устойчив к нагреванию приблизительно до 63°. Компонент C_4', относительно устойчивый к нагреванию, не адсорбируется дрожжами, но инактивируется при обработке аммиаком [317].

Все эти компоненты комплемента обычно находятся в сыворотке морской свинки, которая является их основным источником, частично потому, что морские свинки всегда имеются в серологических лабораториях, а также больше потому, что сыворотка морской

* Данную терминологию для компонентов комплемента предложили Гейдельбергер [314] и Пиллимер и Эккер [315].

Таблица 52

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ОТНОШЕНИЯ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН ЛОШАДИ—АЛЬБУМИН АНТИСЫВОРОТКИ КРОЛИКА В ОСАДКАХ

i/k—отношение молекул антитела и антигена; индекс «макс.» относится к максимальному отношению;
c—критическое отношение, при котором (и ниже которого) небольшие агрегаты исчезают из системы

A/G	R	$(i/k)_{макс.}$	$(i/k)\,c$
17	6,0	6,0	5,3
11	5,6	6,0	4,3
8,2	5,1	6,0	3,8
5,1	4,0	4,7	3,0
4,4	3,6	3,8	2,8
4,1	3,3	3,5	2,7
3,6	3,1	3,1	2,5
3,3	2,9	2,8	2,4

Таблица 53

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ОТНОШЕНИЯ ДИФТЕРИЙНЫЙ ТОКСИН—АНТИТОКСИН ЛОШАДИ В ОСАДКАХ

i/k—отношение молекул антитела и антигена; индекс «макс.» относится к максимальному отношению;
c—критическое отношение, при котором (и ниже которого) небольшие агрегаты исчезают из системы

A/G	R	$(i/k)_{макс.}$	$(i/k)\,c$
2,9	2,7	2,5	2,2
2,6	2,4	2,2	2,1
2,3	2,1	2,0	2,0
1,7	1,6	1,6	1,7
1,3	1,2	1,2	1,5

свинки отличается относительно большей активностью комплемента по сравнению с некоторыми другими сыворотками. Например, сыворотка лошади относительно бедна комплементом (гемолитическим) для большинства систем антитело—антиген [318], так же как и сыворотка слона [319]. Сыворотка человека занимает промежуточное положение. У одной расы морских свинок наблюдалась наследственная недостаточность C'_3.

Пиллимеру с сотрудниками [320] удалось получить C'_1, C'_2 и C'_4 в чистом виде в качестве вполне определенных белков путем фракционированного осаждения сыворотки морской свинки сульфатом аммония и диализом. Было показано, что C'_1 является глобулиноподобным белком с константой седиментации s_{20}, равной 6,4, и изоэлектрической точкой 5,2—5,4. Он разрушается при нагревании до 50° за 30 мин. C'_2 и C'_4 были получены вместе в виде довольно чистого мукопротеина с содержанием углевода 10,3%; его изоэлектрическая точка 6,3—6,4. Таким образом, оба типа комплемента могут находиться в одной и той же молекуле. Активность компонента C'_2 исчезает при нагревании до 50° в течение 30 мин., а активность компонента C'_4—при нагревании до 66° в течение 30 мин. Активность C'_3 была обнаружена во всех глобулиновых фракциях и даже частично в фракции альбуминов. Можно предполагать, что он представляет собой фосфолипид фосфопротеида.

C'_1 составляет 0,72% от общего количества белков сыворотки, а мукопротеид, содержащий компоненты C'_2 и C'_4,—0,17% от общего количества белков сыворотки морской свинки.

А. Связывание комплемента

Можно показать, что при добавлении к смеси, в которой протекала реакция между антителом и антигеном, другой системы (например, эритроцитов в соединении с гемолитическим антителом), требующей для своего завершения комплемента, комплемент включается в первую реакцию антитело—антиген после образования соединения антитело—антиген. Ни антиген, ни антитело в обычных условиях не обладают способностью соединяться с компонентами комплемента.

Б. Количественное определение комплемента

Обычные испытания на связывание комплемента, например проба Вассерманна на сифилис, достаточно сложны и здесь описываться не будут. Методика пробы Вассерманна сводится к количественному титрованию второго применяемого антитела (гемолиз), комплемента в присутствии гемолизина и сенсибилизированных эритроцитов, титрованию «антигена» Вассерманна и предварительному определению оптимальных соотношений для смешения сифилитической сыворотки и «антигена» для оптимального связывания ком-

племента. Эти определения, будучи полуколичественными, не дают представления о действительных количествах белкового комплемента или о количествах различных применяемых компонентов.

Гейдельбергер [314, 321] разработал количественную методику, при помощи которой можно определять фактические количества комплемента, принимающего участие в серологических реакциях. Применяя точные методы определения азота, ему удалось показать, что если комплемент связывается с осадком из антитела и антигена, то появляется избыточный азот. Было определено, что 1000 «гемолитических единиц» соответствует 0,10—0,14 *мг* азота комплемента. «Гемолитическая единица» определяется как количество комплемента, достаточное для гемолиза 0,2 *мл* минимально сенсибилизированной (т. е. соединенной с минимальным количеством гемолизина, который еще может вызывать гемолиз) 2—2,5-процентной суспензии эритроцитов овцы. Был сделан вывод, что обычная сыворотка морской свинки, содержащая 200—250 единиц, имеет около 0,04—0,06 *мг* азота комплемента на 1 $см^3$. Гауровитц и Иенсон [322] рассчитали, что для гемолиза одного эритроцита требуется $1{,}5 \cdot 10^{-14}$ *г* комплемента.

Интерпретация гемолитических титров в связи с результатами опытов по связыванию комплемента затрудняется, однако, тем обстоятельством, что каждый из четырех компонентов комплемента может принимать участие в реакции гемолиза, хотя количества различных компонентов не одинаковы. Гемолитический титр источника комплемента определяется компонентом с наименьшим титром. Титр комплемента морской свинки определяется содержанием C_3' [209], хотя этот компонент только частично удаляется из сыворотки морской свинки в процессе связывания. С другой стороны, в сыворотке свиньи содержится C_3' в 10 раз больше, чем в сыворотках человека и морской свинки. Применяя эти последние сыворотки, Гейдельбергер с сотрудниками [323] пытался количественно титровать C_2' в смесях, в которых это вещество содержалось в меньших количествах, чем другие компоненты. Обычно сыворотки человека и морской свинки содержат больше чем достаточно C_1' и C_2' по отношению к C_3'. Если применяются смеси, в которых содержание C_2' является наименьшим по сравнению с другими компонентами, то получаются результаты, показывающие, что увеличение гемолитического эффекта связано не только с увеличением количеств C_2', но зависит также в некоторой степени от количества находящегося в смеси компонента C_3'. Таким образом, оба компонента в некоторой степени производят одинаковое действие.

В. Теория связывания комплемента

Поскольку комплемент адсорбируется различными специальными веществами, то вначале предполагалось, что связывание компле-

мента является в основном адсорбционным процессом и зависит в значительной степени от размеров агрегатов антитело—антиген. Голсуорси [324] нашел, что максимум связывания комплемента в смеси антитело—антиген не наблюдается сразу при смешении двух реагентов, но, по-видимому, связывание идет до тех пор, пока агрегаты не достигнут определенного максимального размера. Гейдельбергер с сотрудниками [325] наблюдал, что заново суспендированные тонкоизмельченные специфические осадки адсорбируют комплемент из сыворотки морской свинки почти так же, как осадки, образующиеся в присутствии комплемента. Гемблтон [326] установил, что бациллы туберкулеза при добавлении хлоридов кальция и магния могут интенсивно связывать комплемент даже в отсутствие антител. Отсюда можно сделать вывод, что адсорбция на поверхности агрегатов играет важную роль при связывании комплемента.

Гейдельбергер, Вейл и Треффёрс [327] предложили, однако, гипотезу связывания комплемента, согласно которой поверхностная адсорбция не играет никакой роли. Эти авторы полагают, что молекулы комплемента имеют связующие группы, способные давать диссоциирующие соединения с антителом, слишком легко диссоциирующие, чтобы давать прочные соединения только с молекулами антигена. Возможно, что они способны образовывать непрочные, легко диссоциирующие соединения и с молекулами антигена. Предполагают, что эти связи упрочняются при образовании агрегатов антитело—антиген, и молекулы комплемента постепенно окружаются молекулами антитела и антигена. Однако эта гипотеза не предполагает, что молекулы комплемента просто внедряются внутрь агрегата антитело—антиген. Гейдельбергер, Вейл и Трефферс [327] высказали предположение, что стабилизация исходных слабых связей с комплементом «может быть обусловлена силами притяжения близких ионизированных группировок противоположного знака, образованием водородных связей, пространственной аккомодацией больших группировок C_1' (связующий компонент комплемента) и А (антитело) или присутствием на C_1' как и на антигене и антителе нескольких группировок, способных взаимодействовать с молекулами А, расположенных против них». Они сделали интересное допущение, что подобная связь может быть в отсутствие комплекса антитело—антиген и даже в отсутствие нормального глобулина, если можно привести достаточное число молекул C_1' в соответствующее положение и удерживать их в этом положении. Таким образом, установление антикомплементарной способности (т. е. способности связывать комплемент) у очищенного нормального γ-глобулина [328] является наиболее удачным методом проверки правильности этого допущения.

Боумен, Мейер и Рапп [329] показали, что соединение эритроцитов с антителом является обратимым и что, после того как ком-

племент вызвал лизис эритроцитов, антитела могут быть переведены из комплекса антитело—строма к свежим клеткам, и, таким образом, молекулы антитела могут многократно проводить гемолитическую работу (при наличии достаточного количества комплемента). Это означает, что кинетическое поведение антител имеет каталитический характер. Боумен, Мейер и Рапп склонны считать, что иммунный гемолиз действительно представляет каталитический процесс, в котором антитела действуют, подобно ферменту, в то время как комплемент является реагентом, вступающим в реакцию. Севаг [330] в интересной книге «Иммунокатализ» несколько лет назад указал на аналогию между действием фермента и реакциями антитело—антиген, хотя он учитывал главным образом сходство между ферментами и антигенами. Гауровитц [20] считает, что если игнорируются случаи иммунизации ферментами получения антител, которые могут или не могут нейтрализовать ферменты (см. стр. 503), то нет оснований приписывать антигенам ферментативные свойства. Детерминантные группы конъюгированных антигенов (стр. 491) определенно лишены ферментативной активности. Наиболее характерным критерием катализатора является снижение энергии активации катализируемой реакции, для действия же антигена подобный эффект неизвестен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muir R., Browning C., J. Hyg., **6**, 20, 1906.
2. Bordet J., Gay F., Ann. Inst. Pasteur, **20**, 467, 1906.
3. Bordet J., Streng O., Zentr. Bakt. Parasitenk. (Abt. Orig.), **49**, 260, 1909.
4. Hole N. H., Coombs R. R. A., J. Hyg., **45**, 480, 1947.
5. Wiener A. S., Am. J. Clin. Path., **15**, 106, 1945.
6. Dean H. R., J. Hyg., **12**, 259, 1912.
7. Diamond L., Denton R., J. Lab. Clin. Med., **30**, 821, 1945.
8. Flick J. A., Villafañe A. L., J. Immunol., **68**, 41, 1952.
9. Portier P., Richet C., Compt. rend. soc. biol., **54**, 170, 1902.
10. Ehrlich P., Deut. med. Wochschr., **17**, 976, 1891.
11. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., **24**, 141, 1933.
12. Wells H. G., The Chemical Aspects of Immunity, Chemical Catalog Co., New York, 1925.
13. Lewis J. H., J. Infectious Diseases, **55**, 168, 1934.
14. Markin L., Kyes P., J. Infectious Diseases, **65**, 156, 1939.
15. Boyd W. C., Malkiel S., J. Infectious Diseases, **75**, 262, 1944.
16. Гауровитц Ф., Химия и биология белков, Издатинлит, М., 1953.
17. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., **26**, 469, 1934.
18. Tuft L., Clinical Allergy, Saunders W. B., Philadelphia, 1938.
19. Lowell F. C., J. Clin. Invest., **23**, 225, 233, 1944.
20. Haurowitz F., Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., **27**, 247, 1952.
21. Obermayer F., Pick E. P., Wien. klin. Wochschr., **17**, 265, 1904.
22. Wells H. G., The Chemical Aspects of Immunity, 2nd ed., Chemical Catalog Co., New York, 1929.
23. Ten Broeck C., J. Biol. Chem., **17**, 369, 1914.
24. Дюбо Р. Ж., Бактериальная клетка в связи с проблемами вирулентности, иммунитета и химиотерапии, Издатинлит, М., 1948.

25. Boyd W. C., unpublished experiments, 1952.
26. Wetter L. R., Deutsch H. F., Arch. Biochem., 28, 399, 1950.
27. Prudhomme R. O., Grabar P., Bull. soc. chim. biol., 29, 122, 1947.
28. Campbell D. H., Bulman N., Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 9, 443, 1952.
29. Landsteiner K., Barron C., Z. Immunitätsforsch., 26, 142, 1917.
30. Johnson L. R., Wormall A., Biochem. J., 26, 1202, 1932.
31. Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, Harvard University Press, Cambridge, 1945.
32. Neurath H., J. Am. Chem. Soc., 65, 2039, 1943.
33. Clutton R. F., Harington C. R., Yuill M. E., Biochem. J., 32, 1111, 1938.
34. Landsteiner K., J. Exptl. Med., 75, 269, 1942.
35. Marrack J. R., The Chemistry of Antigens and Antibodies, Med. Res. Council, Special Report Series, No. 230, London, 1938.
36. Kleczkowski A., Brit. J. Exptl. Path., 26, 41, 1945.
37. Pressman D., Sternberger L., J. Immunol., 66, 609, 1951.
38. Porter R. R., Biochem. J., 46, 473, 1950.
39. Spiegel-Adolph M., Biochem. Z., 170, 126, 1926.
40. Haurowitz F., Bursa F., Rev. faculté sci. univ. Istanbul, B10, 283, 1945.
41. Erickson J. O., Neurath H., J. Exptl. Med., 78, 1, 1943.
42. Miller B. F., J. Exptl. Med., 58, 625, 1933.
43. Heidelberger M., Maurer P. H., J. Am. Chem. Soc., 73, 2070, 1951.
44. Heidelberger M., Maurer P. H., Moore D. H., J. Am. Chem. Soc., 73, 2072, 1951.
45. Heidelberger M., Maurer P. H., J. Am. Chem. Soc., 73, 2076, 1951.
46. Astbury W. T., Dickenson S., Bailey K., Biochem. J., 29, 2351, 1935.
47. Blumenthal D., J. Biol. Chem., 113, 433, 1936.
48. Lewis J. H., J. Infectious Diseases, 55, 203, 1934.
49. Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., Nature, 159, 807, 1947.
50. Eeg-Larsen N., Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., Arch. Biochem., 19, 340, 1948.
51. Ottesen M., Wollenberger A., Nature, 170, 801, 1952.
52. Kaminski M., Grabar P., Bull. soc. chim. biol., 31, 684, 1949.
53. Jacobs S. L., Sommers S. C., J. Immunol., 36, 531, 1939.
54. Hewitt L. F., Biochem. J., 24, 983, 1930.
55. Goldie H., Compt. rend. soc. biol., 126, 974, 977, 1937.
56. Pappenheimer A. M., J. Biol. Chem., 125, 201, 1938.
57. Eaton M. D., Bact. Revs., 2, 3, 1938.
58. Medveczky A., Uhrovits A., Z. Immunitätsforsch., 72, 256, 1931.
59. Gaunt W. E., Wormall A., Biochem. J., 33, 908, 1938.
60. Mutsaars W., Ann. inst. Pasteur, 62, 81, 1939.
61. Wormall A., J. Exptl. Med., 51, 295, 1930.
62. Snapper I., Grunbaum A., Brit. J. Exptl. Path., 17, 361, 1936.
63. Butement F. D. S., Nature, 161, 731, 1948; J. Chem. Soc., 1949, 408; Eisen H. M., Keston A. G., J. Immunol., 63, 71, 1949; Knox W. C., Endicott F. C., J. Immunol., 65, 532, 1950.
64. Бойд В., Основы иммунологии, Издатинлит, М., 1949.
65. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., 25, 61, 1933.
66. Philpot J. St. L., Small P. A., Biochem. J., 32, 542, 1938; Morel A., Siley P., Bull. Soc. chim. [4], 43, 881, 1928; Herriott R. M., Advances in Protein Chem., 4, 169, 1947.

67. Landsteiner K., Prášek E., Z. Immunitätsforsch., 20, 211, 1913.
68. Mutsaars W., Compt. rend. soc. biol., 129, 510, 511, 1938.
69. Berenblum I., Wormall A., Biochem. J., 33, 75, 1939.
70. Hopkins S. J., Wormall A., Biochem. J., 27, 740, 1706, 1933.
71. Fujio O., J. Biochem. (Japan), 33, 241, 1941.
72. Wetter L. R., Deutsch H. F., Arch. Biochem., 28, 122, 1950.
73. Grabar P., Kaminski M., Bull. soc. chim. biol., 32, 620, 1950.
74. Malkiel S., J. Immunol., 57, 51, 1947.
75. Pillemer L., Ecker E. E., Martiensen E. W., J. Exptl. Med., 69, 191, 1939.
76. Clutton R. F., Harington C. R., Mead T. H., Biochem. J., 31, 764, 1937.
77. Haurowitz F., J. Immunol., 43, 331, 1942.
78. Landsteiner K., van der Scheer J., J. Exptl. Med., 45, 1045, 1927.
79. Pauling L., Pressman D., J. Am. Chem. Soc., 67, 1003, 1945.
80. Landsteiner K., van der Scheer J., J. Exptl. Med., 48, 315, 1928.
81. Goebel W. F., Avery O. T., J. Exptl. Med., 50, 521, 533, 1929.
82. Goebel W. F., Avery O. T., Babers F. H., J. Exptl. Med., 60, 598, 1934.
83. Goebel W. F., J. Exptl. Med., 64, 29, 1936.
84. Erlenmeyer H., Berger E., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 177, 116, 1935.
85. Landsteiner K., Pirie N. W., J. Immunol., 33, 265, 1937.
86. Berger E., Schweiz. med. Wochschr., 17, 1309, 1936.
87. Harte R. A., J. Immunol., 34, 433, 1938.
88. Creech H. J., Franks W. R., Am. J. Cancer, 30, 555, 1937.
89. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., 38, 479, 1940.
90. Gerber I. E., Gross M., J. Immunol., 48, 103, 1944.
91. Wedum A. G., J. Infectious Diseases, 70, 173, 1942.
92. Pauling L., Pressman D., Campbell D. H., Ikeda C., Ikawa M., J. Am. Chem. Soc., 64, 2994, 1942; Pauling L., Pressman D., Campbell D. H., Ikeda C., J. Am. Chem. Soc., 64, 3003, 1942; Pauling L., Pressman D., Ikeda C., J. Am. Chem. Soc., 64, 3010, 1942; Pressman D., Brown D. H., Pauling L., J. Am. Chem. Soc., 64, 3015, 1942; Pressman D., Maynard J. T., Grossberg A. L., Pauling L., J. Am. Chem. Soc., 65, 728, 1943; Pauling L., Pressman D., Grossberg A. L., J. Am. Chem. Soc., 66, 784, 1944; Pauling L., Pressman D., J. Am. Chem. Soc., 67, 1003, 1945.
93. Boyd W. C., Behnke J., Science, 100, 13, 1944.
94. Pardee A. B., Swingle S. M., J. Am. Chem. Soc., 71, 148, 1949.
95. Pauling L., Pressman D., Swingle S. M., Grossberg A. L., J. Am. Chem. Soc., 66, 1731, 1944.
96. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., 42, 419, 1941.
97. Karush F., J. Am. Chem. Soc., 72, 2705, 1950.
98. Pardee A. B., Pauling L., J. Am. Chem. Soc., 71, 143, 1949.
99. Marrack J. R., Ann. Repts. on Progress Chem. (Chem. Soc. London), 48, 249, 1951.
100. Eisen W., Karush F., J. Am. Chem. Soc., 71, 363, 1949.
101. Campbell D. H., Blaker R. H., Pardee A. B., J. Am. Chem. Soc., 70, 2496, 1948.
102. Pressman D., Siegal M., J. Am. Chem. Soc., 75, 686, 1953.
103. Boyd W. C., Hooker S. B., J. Gen. Physiol., 22, 281, 1939.
104. Boyd W. C., unpublished experiments, 1942.

105. Nuttall G. H., Blood Immunity and Blood Relationship, Cambridge, 1904.
106. Reichert E. T., Brown A. P., Carnegie Inst. Wash. Pub., No. 116, 1909.
107. Heidelberger M., Landsteiner K., J. Exptl. Med., 38, 561, 1923.
108. Neel J. V. et al., Science, 118, 116, 1953.
109. Beaven G. H., Hoch H., Holiday E. R., Biochem. J., 49, 374, 1951.
110. Neel J. V., Itano H. A., Trans. Assoc. Am. Physicians, 45, 203, 1952.
111. Ranney H., in press.
112. Slotter K. H., Fraenkel-Conrat H. L., Ber., 71B, 1076, 1938.
113. Grälen N., Svedberg T., Biochem. J., 32, 1375, 1938.
114. Heidelberger M., Kabat E. A., J. Exptl. Med., 63, 737, 1936.
115. Doerr R., Russ V. K., Z. Immunitätsforsch., 3, 181, 1909.
116. Chow B. F., Lee K. H., Wu H., Chinese J. Physiol., 11, 139, 1937.
117. Cole A. G., Arch. Path., 26, 96, 1938.
118. Goodner K., Horsfall F. L., J. Exptl. Med., 66, 413, 425, 437, 1937.
119. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., 61, 559, 1935.
120. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., 30, 41, 1936.
121. Landsteiner K., van der Scheer J., J. Exptl. Med., 63, 325, 1936.
122. Wells H. G., Lewis J. H., Jones D. B., J. Infectious Diseases, 40, 326, 1927.
123. Wells H. G., Osborne T. S., Infectious Diseases, 12, 341, 1913.
124. Calmette A., Ann. inst. Pasteur, 9, 225, 1895.
125. Morgenroth J., Berlin klin. Wochstr., 42, 1550, 1905.
126. Wassermann A., Z. Hyg. Infektionskrankh., 22, 263, 1896.
127. Salaman M. H., Proc. Intern. Congr. Microbiol., 3rd Congr., New York, 356, 1940.
128. Kubowitz F., Ott P., Biochem. Z., 314, 94, 1943; Zamecnik P. C., Lipman F., J. Exptl. Med., 85, 395, 1947; McCarty M., J. Gen. Physiol., 29, 123, 1946; Macfarlane M. G., Knight B. C., Biochem. J., 35, 884, 1941; Krebs E. G., Wright R. R., J. Biol. Chem., 192, 555, 1951.
129. Krebs E. G., Najjar V. A., J. Exptl. Med., 88, 569, 1948.
130. Kirk J. S., Sumner J. B., J. Immunol., 25, 495, 1934; Campbell D. H., Fourt L., J. Biol. Chem., 385, 1939; Smolens J., Sevag M. G., J. Gen. Physiol., 26, 11, 1942; Adams M., J. Exptl. Med., 76, 175, 1942.
131. Heidelberger M., Treffers H. P., Mayer M., J. Exptl. Med., 71, 271, 1940.
132. Horsfall F. L., Goodner K., J. Immunol., 31, 135, 1936.
133. Coca A. F., Kelly M. F., J. Immunol., 6, 87, 1921.
134. Diamond L. K., cited in Race R. R., Sanger R., Blood Groups in Man, Oxford Univ. Press, London, 1950.
135. Race R. R., Nature, 153, 771, 1944.
136. Wiener A. S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 56, 173, 1944.
137. Pappenheimer A. M., J. Exptl. Med., 71, 263, 1940.
138. Coombs R. R. A., Mourant A. E., Race R. R., Brit. J. Exptl. Path., 26, 255, 1945.
139. Kleczkowsski A., Brit. J. Exptl. Path., 22, 192, 1941.
140. Boyd W. C., J. Exptl. Med., 83, 401, 1946.
141. Hill J. M., Haberman S., Guy R., J. Clin. Path., 19, 134, 1949.

142. Krüpe M., Powilleit E., Z. Hyg. Infektionskrankh., **134**, 198, 1952.
143. Erickson J. O., Neurath H., J. Gen. Physiol., **28**, 415, 1945.
144. Coca A. F., Essentials of Immunology for Medical Students, Williams & Wilkins, Baltimore, 1925.
145. Kabat E. A., Landow H., J. Immunol., **44**, 69, 1942.
146. Kuhns W. J., Pappenheimer A. M., J. Exptl. Med., **95**, 375, 1952.
147. Vaughan J. H., Kabat E. A., J. Exptl. Med., **97**, 821, 1953.
148. Denys J., Leclef J., La Cellule, **11**, 177, 1895.
149. Gordon J., Whitehead H. R., Wormall A., J. Path. Bact., **32**, 57, 1929.
150. Gordon J., Thomson F. C., Brit. J. Exptl. Path., **16**, 101, 1935.
151. Zinnser H., Cary E. G., J. Exptl. Med., **19**, 345, 1914.
152. Ramon G., Lemétayer E., Rev. immunol., **1**, 209, 1935.
153. Wiener A. S., J. Immunol., **66**, 287, 1951.
154. Furuhata T., Japan Med. World, **7**, 197, 1924.
155. Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y., Wurmser R., J. Chimie Physique, **47**, 419, 1950.
156. Bird G. W. G., Indian J. Med. Res., **40**, 289, 1952.
157. Cazal P., Lalaurie M., Acta Haematol., **8**, 73, 1952.
158. Koulumies R., Ann. Med. Exptl. et Biol. Fenniae (Helsinki), **27**, 185, 1949.
159. Krüpe M., Z. Immunitätsforsch., **107**, 450, 1950.
160. Krüpe M., Braun C., Naturwiss., **39**, 284, 1952.
161. Renkonen K. O., Ann. Med. Exptl. Biol. Fenn., **26**, 66, 1948.
162. Boyd W. C., J. Immunol., **65**, 281, 1950.
163. Boyd W. C., Reguera R. M., J. Immunol., **62**, 333, 1949.
164. Pauling L., J. Am. Chem. Soc., **62**, 2643, 1940.
165. Alexander J., Protoplasma, **14**, 296, 1932.
166. Mudd S., J. Immunol., **23**, 423, 1932.
167. Breinl F., Haurowitz F., Z. physiol. Chem., **192**, 45, 1930.
168. Bawden F. C., Kleczkowski A., Brit. J. Exptl. Path., **23**, 178, 1942.
169. Cohn E. J., McMeekin T. L., Oncley J. L., Newell J. M., Hughes W. L., J. Am. Chem. Soc., **62**, 3386, 1940.
170. Butement F. D. S., J. Chem. Soc., Suppl. **2**, 408, 1949.
171. Parfentjev I., Пат. США 2065196, 1936.
172. Williams J. W., Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, **7**, 270, 1950.
173. Pope C. G., Brit. J. Exptl. Path., **20**, 201, 1939.
174. Smith E., Greene B., J. Biol. Chem., **171**, 355, 1947.
175. Smith E. L., Jager B. V., Ann. Rev. Microbiol., **6**, 207, 1952.
176. Kabat E. A., Bezer A. E., J. Exptl. Med., **82**, 207, 1945.
177. Oncley J. L., Scatchard G., Brown A., J. Phys. Coll. Chem., **51**, 184, 1947.
178. Petermann M. L., Pappenheimer A. M., J. Phys. Chem., **45**, 1, 1941.
179. Svedberg T., Pedersen K. O., The Ultracentrifuge, Oxford Univ. Press, London, 1940.
180. Davis B. D., Moore D. H., Kabat E. A., Harris A., J. Immunol., **50**, 1, 1945.
181. Pappenheimer A. M., Lundgren H. P., Williams J. W., J. Exptl. Med., **71**, 247, 1940.
182. Fell N., Stern K. G., Coghill R. D., J. Immunol., **39**, 223, 1940.
183. Heidelberger M., Treffers H. P., Freund J., Federation Proc., **1**, 178, 1942.

184. Kabat E. A., J. Exptl. Med., 69, 103, 1939.
185. Paīc M. M., Bull. soc. chim. biol., 21, 412, 1939.
186. Kabat E. A., Mayer M. M., Experimental Immunochemistry, Thomas C. C., Springfield, 1948.
187. Filitti-Wurmser S., Aubel-Lesure G., Wurmser R., J. Chim. Phys., 50, 236, 1953.
188. Neurath H., J. Am. Chem. Soc., 61, 1841, 1939.
189. Girard P., Louran M., Compt. rend. soc. biol., 116, 1010, 1934.
190. Heidelberger M., Pedersen K. O., Tiselius A., Nature, 138, 165, 1936.
191. Tiselius A., Biochem. J., 31, 313, 1937.
192. Tiselius A., Kabat E. A., J. Exptl. Med., 69, 119, 1939.
193. Van der Scheer J., Lagsdin J. B., Wyckoff R. W. G., J. Immunol., 41, 209, 1941.
194. Kekwick R. A., Chem. Ind., 60, 486, 1941.
195. Kekwick R. A., Record B. R., Brit. J. Exptl. Path., 22, 29, 1941.
196. Seibert F. B., Nelson J. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49, 77, 1942.
197. Treffers H. P., Heidelberger M., Freund J., J. Exptl. Med., 86, 95, 1947.
198. Treffers H. P., Heidelberger M., Freund J., J. Exptl. Med., 86, 83, 1947.
199. Treffers H. P., Heidelberger M., Freund J., J. Exptl. Med., 86, 77, 1947.
200. Boyd W. C., J. Exptl. Med., 74, 369, 1941.
201. Petermann M. L., Pappenheimer A. M., Science, 93, 458, 1941.
202. Williams J. W., Baldwin R. L., Saunders W. M., Squire P. G., J. Am. Chem. Soc., 74, 1542, 1952.
203. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., 25, 465, 1942.
204. Northrop J. H., Goebel W. F., J. Gen. Physiol., 32, 705, 1949.
205. Oudin J., Ann. inst. Pasteur, 75, 30, 109, 1948; Compt. rend., 228, 1890, 1949; Ouchterlony Ö., Arkiv Kemi, 1, 43, 55, 1949; Elek S. D., Brit. J. Exptl. Path., 30, 484, 1949; Munoz J., Becker E. L., J. Immunol., 65, 47, 1950.
206. Goodner K., Horsfall F. L., Dubos R. J., J. Immunol., 33, 279, 1937.
207. Harkins W. D., Fourt L., Fourt P. C., J. Biol. Chem., 132, 111, 1940.
208. Goodner K., Horsfall F. L., J. Exptl. Med., 64, 201, 1936.
209. Dingle J. H., Fothergill L. D., Chandler C. A., J. Immunol., 34, 357, 1938.
210. Colwell C. A., Youmans G. P., J. Infectious Diseases, 68, 226, 1941.
211. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., 61, 563, 1935.
212. Haurowitz F., Z. physiol. Chem., 245, 23, 1936.
213. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., 33, 337, 1937.
214. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Gen. Physiol., 17, 341, 1934.
215. Kabat E. A., Ann. Rev. Biochem., 15, 505, 1946.
216. Marrack J. R., Hoch H., Johns R. G. S., Brit. J. Exptl. Path., 32, 212, 1951.
217. Plescia O. J., Becker E. L., Williams J. W., J. Am. Chem. Soc., 74, 1362, 1952.
218. Singer S. J., Campbell D. H., J. Am. Chem. Soc., 74, 1794, 1952.
219. Goldberg R. J., Williams J. W., Trans. Faraday Soc., 13, 226, 1953.

220. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., **62**, 697, 1935.
221. Morton J. A., Pickles M. M., Nature, **159**, 779, 1947.
222. Race R. R., Sanger R., The Human Blood Groups, Blackwell, Oxford, 1950.
223. Pappenheimer A. M., The Nature and Significance of the Antibody Response, Columbia Univ. Press, New York, 1953.
224. Gitlin D., Edelhoch H., J. Immunol., **66**, 67, 1951.
225. Goldberg R. J., Campbell D. H., J. Immunol., **66**, 79, 1951.
226. Landsteiner K., van der Scheer J., J. Exptl. Med., **71**, 445, 1940.
227. Hooker S. B., Boyd W. C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **29**, 298, 1931.
228. Cann J. R., Brown R. A., Kirkwood J. G., J. Biol. Chem., **185**, 663, 1950.
229. Haurowitz F., Fortschr. Allergielehre, Kalløs, Ed., Basel, 1939, p. 19.
230. Felton L. D., Bull. Johns Hopkins Hosp., **38**, 33, 1936.
231. Felton L. D., J. Immunol., **21**, 357, 1931.
232. Cohn E. J., Oncley J. L., Strong L. E., Hughes W. L., Jr., Armstrong S. H., Jr., J. Clin. Invest., **23**, 417, 1944.
233. Heidelberger M., Kendall F. E., Teorell T., J. Exptl. Med., **63**, 819, 1936.
234. Ramon G., Compt. rend. soc. biol., **88**, 167, 1923.
235. Locke A., Main E. R., Hirsh E. F., J. Infectious Diseases, **39**, 126, 484, 1926.
236. Sumner J., Kirk J. S., Z. physiol. Chem., **205**, 219, 1932.
237. Isliker H., personal communication, 1951.
238. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., **64**, 161, 1936.
239. Felton L. D., J. Immunol., **22**, 453, 1932.
240. Sternberger L. A., Pressman D., J. Immunol., **65**, 219, 1950.
241. Kirkwood J. G., Cann J. R., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 9, 1950.
242. Wu H., Cheng L. H., Li C. P., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **25**, 853, 1928.
243. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., **50**, 809, 1929.
244. Boyd W. C., Bernard H., J. Immunol., **33**, 111, 1937.
245. Van der Scheer J., Bahnel E., Clarke F. A., Wyckoff R. W. G., J. Immunol., **44**, 165, 1942.
246. Madden S. C., Whipple G. H., Physiol. Revs., **20**, 194, 1940.
247. Haurowitz F., Breinl F., Z. physiol. Chem., **205**, 259, 1932.
248. Rous P., Beard J. W., J. Exptl. Med., **59**, 577, 1934.
249. Sabin F. R., J. Exptl. Med., **70**, 67, 1939.
250. Haurowitz F., Crampton C. F., J. Immunol., **68**, 73, 1952.
251. Dougherty T. F., Chase J. H., White A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **58**, 135, 1944.
252. Harris T. N., Grimm E., Mertens E., Ehrich W. E., J. Exptl. Med., **81**, 73, 1945.
253. Dougherty T. F., White A., Chase J. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **59**, 172, 1945.
254. Fagraeus A., Acta Med. Scand., **130**, Suppl. 204, 1948.
255. Gronwall A., Ingelman B., Acta Physiol. Scand., **7**, 97, 1944.
256. Kabat E. A., Berg D., Ann. N. Y. Acad. Sci., **55**, 471, 1952.
257. Bjørneboe M., Gormsen H., Lindquist F., J. Immunol., **55**, 121, 1947.
258. Burnet F. M., Fenner F., The Production of Antibodies, 2nd ed., Macmillan, Melbourne, 1949.

259. Truland L. T., Am. Naturalist, 51, 321, 1917.
260. Muller H. J., Sci. Monthly, 44, 210, 1937.
261. Haurowitz F., Schwerin P., J. Immunol., 47, 111, 1943.
262. Pauling L., Campbell D. H., J. Exptl. Med., 76, 211, 1942.
263. Haurowitz F., Schwerin P., Arch. Biochem., 11, 515, 1946.
264. Кузин А. М., Невраева Н. А., Биохимия, 12, 49, 1947.
265. Duncan J. T., Brit. J. Exptl. Path., 18, 108, 1937.
266. Kleinschmidt W. J., Boyer P. D., J. Immunol., 68, 257, 1952.
267. Goebel W. F., Hotchkiss R. D., J. Exptl. Med., 66, 191, 1937.
268. Rothen A., J. Biol. Chem., 168, 75, 1947; J. Am. Chem. Soc., 70 2732, 1948.
269. Singer S. J., J. Biol. Chem., 182, 189, 1950.
270. Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y., Arch. Sci physiol., 1, 151, 1947; Wurmser R., Filitti-Wurmser S., Biochem. Biophys. Acta, 4, 238, 1950; Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y., Wurmser R., J. Chim. phys., 47, 419, 1950; 49, 550, 1952; Filitti-Wurmser S., Aubel-Lesure G., Wurmser R., J. Chim. phys., 50, 236, 1953; 50, 317, 1953; Filitti-Wurmser S., Jacquot-Armand Y., Wurmser R., J. Chim. phys., 50, 240, 1953; Jacquot-Armand Y., Filitti-Wurmser S., Arch. Sci. physiol., 7, 233, 1953; Wurmser R., Filitti-Wurmser S., Biochim. Biophys. Acta, 12, 92, 1953.
271. Mayer M., Heidelberger M., J. Biol. Chem., 143, 567, 1942.
272. Boyd W. C., Conn J. C., Gregg D. C., Kistiakowsky G. B., Roberts R. M., J. Biol. Chem., 139, 787, 1941.
273. Svedberg T., Eriksson-Quensel I., Biol. Bull., 71, 498, 1936.
274. Haurowitz F., Crampton C. F., Sowinski R., Federation Proc., 10, 560, 1951.
275. Bordet J., Traite de L'Immunité, Masson, Paris, 1939.
276. Landsteiner K., Welecki S., Z. Immunitätsforsch., 8, 397, 1910.
277. Heidelberger M., Kabat E. A., J. Exptl. Med., 65, 885, 1937.
278. Kraus R., Zentr. Bakt. Parasitenk, 34, 408, 1903.
279. Glenny A. T., Barr M., J. Path. Bact., 35, 91, 1932.
280. Boyd W. C., Ann. N. Y. Acad. Sci., 46, 927, 1946.
281. Heidelberger M., Kabat E. A., J. Exptl. Med., 60, 643, 1934.
282. Jones F. S., Orcutt M., J. Immunol., 27, 215, 1934.
283. Parnas J. K., Wagner R., Biochem. Z., 125, 253, 1921.
284. Heidelberger M., MacPherson C. F. C., Science, 97, 405, 1943.
285. Heidelberger M., Bact. Revs., 3, 49, 1939.
286. Freundlich H., Kapillarchemie, Akadem. Verlag, Leipzig, 1923.
287. Langmuir I., J. Am. Chem. Soc., 40, 1361, 1918.
288. Ramon G., Compt. rend. soc. biol., 86, 661, 711, 813, 1922.
289. Dean H. R., Webb R. A., J. Path. Bact., 29, 473, 1926.
290. Boyd W. C., Purnell M. A., J. Exptl. Med., 80, 289, 1944.
291. Elek S. D., Levy E., Nature 164, 353, 1949.
292. Teorell T., J. Hyg., 44, 227, 237, 1946; Nature, 151, 696, 1943.
293. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Gen. Physiol., 19, 373, 1935.
294. Glenny A. T., O'Kell C. C., J. Path. Bact., 27, 187, 1924.
295. Duncan J. T., Brit. J. Exptl. Path., 13, 489, 1932.
296. Taylor G. L., Adair G. S., Adair M., J. Hyg., 34, 118, 1934.
297. Burnet F. M., J. Path. Bact., 34, 471, 1931.
298. Abramson H. A., Boyd W. C., Hooker S. B., Porter P. M., Purnell M. A., J. Bact., 50, 15, 1945.

299. Duncan J. T., Brit. J. Exptl. Path., 19, 328, 1938.
300. Lanni F., J. Exptl. Med., 84, 167, 1946.
301. Pressman D., Campbell D. H., Pauling L., J. Immunol., 44, 101, 1942.
302. Pauling L., Campbell D. H., Pressman D., Physiol. Revs., 23, 203, 1943.
303. Heidelberger M., Pedersen K. O., J. Exptl. Med., 65, 393, 1937.
304. Hooker S. B., Boyd W. C., J. Immunol., 23, 465, 1932.
305. Arrhenius, Immunochemistry, Macmillan, New York, 1907.
306. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., 62, 467, 1935.
307. Boyd W. C., J. Immunol., 38, 143, 1940.
308. Hershey A. D., J. Immunol., 42, 455, 485, 515, 1941; ibid., 43, 39, 249, 381, 1942.
309. Ghosh B. N., Indian J. Med. Res., 23, 285, 1935; ibid., 23, 837, 1936.
310. Morales M. F., Botts J., Hill T. L., J. Am. Chem. Soc., 70, 2339, 1948.
311. Goldberg R. J., J. Am. Chem. Soc., 74, 5715, 1952.
312. Flory P. J., J. Am. Chem. Soc., 58, 1879, 1931; ibid., 63, 3083, 3091, 3096, 1941.
313. Stockmayer W. H., J Chem. Phys., 11, 45, 1943.
314. Heidelberger M., J. Exptl. Med., 73, 681, 1941.
315. Pillemer L., Ecker E. E., Science, 94, 437, 1941.
316. Ecker E. E., Pillemer L., Ann. N. Y. Acad. Sci., 43, 63, 1942.
317. Gordon J., Whitehead H. R., Wormall A., Biochem. J., 20, 1028, 1036, 1926.
318. Muir R., J. Path. Bact., 16, 523, 1911/1912.
319. Heidelberger M., personal communication, 1951.
320. Pillemer L., Chu F., Seifter S., Ecker E. E., J. Immunol., 45, 51, 1942.
321. Heilderberger M., Science, 92, 534, 1940.
322. Haurowitz F., Yenson M. M., J. Immunol., 47, 309, 1943.
323. Heidelberger M., Jonsen J., Waksman B. H., Manski W., J. Immunol., 67, 449, 1951.
324. Goldsworthy N. E., J. Path. Bact., 31, 220, 1928.
325. Heidelberger M., Rochae Silva M., Mayer M., J. Exptl. Med., 74, 359, 1941.
326. Hambleton A., Can. J. Res., 7, 583, 596, 1952.
327. Heidelberger M., Weil A. J., Treffers H. P., J. Expt. Med., 73, 695, 1941.
328. Davis B. D., Kabat E. A., Harris A. D., Moore D. H., J. Immunol., 49, 223, 1944.
329. Bowman W. M., Mayer M. M., Rapp H. J., J. Exptl. Med., 94, 87, 1951.
330. Sevag M. G., Immunocatalysis, Thomas C. C., 2nd ed., Springfield, Illinois, 1951.
331. Landsteiner K., Lampl H., Biochem. Z., 86, 343, 1918.
332. Hansen R. G., Potter R. L., Phillips P. H., J. Biol. Chem., 171, 229—232, 1947.
333. Henderson L. M., Snell E. E., J. Biol. Chem., 172, 15—29, 1948.
334. Campbell D. H., Bulman N., Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, 9, 443, 1952; Kabat E. A., Mayer M. M., Experimental Immunochemistry, Thomas C. C., Springfield, 1948.
335. Heidelberger M., Pedersen K. O., J. Exptl. Med., 65, 393, 1937.

336. Kabat E. A., Pedersen K. O., Science, 87, 372, 1938; Kabat E. A., J. Exptl. Med., 69, 103, 1939.
337. Tiselius A., Kabat E. A., Science, 87, 416, 1938; J. Exptl. Med., 69, 119, 1939.
338. Pappenheimer A. M., Jr., Lundgren H. P., Williams J. W., J. Exptl. Med., 71, 247, 1940.
339. Petermann M. L., Pappenheimer A. M., Jr, J. Phys. Chem., 45, 1, 1941.
340. Northrop J. H., J. Gen. Physiol., 25, 465, 1942.
341. Rothen A., J. Gen. Physiol., 25, 487, 1942.
342. Païc M., Bull. soc. chim. biol., 21, 412, 1939.
343. Davis B. D., Moore D. H., Kabat E. A., Harris A., J. Immunol., 50, 1, 1945.
344. Pedersen K. O., Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions, Almquist and Wiksell, Upsala, Sweden, 1945.
345. Haurowitz F., Etili L., Federation Proc., 8, 404, 1949.
346. Dewar M. J. S., Discussions Faraday Soc., 2, 261, 1947.
347. Karush F., J. Am. Chem. Soc., 72, 2705, 1949.
348. Epstein S., Science, 118, 756, 1953.
349. Heidelberger M., Kendall F. E., J. Exptl. Med., 61, 559, 563, 1935; Pappenheimer A. M., Robinson E. S., J. Immunol., 32, 291, 1937.
350. Heidelberger M., Bact. Revs., 3, 49, 1939; Malkiel S., Boyd W. S., J. Exptl. Med., 66, 383, 1937; Pappenheimer A. M., J. Exptl. Med., 71, 263, 1940; Heidelberger M., Treffers H. P., Mayer M., J. Exptl. Med., 71, 271, 1940; Pappenheimer A. M., Lundgren H. P., Williams J. W., J. Exptl. Med., 71, 263, 1940; Kabat E. A., Ann. Rev. Biochem., 15, 505, 1946.
351. Pennell R. B., Huddleson I. F., J. exptl. Med., 68, 73, 1938.
352. Lundgren H. P., Ward W. H., by Greenberg D. M., Amino Acids and Proteins, Thomas C. C., Springfield. 1951.

VIII

БЕЛКОВЫЕ ГОРМОНЫ

Чоу Хао Ли

Choh Hao Li, «Protein Hormones» (vol. II, part A, pp. 595—661)

1. ВВЕДЕНИЕ

Термин «гормон» впервые ввели Бэйлисс и Стерлинг [1], которые определили гормон как «любое вещество, нормально образующееся в клетках какой-нибудь части тела и переносимое током крови к другим его частям, на которые оно оказывает положительное для всего организма действие». Гормоны секретируются в органах, известных как железы без выводных протоков (эндокринные железы или железы внутренней секреции). Важное значение этих органов стало выясняться около столетия назад, после того как Аддисон [2] описал синдром адреналокортикальной недостаточности. За последние годы химики сумели получить в чистом или высокоочищенном виде активные начала следующих желез внутренней секреции: коры надпочечников, мозгового вещества надпочечников, передней доли гипофиза, желтого тела, слизистой двенадцатиперстной кишки, поджелудочной железы, щитовидной железы, задней доли гипофиза, семянников и яичников.

Гормоны эффективны в чрезвычайно малых количествах; предполагают, что они, подобно ферментам, действуют как биокатализаторы и не вносят в процессы физиологических реакций организма энергии или пластического материала в сколько-нибудь заметных количествах. Однако гормоны, введенные в организм, быстро исчезают из кровяного тока, а в моче их можно обнаружить лишь в очень незначительных количествах; это свидетельствует о том, что они постоянно разрушаются тканями тела.

Все гормоны можно разделить на четыре основные группы в соответствии с их химическим строением: а) производные фенола (например, адреналин, норадреналин и тироксин); б) белки (например, инсулин, гормоны передней доли гипофиза, гонадотропин хориальной ткани женщин, гонадотропин сыворотки жеребой кобылы, тиреоглобулин и секретин); в) пептиды [например, кортикотропин (АКТГ), вазопрессин, окситоцин]; г) стероиды (например, эстрогены, андрогены, прогестерон и кортикоиды). В табл. 54 приведены данные о месте образования и физиологическом действии гормонов, которые в настоящее время идентифицированы как определенные хими-

Таблица 54

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА, МЕСТО ОБРАЗОВАНИЯ И ОСНОВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ

Химическая природа	Гормоны	Место образования	Основное физиологическое действие
Производные фенола	Адреналин	Мозговое вещество надпочечников	Стимуляция симпатических нервов
	Норадреналин	То же	То же
	Тироксин	Щитовидная железа	Повышение скорости обмена
Белки	Ростовой (соматотропин)	Передняя доля гипофиза	Стимуляция роста
	Адренокортикотропный (АКТГ, кортикотропин)	То же	Стимуляция коры надпочечников
	Фолликулостимулирующий (ФСГ)	» »	Стимуляция гонад
	Стимулирующий интерстициальные клетки (ГСИК)	» »	» »
	Лактогенный (пролактин, лютеотропин)	» »	Стимуляция молочных желез и поддержание функциональной активности желтого тела
	Тиреотропный (ТСГ)	» »	Стимуляция щитовидной железы
	Инсулин	Поджелудочная железа	Регулирование обмена углеводов
	Секретин	Слизистая двенадцатиперстной кишки	Регулирование выделения сока поджелудочной железы
	Гонадотропин хориальной ткани женщин (ГГХТЖ)	Человеческая плацента	Стимуляция гонад
	Гонадотропин сыворотки жеребой кобылы (ГГСЖК)	Сыворотка жеребой кобылы	» »
	Тиреоглобулин	Щитовидная железа	Повышение скорости обмена
Пептиды	Кортикотропин (АКТГ)	Передняя доля гипофиза	Стимуляция коры надпочечников

Продолжение табл. 54

Химическая природа	Гормоны	Место образования	Основное физиологическое действие
Пептиды	Вазопрессин	Задняя доля гипофиза	Повышение кровяного давления
	Окситоцин	То же	Стимуляция мускулатуры матки
Стероиды	Кортикоиды	Кора надпочечников	Регулирование солевого, белкового, углеводного и жирового обмена
	Эстрогены	Яичники	Развитие и сохранение женских вторичных половых признаков
	Андрогены	Семенники	Развитие и сохранение мужских вторичных половых признаков
	Прогестерон	Желтое тело	Развитие секреторной фазы эндометрия, предварительно сенсибилизированного эстрогенами

ческие соединения. В этой главе рассматриваются только те гормоны, которые по своей природе являются белками или пептидами.

2. ГОРМОНЫ ПЕРЕДНЕЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА

Передняя доля гипофиза занимает особое место среди всех эндокринных желез, так как она регулирует деятельность коры надпочечников, щитовидной железы и половых желез. Поэтому гормоны, секретируемые передней долей гипофиза, называют «тропными» гормонами, ибо их функцией является стимуляция специфического целевого органа —эндокринной железы, чья деятельность, таким образом, усиливается или ослабляется. Для одного из гормонов передней доли гипофиза—гормона, влияющего на общие процессы роста, целевой орган не определен.

Имеется шесть известных гормонов передней доли гипофиза, существование которых достоверно установлено. Их можно разбить на две группы: к одной относятся гормоны, влияющие на обмен веществ, к другой—гонадотропные гормоны. Метаболическими гормонами являются тиреотропный (ТСГ), адренокортикотропный (АКТГ, кортикотропин) и ростовой (РГ, соматотропин). Гонадотроп-

ные гормоны—фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), гормон, стимулирующий интерстициальные клетки (ГСИК), и лактогенный гормон (пролактин).

А. Гонадотропные гормоны

В 1927 г. Смит [3] доказал необходимость гипофиза для развития половых желез; он пришел к выводу, что гонадотропины находятся в передней доле этой железы. Четыре года спустя Феволд и др. [4] выделили два компонента из некоторых гонадотропных гипофизарных вытяжек. Один из этих компонентов вызывал главным образом ускорение роста фолликулов в яичниках и увеличение сперматогенеза у самцов; другой же влиял на превращение фолликула в желтое тело, а у самцов вызывал увеличение придаточных половых желез. Последующие исследования подтвердили эти данные, и, таким образом, было установлено, что два гормона—фолликулостимулирующий и стимулирующий интерстициальные клетки (или лютеинизирующий гормон, ЛГ)—присутствуют в гипофизарном экстракте и определяют его гонадотропное действие.

Лактогенный гормон был включен в число гипофизарных гонадотропинов в результате работы Эванса с сотрудниками [5], которые нашли, что препараты лактогенного гормона могут стимулировать или усиливать функции желтого тела; поэтому для него было предложено наименование «лютеотропин», применяемое некоторыми исследователями. Таким образом, названия «лактогенный гормон», «пролактин» и «лютеотропин» являются синонимами; все они относятся к одному и тому же веществу.

У самок ФСГ стимулирует развитие находящихся в яичнике незрелых фолликулов, доводя их до созревания. Созревший фолликул под влиянием гормона, стимулирующего интерстициальную ткань, секретирует эстрогены, т. е. гормоны, вызывающие эструс; кроме того, ГСИК дает фолликулу толчок для дальнейшего развития и превращения в желтое тело. Растущее желтое тело созревает под влиянием лактогенного гормона, который в то же время стимулирует развитие молочных желез. Зрелое желтое тело секретирует гормон прогестерон, который подготовляет слизистую оболочку матки к принятию и развитию оплодотворенного яйца.

1) ГОРМОН, СТИМУЛИРУЮЩИЙ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Содержание ГСИК в гипофизах различных животных не одинаково. Содержание его в железах овец выше, чем в железах свиней, тогда как для гипофизов крупного рогатого скота и лошадей характерна низкая активность в отношении этого гормона. Имеются данные, что небольшие количества ГСИК появляются в моче в течение всей жизни человека и что этот гормон обнаруживается также и в крови человека.

ГСИК был выделен (по-видимому, в чистой форме) из овечьих и свиных гипофизов Ли с сотрудниками [6—8] и независимо от них Шидловским, Чоу и др. [9, 10]. Ли с сотрудниками применяли следующий метод (все стадии обработки проводились в холодном помещении при 4°).

40-процентный спиртовой экстракт высушенного в ацетоне овечьего гипофиза использовали в качестве исходного материала. Этот экстракт осаждали спиртом и осадок высушивали абсолютным спиртом и эфиром. 50 *г* полученного порошка экстрагировали 3 *л* воды; pH полученной вытяжки доводили до 4,5 и осаждали прибавлением равного объема холодного ацетона. Затем осадок экстрагировали 1-процентным раствором NaCl и к экстракту прибавляли насыщенный раствор сульфата аммония до полунасыщения. Полученный таким образом осадок переосаждали еще дважды в тех же условиях. Третий осадок, полученный добавлением $(NH_4)_2SO_4$ до полунасыщения, растворяли в воде и диализировали до удаления соли. Диализированный раствор насыщали $(NH_4)_2SO_4$ до 0,2 насыщения. После удаления осадка надосадочную жидкость доводили до 0,4 насыщения сульфатом аммония. Эту процедуру повторяли еще два раза. Конечный осадок, полученный при добавлении $(NH_4)_2SO_4$ до 0,2—0,4 насыщения, растворяли в воде и диализировали. К диализированному раствору прибавляли сульфат аммония до 0,33 насыщения и получающийся при этом осадок отделяли центрифугированием; pH прозрачной надосадочной жидкости доводили до 4,1. Это осаждение в изоэлектрическом состоянии можно было повторить еще один или два раза. Конечный осадок вел себя как однородное вещество при электрофоретических и седиментационных испытаниях, а также при исследованиях растворимости; он избирательно стимулировал интерстициальную ткань гипофизэктомированных крыс. Из 1 *кг* свежих овечьих гипофизов вышеописанным методом можно получить около 0,1 *г* конечного продукта, биологическая активность которого более чем в 1000 раз превышает активность исходного материала.

Физико-химические исследования гормональных препаратов, выделенных из овечьих и свиных гипофизов, показали, что эти препараты не являются идентичными. Из исследованных свойств этих двух гормонов наиболее заметно различаются молекулярные веса и изоэлектрические точки. Судя по осаждению в ультрацентрифуге, препарат овечьего гормона имеет молекулярный вес 40 000, тогда как препарат, полученный из свиных гипофизов,—100 000; изоэлектрическая точка первого соответствует pH 4,6, а второго—pH 7,45. Кроме того, иммунологические исследования показывают, что белковые молекулы этих гормонов различны. Чоу [11] нашел, что свиной ГСИК вызывает образование специфических антител у кроликов и что образовавшаяся антисыворотка не дает реакций преципитации и связывания комплемента с препаратом, полученным из

овечьих гипофизов. Сообщалось даже о некотором различии в биологических свойствах этих двух гормонов; так, Грип с сотрудниками [12] обнаружили, что овечий ГСИК значительно активнее свиного гормона как в отношении восстановления интерстициальных клеток яичника у гипофизэктомированных крыс, так и в отношении стимулирования овуляции у кроликов. Однако оба гормона одинаково действуют на переднюю предстательную железу.

Было установлено, что ГСИК может перевариваться кристаллическим трипсином и химотрипсином, в результате чего уничтожается его гормональная активность [13]. Наличие свободных амино- и дисульфидных групп, по-видимому, весьма существенно для гонадотропной активности этого гормона, так как после обработки кетеном и цистеином он полностью теряет свое биологическое действие [6, 14].

2) ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩИЙ ГОРМОН

Из всех гипофизарных гормонов только один ФСГ растворяется в полунасыщенном растворе $(NH_4)_2SO_4$. Грип с сотрудниками [15] описали метод получения биологически чистого ФСГ из свиных гипофизов, основанный на том, что этот гормон растворяется в ацетатном буфере с pH 4,4, содержащем 20,5% сульфата натрия, тогда как ГСИК нерастворим в таком буфере. Препарат, полученный этими авторами, оказался неоднородным при электрофорезе и ультрацентрифугировании [16]. Ли с сотрудниками [17—19] успешно выделили высокоочищенный ФСГ из желез овец. Очистка по их методу проводится при 2—3° и состоит в следующем.

Замороженные овечьи гипофизы (1 *кг*) тонко размельчали и экстрагировали $Ca(OH)_2$. По удалении осадка, полученного при добавлении насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$ до полунасыщения, надосадочную жидкость доводили до 0,75 насыщения прибавлением твердого сульфата аммония. Осадок растворяли в воде и диализировали. Небольшой осадок, который образовывался при диализе, отбрасывали. pH прозрачного красноватого надосадочного раствора доводили до 6,0, а затем до 4,7. Осадок, образовавшийся в этом интервале значений pH, отделяли центрифугированием. Надосадочную жидкость доводили до полунасыщения медленным прибавлением равного объема насыщенного раствора сульфата аммония при pH 4,7. Образовавшийся осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость снова доводили до 0,75 насыщения насыщенным раствором сульфата аммония при том же значении pH. Осадок растворяли и диализировали. Всю процедуру повторяли еще раз; конечный диализированный раствор замораживали и высушивали в вакууме. Полученный продукт, так называемый «ФСГ-сырец», можно хранить в эксикаторе для дальнейшего использования. Порошок «ФСГ-сырца», приготовленный первоначальным фракциониро-

ванием сульфатом аммония, как описано выше, экстрагировали 0,10 *М* раствором K_2HPO_4 в 40-процентном спирте. После удаления остатка концентрацию спирта в надосадочной жидкости повышали до 80% медленным прибавлением холодного (—5°) 95-процентного спирта. Осадок растворяли в воде и диализировали. Затем диализированный раствор подвергали дальнейшему фракционированию сульфатом аммония. pH такого раствора доводили до 4,7 и, если образовывался осадок, последний центрифугировали. Насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ с pH 4,7 прибавляли до тех пор, пока концентрация не достигала 0,55 насыщения. Осадок, полученный добавлением $(NH_4)_2SO_4$ до 55-процентного насыщения, не обладал фолликулостимулирующей активностью и его удаляли центрифугированием. Центрифугат доводили до 70-процентного насыщения раствором, pH которого был выше 4,7; образующийся осадок растворяли в воде и диализировали. Такое фракционирование добавлением $(NH_4)_2SO_4$ до 0,55—0,70 насыщения повторяли дважды. Конечный осадок обладал только фолликулостимулирующей способностью и оказался гомогенным при электрофорезе, ультрацентрифугировании и диффузии.

Что касается физико-химических характеристик фолликулостимулирующего гормона, то известно, что его изоэлектрическая точка соответствует pH 4,5, а молекулярный вес, рассчитанный по данным ультрацентрифугирования, близок к 67 000. Элементарный анализ одного образца однородного препарата гормона показал, что он содержит 44,93% углерода, 6,67% водорода, 15,10% азота и 1,50% серы. Содержание гексозы составляло в среднем 1,23%, а гексозамина—1,51%. Количественное содержание аминокислот частично определяли при помощи микробиологических методов; при этом были получены следующие величины (в граммах на 100 *г* белка): аргинин 5,3, аспарагиновая кислота 9,3, цистин 4,3, глутаминовая кислота 13,4, гистидин 3,7, изолейцин 3,3, лейцин 9,2, лизин 11,1, метионин 1,0, фенилаланин 5,8, пролин 5,2, треонин 4,7, тирозин 3,8, валин 5,8. Количество серы в молекуле, вычисленное по содержанию цистина и метионина, составляло 1,37%, что хорошо согласуется с данными элементарного анализа.

Мак-Шан и Мейер [20] исследовали влияние ферментов на ФСГ и показали, что птиалин и такадиастаза уничтожают его активность; эти данные наводят на мысль, что углеводный компонент молекулы гормона, вероятно, играет важную роль в осуществлении его биологической активности. Из сообщения Чоу с сотрудниками [13] следует, что трипсин и химотрипсин также уменьшают биологическую активность ФСГ. Однако новые исследования [21] показывают, что при некоторых условиях ФСГ устойчив к перевариванию пепсином при pH 4,0.

Недавно Ван-Дик, Пэн и Шедловский [22] описали методику приготовления ФСГ из гипофиза борова, причем степень чистоты полу-

ченного продукта, как показал электрофоретический анализ, равнялась 80—85%. Эти исследователи сравнивали полученный ими продукт с овечьим гормоном Ли, Симпсона и Эванса [17] и нашли, что препараты можно легко дифференцировать по их иммунологическим свойствам.

3) ЛАКТОГЕННЫЙ ГОРМОН (ПРОЛАКТИН)

Присутствие лактогенного вещества в передней доле гипофиза было впервые показано в 1928 г. опытами Страйкера и Грютера [23], которые обнаружили, что вытяжки из передней доли гипофиза вызывают лактацию у овариэктомированных ложнобеременных крольчих. Этот факт подтвердился последующими исследованиями [24, 25]. Райдл с сотрудниками [25, 26] открыли стимулирующее действие лактогенного начала на зобную железу голубя и поэтому предложил называть его пролактином.

Имеются два основных типа биологических тестов, которые можно использовать для определения лактогенной способности; один основывается на чувствительности к этому гормону зобной железы голубя, другой—на реакции молочных желез специальным образом подготовленных подопытных крольчих или морских свинок. Методы, в которых использовалась реакция зобной железы голубя, нашли более широкое применение, так как другие методы более трудоемки, а результаты менее показательны. Первоначальный метод Райдла с сотрудниками [25, 26] основывался на наблюдении, что суммарный вес двух вырезанных зобных желез пропорционален количеству введенного лактогенного начала.

Лайонс [27] предложил микрометод для определения ничтожных количеств лактогенного гормона, подобных обнаруживаемым в моче. Раствор гормона вводили в кожу, непосредственно покрывающую зоб; было показано, что этим методом можно обнаружить 1/10 000 единицы, полученной при минимальном стимуляционном тесте.

На конференции по стандартизации гормонов в 1938 г. [28] была достигнута договоренность об установлении интернациональной единицы (И. Е.) лактогенного гормона, а в следующем году был выпущен интернациональный стандартный препарат. Интернациональная единица была определена как «...специфическое действие 0,10 *мг* стандартного препарата». Испытания сравнительной активности, проведенные Лайонсом [29], показали, что И. Е. равна примерно половине активности высокоочищенного лактогенного гормона по показателям испытаний на морских свинках и приблизительно $^1/_3$ активности высокоочищенного лактогенного гормона, действие которого определяли методом изменения веса зобных желез.

Исходным материалом для выделения лактогенного гормона обычно служат железы крупного рогатого скота или овец, так как установлено [30], что они содержат гормон в более высокой концентра-

ции, чем свиные гипофизы. Высокоочищенный и активный препарат лактогенного гормона впервые получил Лайонс [31] в 1937 г.; первоначальный метод, несколько модифицированный Ли, Лайонсом и Эвансом [32—34], состоит в следующем. Размельченные овечьи гипофизы (1 *кг*) экстрагируют 4 *л* ацетона, содержащего 100 *мл* 12 *М* соляной кислоты. Экстрагированное вещество осаждают прибавлением 5 *л* ацетона; осадок растворяют в 200 *мл* воды при помощи 1 *М* раствора NaOH до получения прозрачного раствора, pH которого доводят до 6,1 1 *М* соляной кислотой. Осадок удаляют центрифугированием. Центрифугат подкисляют до pH 5,5 и выдерживают в течение нескольких часов при —15°. После оттаивания рас-

Таблица 55

СОСТАВ ЛАКТОГЕННОГО ГОРМОНА (МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС 33 000)[a]

Компонент	Количество в 100 *г* белка, *г*	Азот, % от белкового азота	Вероятное число остатков
Азот	15,86	—	—
Сера	1,79	—	—
Амидный азот	1,0	6,3	24
Аргинин	8,6	17,4	17
Аспарагиновая кислота	11,6	7,6	28
Цистин	3,1	2,3	4
Глутаминовая кислота	14,1	8,5	32
Глицин	4,0	4,7	18
Гистидин	4,5	7,7	10
Изолейцин	7,2	4,8	18
Лейцин	12,5	8,4	32
Лизин	5,3	6,4	12
Метионин	3,6	2,1	8
Фенилаланин	4,1	2,2	8
Пролин	6,2	4,8	18
Серин	6,5	5,5	21
Треонин	4,8	3,5	13
Тирозин	4,7	2,3	9
Триптофан	1,2	1,0	2
Валин	5,9	4,4	17
Всего	108,9	99,9	291

[a] По данным Ли [41]

твор центрифугируют. Осадок растворяют в слегка щелочном растворе и все этапы вышеописанного осаждения в изоэлектрическом состоянии повторяют до тех пор, пока конечный pH не достигнет значения 5,5 и осадок не станет электрофоретически однородным.

Установлено, что изоэлектрическая точка пролактина соответствует pH 5,73. Его молекулярный вес, рассчитанный по аминокислотному составу, равен 33 000. Эта величина весьма близка к найденной Уайтом [35] по данным ультрацентрифугирования. Активность гормона разрушается под влиянием иода [36], кетена [37], восстановителей [38, 39] и этерифицирующих агентов [40]; очевидно, это свидетельствует о том, что определенные группы в белковой молекуле, такие, как дисульфидные, фенольные, карбоксильные и аминогруппы, необходимы для биологического действия гормона. Кислые растворы лактогенного гормона более устойчивы к нагреванию, чем щелочные.

Молекула лактогенного гормона не содержит ни углеводов, ни фосфора; белковый азот (15,86%) можно почти полностью подсчитать по содержанию аминокислот [41], как это видно из табл. 55. Гормон, выделенный из овечьих гипофизов, отличается от гормона, полученного из гипофизов крупного рогатого скота, по растворимости и по содержанию тирозина [33, 42]; первый содержит 4,5%, а второй—5,7% тирозина.

Б. Метаболические гормоны

Тиреотропный гормон (ТСГ), адренокортикотропный (кортикотропин, АКТГ) и гормон роста (соматотропин, ГР) являются гормонами, контролирующими и регулирующими обмен веществ в организме. Тиреотропный гормон стимулирует секрецию щитовидной железой ее гормона—тироксина; АКТГ побуждает кору надпочечников продуцировать гидрокортизон и другие адренокортикальные гормоны. Протекание процессов обмена в организме зависит от равновесия во взаимодействии этих гормонов [43].

1) ТИРЕОТРОПНЫЙ ГОРМОН

Хотя уже давно было известно, что у млекопитающих существует взаимосвязь между щитовидной железой и гипофизом, однако только работа Смита [44, 45] ясно показала, что в гипофизе присутствует тиреотропное начало. Пользуясь методикой имплантации гипофиза, исследователь восстановил атрофированную щитовидную железу у гипофизэктомированных лягушек, головастиков и крыс. Позднее Хуссей с сотрудниками [46] получили подобные же результаты на собаках. Первые попытки концентрировать тиреотропное начало из гипофизарных вытяжек принадлежат Лебу и Бассету [47] и Янсену и Лёсеру [48]; однако до сих пор гормон не выделен в чис-

том виде, хотя Чирешко [49] и Френкель-Конрат с сотрудниками [50] сообщали о получении высокоочищенных препаратов.

Для измерения тиреостимулирующей активности был предложен ряд методов [51]. В общем все они основываются на последовательном разбавлении испытуемого препарата, введении получаемых разведений подопытным животным (один-два раза в день в течение 1—6 и более суток) и последующем определении биологической активности при помощи одного из многих конечных эффектов, характерных для усиления функции щитовидной железы. В качестве критериев при измерении тиреотропной активности можно принять следующие эффекты: гистологическое восстановление атрофированной щитовидной железы, увеличение ее веса и высоты эпителиальных клеток фолликулов, потерю иода, возрастающее включение радиоактивного фосфора, появление капелек коллоида внутри клеток железы, их митотическую активность, повышение интенсивности основного обмена организма. Альберт с сотрудниками [52] разработали метод количественного определения ТСГ, основанный на трех различных реакциях. В основном этот метод заключается в том, что 10—20-дневным петушкам производили подкожную инъекцию экстракта один раз в день в течение 3 суток, а на четвертые сутки птиц вскрывали. Щитовидные железы взвешивали, после чего в них определяли содержание иода. Кроме того, из некоторых желез делали срезы и измеряли среднюю высоту фолликулярных клеток. Борелл и Холмгрен [53] предложили измерять активность тиреотропного гормона по степени поглощения радиоактивного фосфора щитовидной железой морских свинок, так как количество радиоактивного фосфора в железе прогрессивно увеличивается при увеличении дозировок тиреотропных препаратов.

В качестве исходного материала для приготовления гормональных препаратов лучше всего использовать кислые, щелочные и спиртовые вытяжки из гипофизов свиней и крупного рогатого скота. Было замечено, что тиреотропное начало остается в растворе в присутствии некоторых веществ, осаждающих белки, таких, как трихлоруксусная кислота, сульфосалициловая кислота, ацетат свинца и другие, и это, по-видимому, является доказательством того, что гормон имеет относительно низкий молекулярный вес; тот факт, что гормон не концентрируется при ультрацентрифугировании, подтверждает это предположение [54].

Один из методов, применявшийся для очистки тиреотропного начала, основывается на дифференциальном осаждении осадителями белка [49]. Он состоит в следующем. Цельные замороженные бычьи гипофизы размельчали и экстрагировали 2-процентным раствором NaCl при pH 7,4—7,8. После центрифугирования надосадочную жидкость подкисляли до pH 4,0—4,1 и смешивали с равным объемом ацетона; образовавшийся осадок удаляли и прибавляли дополнительное количество ацетона до 75%. Вещество, не растворимое

в 50—75-процентном ацетоне, высушивали обработкой ацетоном. Затем высушенный в ацетоне осадок экстрагировали дистиллированной водой. Объединенные экстракты подщелачивали до pH 9,0 и центрифугировали. pH полученного центрифугата доводили до 7,0 и добавляли к нему 5-процентный раствор ацетата свинца до полного осаждения. К надосадочному слою прибавляли 20-процентный раствор трихлоруксусной кислоты, пока ее концентрация не достигала 8%. Фракцию, растворимую в трихлоруксусной кислоте, диализировали и лиофилизировали; сухое белое вещество представляло собою очищенный тиреотропный гормон. Из 1 *кг* цельных бычьих гипофизов можно получить около 400—500 *мг* препарата.

При введении цыплятам 0,001 *мг* этого вещества в течение 5 дней наблюдаются гистологические изменения в щитовидных железах цыплят. Установлено, что препарат не содержит примесей ростового, лактогенного и гонадотропного гормонов.

Другой метод, разработанный Френкель-Конратом с сотрудниками [50], основан на солевом фракционировании. Обезвоженные ацетоном передние доли бычьих гипофизов экстрагировали раствором, содержащим 0,25% уксусной кислоты и 1% NaCl. К раствору прибавляли равный объем ацетона и образовавшийся осадок экстрагировали 1-процентным раствором NaCl. Затем солевой экстракт доводили до 0,3 насыщения сульфатом аммония. После удаления осадка концентрацию сульфата аммония в растворе увеличивали до 0,6 насыщения. Осадок, полученный при добавлении $(NH_4)_2SO_4$ до 0,6 насыщения, растворяли в воде и раствор вновь доводили до 0,3 насыщения сульфатом аммония. Раствор еще раз переосаждали добавлением $(NH_4)_2SO_4$ до 0,5 насыщения, а осадок растворяли в воде и подвергали диализу; к диализату прибавляли ацетон, доводя его содержание до 39%. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием, а жидкость вливали в холодный ацетон, объем которого превышал объем раствора в 8—10 раз. Конечный осадок представляет собой очищенный тиреотропный гормон.

Из 1 *кг* обезвоженных ацетоном бычьих гипофизов можно получить около 2,6 *г* активного белка; общая доза 0,012—0,026 *мг* вызывает 33-процентное (по сравнению с контрольными экземплярами) увеличение веса щитовидных желез у цыплят, которым вводили гормональный препарат в течение 6 дней. При испытаниях продукта на содержание в нем других гипофизарных веществ было установлено, что он практически не содержит лактогенной, адренокортикотропной и фолликулостимулирующей активности, но содержит около 10% гормона, стимулирующего интерстициальную ткань.

В недавно опубликованном предварительном сообщении Стилмена с сотрудниками [55] описывается приготовление высокоочищенного препарата ТСГ из гипофизов крупного рогатого скота методом фракционного электрического переноса. Авторы сообщают, что препарат имеет изоэлектрическую точку в области pH 8,0—8,5. Он

не содержит метионина и фенилаланина. Подробное описание этой работы еще не опубликовано.

По литературным данным, содержание азота в очищенных препаратах тиреотропного гормона составляет 12,6% [49] и 13,0% [50]. Кроме того, гормон содержит 3,5% гексозы и 2,5% глюкозамина [50]. Количество серы равно 1,2%, фосфор не обнаружен [49]. По данным Уайта [56], константа седиментации очищенного препарата ТСГ равна 1,0 *S*, а вычисленный молекулярный вес близок к 10 000.

Гормон хорошо растворяется в воде [49, 50, 56]. Он осаждается фосфорновольфрамовой и пикриновой кислотами, ацетатом урана и хлоридом ртути, но не осаждается сульфосалициловой кислотой [49, 56]. Обработка цистеином и кетеном уничтожает тиреостимулирующую активность гормона [50]. Исследование влияния различных протеолитических ферментов на вещество, экстрагированное из свиных гипофизов, показало, что инактивация происходит при действии кристаллического химотрипсина, трипсина и пепсина, но папаин ее не вызывает [57].

2) ГОРМОН РОСТА (ГР, СОМАТОТРОПИН)

В результате клинических наблюдений над нарушением роста, которое является, вероятно, наиболее заметным результатом внутрисекреторной деятельности, давно уже стало ясно, что гипофиз имеет прямое отношение к ростовым процессам организма. Эти общие клинические наблюдения были подтверждены специальными опытами [44, 58, 59], убедительно доказавшими, что передняя доля гипофиза секретирует гормон, обладающий способностью стимулировать рост. Окончательным доказательством явилось выделение гормона в высокоочищенной кристаллической форме [60, 61]. Методы, применяемые в настоящее время для определения влияния ростового гормона, основываются на увеличении веса тела или ширины большой берцовой кости гипофизэктомированных крыс [62]. Последний тест является наиболее чувствительным и относительно надежным методом. Было показано, что, пользуясь им, можно определить специфическое действие даже 5 *мг* ростового гормона. Это примерно $^1/_{10}$ или $^1/_{20}$ часть того количества гормона, которое необходимо вводить гипофизэктомированной крысе в течение 10 дней, чтобы получить заметное увеличение ее веса.

От обычно используемых для получения гипофизарных гормонов желез животных различных видов гипофизы крупного рогатого скота отличаются наиболее высоким содержанием активного ростового гормона, причем экстракты, способствующие росту, могут быть получены как из солевых, так и из щелочных растворов. Частичная очистка гормона достигается фракционированным осаждением сульфатом натрия [63] или аммония [64]. Для получения ГР применяются также и адсорбционные методы [65, 66].

Наиболее целесообразная методика выделения гормона [60, 67] заключается в следующих операциях, проводимых в холодном помещении (2°). Иссеченные передние доли бычьих гипофизов измельчают и высушивают охлажденным ацетоном (—10°). Высушенный в ацетоне порошок экстрагируют в течение 24 час. раствором $Ca(OH)_2$ при pH 11,5; затем pH снижают до 8,7 пропусканием углекислого газа. К надосадочной жидкости прибавляют сульфат аммония до 2,0 *М* концентрации. Полученный осадок растворяют в воде и повторяют осаждение сульфатом аммония. Конечный осадок диализируют до удаления соли. Нерастворимое вещество, образовавшееся при диализе, растворяют в воде при pH 4,0. Раствор доводят до 0,10 *М* концентрации NaCl. Полученный осадок удаляют, а в надосадочном слое доводят концентрацию NaCl до 5,0 *М*. Фракционирование NaCl повторяют дважды. Окончательный осадок растворяют в воде и диализируют до удаления соли. pH тщательно диализированного раствора доводят до 5,7—5,8; осадок удаляют центрифугированием, а надосадочную жидкость подщелачивают до pH 8,7—8,8. Затем прозрачный раствор разводят 50-процентным этиловым спиртом сначала до 0,5-процентной, а потом до 5-процентной концентрации. Образовавшийся при центрифугировании осадок отбрасывают, а к центрифугату прибавляют этиловый спирт до 20-процентной концентрации. Фракционирование этиловым спиртом производят при 0°, кристаллический гормон роста выпадает в осадок из 20-процентного раствора этилового спирта.

Этим способом из 1 *кг* свежих передних долей гипофизных желез можно получить в среднем 1 *г* кристаллического белка гормона. Исследование растворимости, а также ультрацентрифугальные, диффузионные и электрофоретические испытания продукта не показали присутствия в нем загрязняющих компонентов, и полученные данные, по-видимому, свидетельствуют о том, что гормональный белок по существу является однородным. В той же лаборатории были проведены дальнейшие широкие испытания чистоты препарата. И хотя эта работа еще не закончена, уже полученные результаты согласуются с прежними данными, показывающими, что белок действительно является гормоном. Суточная доза 0,010 *мг* гормона вызывает у молодых гипофизэктомированных крыс 1-граммовое увеличение веса в сутки. Гормон способен стимулировать продолжение роста у нормальных взрослых или гипофизэктомированных крыс [68, 69]. Кроме того, биологические тесты показывают, что он практически не содержит примесей других гормонально-активных веществ передней доли гипофиза.

Гормон роста почти нерастворим в воде, а его изоэлектрическая точка соответствует pH 6,85. Он неустойчив при температуре кипения воды и более устойчив в щелочной, чем в кислой среде. Обработка иодом и ацетилирование уничтожают стимулирующую рост активность соматотропина [70, 71]. Это указывает на необхо-

димость наличия тирозиновых групп и свободных аминогрупп для осуществления его биологического действия.

Молекулярный вес гормона, судя по данным ультрацентрифугирования, равен 44 000 [67, 72]; он был вычислен по константе седиментации (3,1 S) и коэффициенту диффузии ($7{,}15 \cdot 10^{-7}$ $см^2/сек$). Дальнейшее изучение седиментации растворов соматотропина [67] показало, что в боратном буфере с pH 9,93 константа седиментации s_{20} увеличивается с повышением концентрации C (выраженной в процентах) в соответствии с уравнением

$$s_{20} = 3{,}19 + 0{,}22C.$$

Молекулярный вес, как и константы диффузии, был подсчитан по уравнению Сведберга; установлено, что он изменяется в зависимости от pH раствора. Из табл. 56 можно видеть, что молекулярный вес гормона изменяется значительно: в буфере с pH 2,32 он

Таблица 56

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС ГОРМОНА РОСТА В РАСТВОРАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ЗНАЧЕНИЯМИ pH (ПО ЛИ И ПЕДЕРСЕНУ [67])

pH	Константа седиментации $s_{20} \times 10^{13}$	Константа диффузии $\times 10^{7}$	Молекулярный вес $\times 10^{-3}$
2,32	3,13	6,37	50
9,93	3,19	7,19	45
11,50	2,21	7,67	29

несколько выше, чем в буфере с pH 9,93, но уменьшается с 45 000 до 29 000, если pH раствора возрастает до 11,50. Судя по этим данным, можно предположить, что соматотропный белок в растворах с pH 9,93 представляет собою смесь мономерной и димерной форм, тогда как при pH 11,50 седиментация имеет характер, типичный для белков исключительно мономерного строения.

Предварительные исследования [72a] показали, что молекулы соматотропного белка в ацетатном буфере с pH 4,0 проявляют тенденцию к ассоциированию, что обнаруживается по увеличению вязкости и уменьшению осмотического давления. Аналогичные наблюдения были сделаны Смитом с сотрудниками [73], которые исследовали осаждение гормона в ацетатном буфере и нашли, что половина его молекул имеет константу седиментации, равную 6,23 S, тогда как для другой половины эта величина равна 2,56 S. Недавно проведенные опыты показали, что, хотя в ацетатном буфере с pH 4,0 не выделяются какие-либо определенные компоненты, можно наблюдать более быстро седиментирующие частицы [67]. Далее было установлено, что причиной ассоциации молекул ростового гормона в растворе с pH 4,0 являются ацетатные ионы.

Гормон роста не содержит ни фосфора, ни углеводов, ни других неаминокислотных компонентов. Из данных табл. 57, в которой приведен аминокислотный состав гормона, видно, что он не отличается какими-либо особенностями: количество каждой из 17 аминокислот не выходит из ряда величин, обычно определяемых для других белков. Свыше 90% белкового азота приходится на азот известных аминокислот вместе с амидным азотом. Всю содержащуюся в белковой молекуле серу (1,3%) можно целиком отнести за счет цистина и метионина.

Гормон содержит 15,60% азота или 528 атомов азота на молекулу, если молекулярный вес принять равным 47 300 (см. табл. 58). Таким образом, можно подсчитать распределение азота по компонентам ГР.

Таблица 57

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ГИПОФИЗАРНОГО ГОРМОНА РОСТА[a] (молекулярный вес 46 800)

Компонент	Количество в 100 г белка, г	Азот, % от белкового азота	Минимальный молекулярный вес	Вероятное число остатков
Азот	15,65	—	—	—
Сера	1,3	—	—	—
Амидный азот	1,2	6,3	—	—
Аргинин	9,1	18,8	1914	24
Аспарагиновая кислота	9,0	6,1	1479	32
Цистин	2,5	1,7	10700	4
Глутаминовая кислота	13,0	7,9	1131	41
Глицин	3,8	4,5	1977	24
Гистидин	2,65	4,6	5853	8
Изолейцин	4,0	2,7	3275	14
Лейцин	12,1	8,3	1083	43
Лизин	7,1	8,7	2059	23
Метионин	2,9	1,7	5145	9
Фенилаланин	7,9	4,3	2091	22
Пролин	3,4	2,1	3600	13
Серин	5,7	4,9	1950	24
Треонин	6,1	4,6	2050	23
Триптофан	0,84	0,7	24309	2
Тирозин	5,20	2,6	3845	12
Валин	3,90	3,0	3003	16
Всего		93,5		334

[a] Неопубликованные данные.

Таблица 58

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА В ГОРМОНЕ РОСТА[a]

Азот	Количество в 100 *г* белка, *г*	Число атомов на молекулу
Общий	15,65	528
Амидный	1,20	41
Индола	0,059	2
Гуанидина	2,24	75
Имидазола	0,475	16
ε-Аминогрупп	0,680	23
Не альфа	4,654	157
Альфа	11,00	371
Свободный α-аминогрупп	0,06	2
Пептидный	10,94	369

[a] Неопубликованные данные.

Исходя из этих данных, а также из содержания свободного аминного азота (0,76%), можно определить, что количество свободного азота α-аминогрупп в ростовом гормоне равно 2 атомам на молекулу. Действительно, присутствие 2 свободных атомов аминного азота позднее подтвердилось анализом N-концевых групп, проведенным фтординитробензольным методом [74]. Выяснилось, что N-концевыми аминокислотами являются аланин и фенилаланин [75], которые присутствуют в гормоне в молярном отношении 1 : 1. Следовательно, белковая молекула соматотропина, имеющая 369 пептидных связей, состоит из двух открытых пептидных цепей с N-концевыми остатками аланина и фенилаланина.

Как уже упоминалось, биологическая активность ГР исчезает после переваривания пепсином или трипсином; однако недавно было установлено, что ограниченный гидролиз соматотропина кристаллическим химотрипсином не приводит к полной потере гормональной способности [76]. Если фермент с гормоном, взятые в отношении 1 : 200, инкубируются в течение различных сроков при 25° и pH 8,5, то, как показывает проба гидролизата, гормон сохраняет 50% первоначальной активности, когда степень гидролиза достигает 34%. Электрофорезом гидролизатов выявлено присутствие нового компонента с большей подвижностью, чем у гормона роста.

Аналогичные опыты, поставленные с карбоксипептидазой [76], дают основания считать, что С-концевые аминокислотные остатки (или остаток), возможно, не существенны для биологической активности гормона. Анализ небелкового азота в продуктах карбоксипеп-

тидазного расщепления, произведенный методом хроматографии на бумаге, показал, что главными компонентами, выделяющимися из гормонального белка в сколько-нибудь значительных количествах, являются аланин и фенилаланин.

Эти данные позволяют предполагать, что для осуществления гормонального действия необязательно нужна вся белковая молекула и что только некоторые части или ядро гормонального белка определяют его стимулирующую рост активность.

3) АДРЕНОКОРТИКОТРОПНЫЙ ГОРМОН (АКТГ, КОРТИКОТРОПИН)

Гипофизарный контроль над функцией коркового слоя надпочечников был окончательно доказан в 1930 г. Смитом [44], который показал, что гипофиз обладает адренокортикотропной активностью. Многие авторы, особенно Коллип, Ансельмино, Моррис, Бейтс и другие (для справки см. [110]), развивая открытие Смита, пытались очистить и выделить этот гормон, но не достигли успеха, и только в 1942—1943 гг. два коллектива исследователей [77—79], работавших независимо друг от друга, сообщили о приготовлении высокоочищенных гормональных белков из овечьих и свиных гипофизов. Эти белки не содержали примесей других гормонов передней доли гипофиза и оказывали избирательное стимулирующее действие на кору надпочечников гипофизэктомированных крыс; доказательством служило как увеличение веса надпочечников, так и восстановление их гистологической структуры. Тем самым было достоверно установлено существование адренокортикотропного гормона.

Более чувствительные аналитические методики, разработанные за последние несколько лет, позволили показать, что адренокортикотропные гормональные белки [77—79], которые ранее считались однородными на основании электрофоретических, седиментационных и диффузионных тестов и растворимости, не ведут себя как индивидуальные вещества при испытании их методами противоточного распределения и хроматографии. Хотя более ранние ультрацентрифугальные исследования [80—82] и указывали на то, что адренокортикотропная активность, возможно, связана с низкомолекулярным веществом, но совсем недавно было установлено, что АКТГ является по своей природе полипептидом и что этот полипептидный гормон влияет на обмен веществ человеческого организма [83—93]. Наиболее убедительным доказательством существования пептида, обладающего адренокортикотропной активностью, является тот факт, что частичное переваривание пепсином препаратов АКТГ не лишает их гормональной активности [83], тогда как при расщеплении другими протеолитическими ферментами адренокортикостимулирующая способность исчезает [73, 83, 84, 89].

Все разнообразные методы, которые были предложены для определения адренокортикотропной активности, основываются на про-

явлениях как прямого, так и непрямого действия АКТГ на нормальных или гипофизэктомированных животных. Прямое действие является первичным; оно следует непосредственно за введением гормона и осуществляется без участия кортикостероидных гормонов. Главные эффекты прямого действия, на которых основываются методики определения, заключаются в снижении содержания аскорбиновой кислоты и холестерина в надпочечниках, стабилизации веса надпочечников, их гипертрофии и гистологическом восстановлении. Образование и выделение кортикостероидов, следующее за введением АКТГ, является причиной непрямого действия, которое выражается в эозинопении, лимфопении, инволюции зобной железы и лимфатических узлов и т. п.

В последние годы в качестве показателя адренокортикотропной активности использовался главным образом тест уменьшения содержания аскорбиновой кислоты [94]. Однако многочисленные наблюдения как в лаборатории автора, так и в других лабораториях показывают, что существуют расхождения между показаниями адренокортикотропной активности, полученными при помощи этого теста и другими методами определения [95—98]. Возможно, затруднение частично заключается в том, что еще не выяснено, как содержание аскорбиновой кислоты связано с адреналовой функцией в целом. Во всяком случае, аскорбиновый тест сам по себе является недостаточным показателем при различных типах стимуляции коры надпочечников, и поэтому необходимо применять дополнительные методы, например измерение веса надпочечников (метод Муна [99]) и последовательное обследование зобной железы (Паркс с сотрудниками [100]).

Более ранние сообщения [83—85] о сохранении адренокортикотропной активности препаратами гормонального белка после частичного гидролиза пепсином были подтверждены в ряде лабораторий [87, 89—91]. Предпринимались попытки выделить из этих частичных гидролизатов активный компонент в чистой форме, и для этой цели предлагались различные методики. Лэш с сотрудниками [89], пользуясь методом противоточного распределения между фенолом и водой, содержащей различные количества эфира, получили в несколько раз более очищенную биологически активную фракцию.

Хроматографическое разделение на бумаге показало, что активный компонент адренокортикотропных пептидных смесей может быть выделен из наименее подвижного, реагирующего с нингидрином поля при использовании в качестве растворителя системы бутанол—уксусная кислота [101]. Это наблюдение подтвердили Уайт с сотрудниками [91], которые, применяя метод бумажной хроматографии, получили фракции, обладающие активностью примерно в 50 раз большей, чем стандарт. Анализ смещения проявленных участков один относительно другого показал, что активный компонент пептидной смеси интенсивно адсорбируется древесным углем [101].

Судя по прежним опытам [101] хроматографический метод смещения носителя по Тизелиусу и Хагдалу [102] легко применить для очистки адренокортикотропной пептидной смеси при использовании в качестве носителей нормальных спиртов с 8—10 углеродными атомами. Несколько модифицированный метод позволяет количественно восстановить биологическую активность и получить фракции, в 10—20 раз более активные, чем исходный материал [103].

Пэйн с сотрудниками [104] недавно опубликовали подробное описание методик, которыми они пользовались для приготовления высокоактивных фракций АКТГ из высушенных в ацетоне свиных гипофизов. Способ экстракции уксусной кислотой сходен с примененным Каммом [105] для фракционирования экстрактов задней доли гипофиза. По этому способу начальную экстракцию производят ледяной уксусной кислотой при 70°, а последующее фракционирование—ацетоном и эфиром. Активное вещество адсорбируется порошковой целлюлозой и элюируется соляной кислотой. Позже Аствуд с сотрудниками [106] добились увеличения чистоты препарата в 20—80 раз, применяя адсорбцию оксицеллюлозой с последующей элюцией. Сочетание экстракции ледяной уксусной кислотой высушенных в ацетоне свиных аденогипофизов и адсорбции оксицеллюлозой является наиболее простым методом получения высокоактивного вещества в значительных количествах [107].

Ниже описывается довольно простой способ, применяя который можно получать из овечьих, свиных и лошадиных гипофизов достаточные количества биологически чистого и клинически активного АКТГ [108, 110]; сочетание этой методики с оксицеллюлозной методикой Аствуда [106] дает эффективный способ приготовления высокоактивных препаратов адренокортикотропного гормона. Цельные замороженные овечьи гипофизы (1 *кг*) мелко размалывают и экстрагируют в течение часа 4,1 *л* кислотно-ацетонового раствора при энергичном перемешивании. Смесь фильтруют, и остаток снова экстрагируют 2 *л* 80-процентного ацетона. После удаления остатка фильтрованием объединенные экстракты вливают в холодный ацетон (30 *л*). Образовавшийся осадок после повторного промывания ацетоном высушивают в вакууме. Продукт, приготовленный таким образом, называют «кислотно-ацетоновым порошком». Из 1 *кг* желез получается в среднем 35 *г* этого порошка.

Затем 20 *г* «кислотно-ацетонового порошка» растворяют в 940 *мл* воды и pH доводят до 3,0. Насыщенный раствор NaCl (60 *мл*) прибавляют по каплям при непрерывном перемешивании; образовавшийся осадок отделяют центрифугированием и сохраняют для выделения лактогенного гормона. Центрифугат доводят до насыщения, растворяют в 100 *мл* воды и диализируют против проточной воды до удаления соли. Диализированный раствор замораживают и высушивают в вакууме; выход продукта равен 4 *г*. Получающийся очищенный АКТГ белок назван препаратом *D*. Следующий этап обработ-

ки представляет процесс, описанный Аствудом с сотрудниками [106]. Препарат *D* (8 *г*) растворяют в 250 *мл* 0,1 *М* уксусной кислоты; pH раствора должно быть 3,5—4,0. Прибавляют 1 *г* промытой оксицеллюлозы; смесь перемешивают 36 час. при комнатной температуре и затем выдерживают несколько часов при 0°. Бóльшую часть прозрачной надосадочной жидкости сливают; остаток дважды промывают дистиллированной водой и экстрагируют при комнатной температуре в течение 12 час. 100 *мл* 0,1 *М* HCl при постоянном перемешивании. Смесь фильтруют, фильтрат диализируют против дистиллированной воды до удаления HCl. Лиофилизация диализированного раствора дает 250—300 *мг* белого порошка с активностью 50—100 *ед.* У.С.А./*мг*, как было определено по уменьшению содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках. Продукт, полученный вышеописанным способом, обладает также способностью сохранять стабильный вес надпочечников у гипофизэктомированных крыс и фактически почти полностью заменяет адренокортикотропный гормон. Препарат не диализирует через целлюлозную мембрану (фирмы «Вискинг»); его константа седиментации s_{20} равна 0,8 *S*. Эти данные делают вполне обоснованным предположение, что средний молекулярный вес препарата близок к 10 000. При помощи электрофореза на фильтровальной бумаге было определено, что изоэлектрическая точка активного компонента выше pH 7. Далее удалось показать, что гидролиз пепсином и кислотой не уменьшает его адренокортикотропной активности. Недавно Уайт [91, а, б] сообщил о выделении фракции АКТГ из негидролизованных экстрактов свиных гипофизов; процесс извлечения включал ионообменную хроматографию на колонке и методику противоточного распределения.

Для дальнейшей очистки продуктов переваривания пепсином высокоактивных препаратов АКТГ были разработаны различные методики [111, 112]. Бринк с сотрудниками [111, 111а] недавно получили из свиного гормонального препарата адренокортикотропную фракцию, названную кортикотропином В, которая обладала активностью 300 *ед/мг* и вела себя как гомогенный компонент при противоточном распределении через 450 переносов в системе *втор*-бутиловый спирт—трихлоруксусная кислота. Порат и Ли [112] подвергли продукты переваривания пепсином овечьих препаратов вытеснительной хроматографии на древесном угле и получили таким образом фракцию, обладавшую почти такой же активностью, как фракция, о которой сообщает группа сотрудников фирмы Мерка, но она не была гомогенной при других методах разделения.

Хотя адренокортикотропный гормон еще не выделен в чистом виде, нет сомнений в том, что он является полипептидом с изоэлектрической точкой, соответствующей pH~7. Цистин, треонин и изолейцин не были обнаружены в наиболее чистых препаратах, полученных в лаборатории автора. Гормональная активность легко

разрушается окислением, но в кислых растворах препараты исключительно устойчивы. Пока еще трудно объяснить тот факт, что частичный кислотный гидролиз препаратов АКТГ иногда вызывает интенсификацию их аскорбиноуменьшающей активности. Реакции с кетеном, азотистой кислотой и уксусным ангидридом показывают, что наличие свободных аминогрупп существенно важно для активности гормона

3. ГОНАДОТРОПИНЫ МОЧИ И СЫВОРОТКИ

Кроме гипофиза, гонадотропины встречаются в крови и моче здоровых людей обоего пола и женщин в менопаузе, а также в жидкостях и тканях организма, когда в нем присутствует живая хориальная ткань. Эти гонадотропные гормоны служили объектами многочисленных физиологических исследований, но вполне определенно установлена химическая природа только двух из них—гонадотропного гормона хориальной ткани женщин (ГГХТЖ) и гонадотропного гормона сыворотки жеребой кобылы (ГГСЖК).

А. Гонадотропин хориальной ткани женщин

Гонадотропное начало в моче беременных женщин было впервые обнаружено Ашгеймом и Цондеком в 1927 г. [113]. Браун и Виннинг [114] в 1936 г. констатировали, что концентрация экскретируемого с мочой хориального гонадотропина достигает максимума в период между 60-м и 80-м днями беременности. Последующее уменьшение количества выводимого с мочой гонадотропного гормона хориальной ткани, происходящее по мере развития беременности, связывали с исчезновением клеток Лангерганса [115, 116]. Эти факты сразу привели к предположению, что гормон образуется в плаценте; первые экспериментальные доказательства, подтвердившие эту гипотезу, были получены в результате исследований Коллипа [117] и Кидо [118]. Основываясь на этих данных, Ашейм и Цондек предложили биологический тест беременности, основанный на обнаружении гонадотропного гормона в моче [113, 119].

Впоследствии было разработано много методов концентрации хориального гонадотропина из мочи беременных женщин. Катцман и Дойзи [120] применяли бензойную кислоту в качестве адсорбента и получали таким образом высокоактивные препараты ГГХТЖ. Позже Гурин с сотрудниками [121] приготовили высокоочищенный препарат, который вел себя как однородное вещество при электрофорезе, ультрацентрифугировании и диффузии и обладал активностью 6000—8000 И.Е./*мг*. Процесс извлечения, проводимый при 0,5°, заключался в следующем. Мочу женщин со сроком беременности от 50-го до 90-го дня, считая от последней менструации, обрабатывали бензойной кислотой; бензойную кислоту из осадка удаляли ацетоном, а нерастворимый остаток высушивали. Выход продукта

составлял приблизительно 500 *мг* на литр мочи. Затем остаток экстрагировали 50-процентным этиловым спиртом при pH 6,0 и экстракт обрабатывали холодным абсолютным этиловым спиртом (1 : 2) для осаждения гормона. Спиртовый осадок экстрагировали 3—4 раза при 30-минутном размешивании с порциями 1—2 *мл* 0,3 *М* буфера (ацетат натрия—уксусная кислота) в 50-процентном этиловом спирте при pH 4,8. После центрифугирования объединенные экстракты осаждали равным объемом холодного абсолютного спирта и охлаждали в течение нескольких часов. Выход осадка после высушивания составлял примерно 8 *мг* на литр мочи. Навеску 100 *мг* этого вещества растворяли в 2 *мл* ледяной воды, pH раствора доводили примерно до 5. Жидкость энергично взбалтывали в течение 2 час. с 0,5 *мл* хлороформа и полученную эмульсию несколько раз промывали водой (0,5 *мл*). Объединенные прозрачные водные растворы диализировали и высушивали.

Катцман с сотрудниками [122], применяя хроматографическую адсорбцию пермутитом с последующей элюцией 10-процентным раствором ацетата аммония в разведенном водой спирте, получили продукт с такой же биологической активностью, как и препарат Гурина; Клейссон с сотрудниками [123] описали метод кристаллизации электрофоретически однородного препарата ГГХТЖ, активность которого была определена в 10 000 И.Е./*мг*. Краткое описание применявшегося ими метода дается ниже.

Активное начало из мочи беременных женщин, срок беременности которых не превышал 3 мес., адсорбировали бензойной кислотой по методу, аналогичному описанному Катцманом и Дойзи [120]. После экстракции ацетоном остаток смешивали с *М*/15 ацетатным буфером, pH которого равно 4,8. К полученному экстракту прибавляли этиловый спирт в таком количестве, чтобы концентрация его достигала 85%. После центрифугирования осадок повторно экстрагировали буфером и снова осаждали 85-процентным этиловым спиртом. На этой стадии обработки из 1 *л* мочи было получено 25—30 *мг* очищенного ГГХТЖ с активностью 4000—6000 И.Е./*мг*. Это вещество (500 *мг*) растворяли в 50 *мл* *М*/75 фосфатного буфера с pH 7,4. После удаления нерастворимого остатка прибавляли по каплям 10-процентный водный раствор протамина до тех пор, пока не прекращалось образование осадка. Протаминовый осадок отбрасывали, pH прозрачной надосадочной жидкости доводили до 3,5 и прибавляли к ней спиртовый раствор, содержащий 5% *м*-крезола, в таком количестве, чтобы концентрация этилового спирта достигала 50%. После 2-часового отстаивания концентрацию этилового спирта увеличивали до 60%. Сначала гормон выпадал в осадок как аморфное вещество, но через 24 часа он начинал кристаллизоваться в виде длинных тонких палочек или игл.

Молекулярный вес хориального гонадотропина, определенный по ультрацентрифугальным и диффузионным данным, равен 10 000

[124]. Содержание азота составляет 12,03% [125]. Аминокислотный состав количественно не определен, но установлено, что присутствуют тирозин, гистидин, аргинин и триптофан. Поскольку цистин не обнаружен, а гормон содержит 1,96% серы, можно предположить, что в его состав должно входить большое количество метионина. Углевод, входящий в молекулу гормона, был идентифицирован как галактоза [125]; было показано, что присутствует также и гексозамин, хотя он и не был специально идентифицирован. Отношение галактозы к гексозамину равно 2 : 1.

ГГХТЖ устойчив в сухом состоянии. Он растворим в воде и нерастворим в обычных органических растворителях. Гормон осаждается 70-процентным спиртом или ацетоном из нейтральных или слегка кислых растворов; фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты также осаждают его, хотя обычные осадители белка не эффективны. В водных растворах гонадотропная активность уничтожается нагреванием и значительным изменением реакции среды в кислую или щелочную сторону. Трипсин, химотрипсин, папаин и препараты ферментов слюны разрушают его активность [125], но, судя по более ранним исследованиям, гормон устойчив к перевариванию пепсином [127, 128]. Обработка кетеном вызывает медленную инактивацию [129], и, как показывает сравнение этой реакции с реакциями кетена с другими белками, уменьшение активности является, вероятно, следствием ацетилирования фенольных групп тирозина. Активность гормона не изменяется при действии 0,1 н. азотистой кислоты при 2° и лишь незначительно изменяется при действии 0,5 н. кислоты [130]; основываясь на этих данных, можно сделать вывод о том, что свободные аминогруппы не имеют существенного значения для гонадотропного действия препарата.

Хориальный гонадотропин отличается по своим биологическим свойствам от гипофизарных гонадотропинов [131]. Его стимулирующее влияние на увеличение веса яичников в остром опыте более ограничено, чем влияние гипофизарных препаратов. ГГХТЖ не вызывает развития фолликулов у гипофизэктомированных крыс, и его воздействие на женские половые железы сказывается только в восстановлении интерстициальной ткани. У самцов крыс, лишенных гипофиза, введение хориального гонадотропина сохраняет сперматогенный эпителий и поддерживает ткань Лейдига в функционирующем состоянии. В некоторых отношениях ГГХТЖ очень похож на гипофизарный ГСИК, но между ними имеются и определенные различия. Например, ГГХТЖ вызывает гонадотропную реакцию у нормальных не достигших половой зрелости крыс, в то время как ГСИК не оказывает на них гонадостимулирующего действия. С другой стороны, ГСИК вызывает увеличение семенников у петушков и голубей, а к хориальному гонадотропному гормону их половые железы нечувствительны [132].

Б. Гонадотропный гормон сыворотки жеребой кобылы

В 1930 г. Коул и Харт [133] открыли гонадостимулирующий гормон в крови жеребых кобыл. Позже было установлено, что этот гормон впервые появляется в крови между 37-м и 43-м днями жеребости, и содержание его увеличивается до 100-го дня [134]. Коул также показал [135], что концентрация гормона в крови некоторых пони выше, чем у лошадей крупных пород. Вначале полагали, что это гормон гипофизарного происхождения, но Кетчпол и Лайонс [136] после дополнительных исследований приписали его образование хориальным эпителиальным клеткам. Позднее опыты Коула и Госса [137] привели к предположению, что местом образования гормона является эндометрий матки.

Поскольку биологическое действие ГГСЖК сходно с действием искусственной смеси фолликулостимулирующего гормона и гормона, стимулирующего интерстициальную ткань [138], вначале считали, что он состоит из двух гонадотропных компонентов и может быть разделен на фолликулостимулирующую и лютеинизирующую фракции. Однако данные, полученные Коулом с сотрудниками [139], по-видимому, окончательно доказали, что гонадотропная активность сыворотки жеребой кобылы зависит от одного гонадотропина.

Первую попытку очистить ГГСЖК предприняли Госс и Коул [140], которые нашли, что активное начало не способно к диализу и может быть выделено фракционным осаждением сульфатом натрия. Для дальнейшей очистки впоследствии были предложены различные методики; высокоочищенный препарат ГГСЖК, активность которого была определена в 7000 И.Е./*мг* белка, был получен Госсом и Коулом [141], которые модифицировали метод Кертленда и Нельсона [142], основанный на фракционном осаждении ацетоном и спиртом при различных значениях pH среды.

Их метод заключался в следующем. pH сыворотки доводят до 9 и к ней медленно при энергичном перемешивании прибавляют ацетон в количестве, равном 95% первоначального объема сыворотки. Осажденные белки оставляют стоять при комнатной температуре 12—18 час., а затем отделяют под прессом при помощи фланелевых фильтров. Спрессованный осадок промывают один раз 50-процентным ацетоном (удельный вес 0,937 при 20°), объем которого равен первоначальному объему сыворотки, снова отжимают под прессом и отбрасывают. Объединенные фильтраты осторожно доводят до 50-процентной концентрации ацетона и прибавляют разбавленную соляную кислоту до pH 6,0; затем раствор оставляют стоять на ночь при 2°. Образующийся неактивный осадок лучше всего удалить ультрацентрифугированием. Фильтрат доводят до 70-процентной концентрации ацетона и оставляют отстаиваться при 2° на 2—4 дня. Получившийся осадок удаляют центрифугированием и размешивают в 40-процентном нейтральном ацетоне, объем которого равен $^1/_{15}$ пер-

воначального объема сыворотки. Вещество, оставшееся нерастворенным, может захватить часть активного начала, и его можно, если это желательно, обработать для получения менее активных препаратов. Нерастворенное вещество отделяют центрифугированием, а прозрачный центрифугат осторожно доводят до 50-процентной концентрации ацетона и pH 5,5. Образовавшийся осадок тщательно отделяют и отбрасывают. Раствор подкисляют до pH 4,5, после чего активное вещество выпадает в виде легкого осадка, который отделяют центрифугированием после выдерживания смеси на холоде. Полученное вещество можно размешать в дистиллированной воде и лиофилизовать.

Препарат, приготовленный вышеописанным способом, при электрофорезе [143] в буферных растворах с различными значениями pH дает одну границу раздела, что указывает на высокую степень его чистоты.

Несколько более активный препарат (12 500 И.Е./*мг*) был получен Раймингтоном и Роулендсом [144], которые применяли этиловый спирт различных концентраций при разных значениях pH. Из 5,5 *л* сыворотки жеребых кобыл получалось приблизительно 20 *мг* активного вещества.

Из опубликованных работ следует, что ГГСЖК содержит 10,6% общего азота и 0,46% аминного азота [143]. Содержание серы находится в пределах 0,50—0,85% [145]. Анализ некоторых аминокислот дал следующие величины: 3,54% тирозина, 1,37% триптофана [143], 8,8% лизина, 2,1% аргинина и 3,25% гистидина [146]. Если принять, что гормон совсем не содержит цистеина, то количество цистина составляет 1,96—2,78% [145]. Подобно другим гонадотропинам, ГГСЖК является глюкопротеидом; в его состав входит 17,6% гексозы, а отношение гексозы к гексозамину равно 2 : 1 [144, 147].

Таблица 59

СОДЕРЖАНИЕ УГЛЕВОДОВ В ГОНАДОТРОПИНАХ
(по данным Ли [18])

Гонадотропины	Гексоза, %	Гексозамин, %	Гексоза/гексозамин
Хориальной ткани женщины . . .	10,7	5,2	2,0
Сыворотки жеребой кобылы . . .	17,6	8,4	2,1
Гормон, стимулирующий интерстициальные клетки (овца) . .	5,8	4,5	1,3
Гормон, стимулирующий интерстициальные клетки (свинья)	2,8	2,2	1,3
Фолликулостимулирующий гормон (овца)	1,2	1,5	0,8

Пользуясь табл. 59, можно сравнить содержание углеводов в различных гонадотропных гормонах.

Гормон проявляет бо́льшую устойчивость к нагреванию в нейтральных или слегка щелочных растворах. В воздухе, кислороде или азоте скорость инактивации почти не изменяется, и, следовательно, не окисление является причиной деструкции. ГГСЖК подвергается инактивации и в сухом состоянии, чем он отличается от большинства белковых веществ.

Активность ГГСЖК уничтожается кетеном [148], азотистой кислотой [149] и формальдегидом [142, 150]. Длительная обработка большими количествами цистеина приводит к полной инактивации [145, 151]. Что касается других восстанавливающих агентов, то изучение их влияния [145] показало, что восстановление дисульфидных связей в молекуле гормона приводит к потере гонадотропной активности. Гормон инактивируется трипсином [140, 142, 146], пепсином, химотрипсином, папаином и карбоксипептидазой [146].

4. ГОРМОНЫ ЗАДНЕЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА

Первые наблюдения над действием экстрактов из задней доли гипофиза, повышающих кровяное давление, были сделаны около 50 лет назад Оливером и Шефером [152] и Хоуэллом [153]. С тех пор было установлено, что непосредственным свойством активного начала (или активных начал) задней доли гипофиза является способность оказывать физиологическое действие в трех определенных направлениях: а) влиять на кровяное давление у млекопитающих (прессорная активность); б) влиять на мускулатуру матки (окситоцический эффект); в) влиять на скорость мочеотделения (антидиуретический эффект). В 1928 г. Камм с сотрудниками [154] получили две отдельные фракции из уксуснокислой вытяжки задней доли гипофиза. Первая фракция (окситоцин) оказывала стимулирующее действие на мускулатуру матки и вызывала резкое падение кровяного давления в депрессорном тесте на цыплятах; вторая фракция (вазопрессин) оказывала тонизирующее действие на гладкие мышцы и повышала содержание сахара в крови. Как сообщают Стейл и Фрезер [155], обе фракции можно получить аналогичными методами с применением смесей спирта и этилацетата. Ирвинг с сотрудниками [156] также добились значительной степени разделения при помощи электрофореза. Аппарат, который они сконструировали, состоит из стеклянной трубки с закрытыми концами, разделенной сплавленными со стеклом мембранами на пять камер (камера I—анод, камера V—катод). Ртутные резервуары, соединенные с крайними камерами, служат для предотвращения электроосмотического тока воды. Камеру I наполняли 0,01 н. раствором NaOH, а остальные—дистиллированной водой. После того как вещество задней доли подвергалось электрофорезу в течение 28 час. при напряжении 600—3000 *в*,

раствор в камере II подкисляли уксусной кислотой (pH 4,5) и выпаривали досуха в вакууме при 40°. Остаток растворяли примерно в 2 *мл* 98-процентной уксусной кислоты, и активное вещество осаждали прибавлением 25 объемов эфира, не содержащего перекиси. Осадок после центрифугирования дважды промывали эфиром и в результате получали белый аморфный порошок. Контрольный опыт с использованием химически очищенной прессорной фракции (142 *мг*) в водном растворе показал, что в конце процесса разделения около 70% исходной прессорной активности находилось в камере II. Фракция, выделенная из этой камеры, весила 40 *мг*, а ее активность была определена в 198 прессорных и 26 окситоцических единиц на 1 *мг*.

Все фракции, богатые вазопрессином, обладают и антидиуретической активностью; однако пока еще не удалось получить фракцию, оказывающую исключительно антидиуретическое действие и не содержащую какой бы то ни было прессорной активности. Является ли антидиуретический эффект свойством отдельного начала, должны выяснить дальнейшие исследования.

В течение ряда лет Абель с сотрудниками [157, 158] утверждали, что все физиологические действия задней доли гипофиза обусловлены одним гормональным веществом. Гипотеза, предполагающая, что этот «истинный» гормон может быть «единым» веществом, обусловливающим все физиологические эффекты, получила поддержку в работе Розенфельда [158а] и Ван-Дейка [159]. Вполне возможно, что отдельные начала, подвижно связанные вместе инертным, но специфичным компонентом (белком?), образуют одно вещество внутри клеток железы или даже в водных вытяжках. Если это так, то активные начала, выделенные Каммом, являются продуктами расщепления исходной молекулы в процессе обработки.

А. Биологическое определение

Окситоцическая активность может быть определена как по реакции изолированной матки морской свинки, так и по депрессорному действию на кровяное давление птиц. Первый метод основывается на интенсивности сокращений рога девственной матки морской свинки, помещенной в ванночку с раствором Тироде [160], тогда как в другом тесте используется скоропреходящее падение кровяного давления, которое наблюдается у кур породы «белый легхорн» при инъекции окситоцина [161]. Второй метод, являясь более быстрым и простым, в последние годы получил широкое распространение.

Для определения антидиуретической активности требуются крысы, получившие водную нагрузку [162, 163]. Для этого две порции воды (из расчета 5 *мл* на 100 *г* веса), подогретой до температуры тела, вводят через желудочную фистулу или посредством интраперитониального впрыскивания через часовые интервалы крысе,

находящейся в индивидуальной камере для исследования обмена. Через час после введения второй порции воды измеряют количество мочи. Процент воды, выведенной через 90 мин. после инъекции пробного раствора, принимают за меру определяемой активности. Методику для определения антидиуретического начала в крови и моче разработали Штейн с сотрудниками [163а].

Активность экстрактов из задней доли гипофиза выражается в международных единицах. Международная единица определяется как активность 0,5 *мг* порошка, приготовленного из высушенной в ацетоне ткани задней доли бычьего гипофиза, которая измерена методами, основанными на проявлении любого из трех физиологических действий гормона. Экстракты приготовляют посредством кипячения порошка в течение нескольких минут с 0,2-процентным раствором уксусной кислоты.

Б. Приготовление неочищенных экстрактов

Вытяжки, обладающие всеми свойствами активных веществ задней доли гипофиза, можно получить просто путем экстрагирования обезвоженных и обезжиренных задних частей гипофизов свиней или крупного рогатого скота горячим 25-процентным водным раствором уксусной кислоты [154]. 100 *г* продажного обезвоженного ацетоном вещества железы экстрагируют в течение 30 мин. 10 *л* горячей (95°) 0,25-процентной уксусной кислоты. Остаток отфильтровывают, а фильтрат концентрируют при низкой температуре до 1 *л* при помощи потока теплого воздуха или в вакууме при 40°. Концентрированный экстракт обрабатывают сульфатом аммония (550 *г*). Осадок отфильтровывают и высушивают. Продукт высаливания вновь экстрагируют последовательными порциями ледяной уксусной кислоты так, чтобы общий объем был равен 500 *мл*. Затем к объединенным уксуснокислым экстрактам прибавляют смесь из 1250 *мл* эфира и 2500 *мл* петролейного эфира (или гексана). Осадок отфильтровывают, промывают эфиром и высушивают. Всего получается 5—10 *г* вещества, сохраняющего 80—90% первоначальной активности. Таким образом, 1 *мг* конечного продукта содержит приблизительно 10 ед. как прессорной, так и окситоцической активности.

В. Частичное разделение окситоцина и вазопрессина

Частичное разделение этих двух фракций легко достигается (см. табл. 60) последовательным прибавлением ацетона, эфира, и петролейного эфира к 98-процентному уксуснокислому раствору вещества, полученного описанным выше способом [154]. Из таблицы видно, что из 1 *кг* высушенной ткани задней доли гипофиза можно получить приблизительно по 2 *г* каждой фракции (прессорной и

Таблица 60

МЕТОД ОЧИСТКИ ПО КАММУ [154]

Фракция	Вес, *г*	Процедура	Активность, *единиц/мг*		Общая активность, %	
			прессорная	окситоцическая	прессорная	окситоцическая
А	1000	Обезвоженные ацетоном задние доли гипофиза Экстрагируют горячей 0,25-процентной уксусной кислотой; экстракт концентрируют; насыщают $(NH_4)_2SO_4$	1	1	100	100
		↓				
Б		Высушенный осадок Экстрагируют ледяной уксусной кислотой; к экстракту прибавляют эфир и петролейный эфир				
		↓				
В	68	Осадок Растворяют в 98-процентной уксусной кислоте; прибавляют эфир; операцию повторяют еще раз	11	12	75	82
		↓				
Г	63	Осадок Растворяют в 98-процентной уксусной кислоте; фракционно осаждают ацетоном и эфиром для получения нескольких осадков	10	7	63	44
		↓				
Д	5,9	Наиболее активный осадок Растворяют в 98-процентной уксусной кислоте; фракционно осаждают ацетоном и эфиром, как указано выше	62	14	37	8,3
		↓				
Е (прессорная)	2,0	Наиболее активный осадок	80	15	16	3,0
		↓				
		Исходный эфиро-уксусный раствор обрабатывают очень малым количеством воды и избыточным количеством петролейного эфира				
		↓				
Ж (окситоцическая)	2,4	Клеевидный осадок	6	160	1,5	38

окситоцической). Если обе эти фракции подвергнуть дальнейшей обработке, то они могут дать соответственно прессорную фракцию с активностью в 100 прессорных и менее 5 окситоцических единиц на 1 *мг* и окситоцическую фракцию с активностью 200 окситоцических ед./*мг* и следами прессорной активности. Стел и Фрезер [155] и Ирвинг с сотрудниками [156] добились почти такой же степени очистки.

Для получения прессорных или окситоцических концентратов из экстракта задней доли гипофиза были применены различные адсорбционные методы. Германский патент [164] рекомендует для приготовления концентрированного препарата использовать адсорбцию прессорного начала бентонитом с последующей элюцией адсорбированного вещества слабой щелочью. Галленд и Ньютон [165], которые пользовались в качестве адсорбента древесным углем, добились некоторого успеха в очистке окситоцической фракции. Поттс и Геллегер [166] установили, что цеолиты предпочтительно адсорбируют вазопрессин, и на основании этого наблюдения они разработали довольно простую методику для получения высокоактивных и почти чистых препаратов. Эти авторы использовали искусственный цеолит, называемый декальсо; его коммерческое наименование «пермутит по Фолину». Применявшаяся методика настолько проста, что с ее помощью можно легко получать большие количества концентрированных препаратов. Процесс извлечения по Поттсу и Геллегеру проводился следующим образом. Навеску 105 *г* обезвоженного ацетоном порошка задней доли гипофиза растирали с 3 *л* бидистиллированной воды и фильтровали с помощью ячейки «Гифло супер». Большая пермутитовая колонка содержала 1 *кг* адсорбента. Гипофизарный экстракт проходил через колонку под действием силы тяжести, а вслед за ним пропускали 3-литровую порцию воды. Оба фильтрата соединяли; выяснено, что они содержат главным образом окситоцин. Затем колонку промывали 4 *л* 10-процентного раствора NaCl; элюент обладал прессорной активностью. Повторяя эту процедуру, Поттс и Геллегер получили прессорную фракцию с активностью 450 ед./*мг* и окситоцическую фракцию, активность которой равнялась 700 ед./*мг*.

Изучение физико-химических свойств активных фракций, полученных различными методами, выявило интересные данные, по которым можно предположить, что обе фракции, вероятно, являются полипептидами с молекулярным весом 500—2000. Прессорный компонент обладает более щелочным характером, чем окситоцический; изоэлектрические точки обеих фракций лежат, вероятно, выше pH 8. Оба компонента содержат серу; имеются указания, что восстановление дисульфидных групп не уничтожает их биологической активности.

Г. Выделение и свойства окситоцина

Как недавно сообщили Дю Виньо с сотрудниками [168, 169], препарат окситоцического фактора высокой степени чистоты можно получить, пользуясь методом противоточного распределения Крега [167]. Из исходного материала с активностью 20 ед./*мг* получен продукт, обладающий активностью 850 ед./*мг*. В процессе выделения, основанном на разнице в распределении активного начала и твердого вещества между *втор*-бутиловым спиртом и 0,05-процентной уксусной кислотой, использовали окситоцический концентрат Камма [154]. 10 *г* порошка с активностью 7—10 ед./*мг* обрабатывали по методу Камма для разделения прессорного и окситоцического факторов. Клеевидное вещество, получающееся при осаждении гексаном окситоцической фракции, размешивали в 25 *мл* воды, затем экстрагировали *втор*-бутиловым спиртом; экстракт промывали 2 *М* фосфатным буфером с pH 6,8, высушивали, концентрировали и лиофилизировали. Полученное вещество распределялось между *втор*-бутиловым спиртом и 0,05-процентной уксусной кислотой при 53 переносах; твердое вещество из пробирок, обладавших максимальной активностью, подвергали еще 100 дополнительным переносам. Вещества из содержащих максимальную активность пробирок, имеющие коэффициент распределения 0,4, объединяли; пробы показали, что они обладают активностью приблизительно в 500 *ед.* У.С.А./*мг* [169а]. Дальнейшие исследования окситоцина методом противоточного распределения, проведенные Пирсом, Гордоном и Дю Виньо [169а] в системе 0,05-процентная уксусная кислота—*втор*-бутиловый спирт, подвергавшейся 1000-переносному распределению, и в системе разбавленный раствор аммиака—*втор*-бутиловый спирт, подвергавшейся 110-переносному распределению, дали основание полагать, что препарат является чистым веществом.

Для чистого окситоцина были получены следующие аналитические данные (с поправкой на влажность): C 50,12%, H 6,84%, N 16,12%, S 6,15% и зола 0,11%. Анализ на крахмальной колонке по Муру и Штейну [170, 171] показал, что присутствуют следующие аминокислоты (в отношении 1 : 1): лейцин, изолейцин, тирозин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глицин и цистин. Молярное отношение аммиака к аминокислотам составляло 3 : 1. Исходя из этих данных и предполагая, что аминокислоты соединены пептидной связью, а аммиак—амидной, Пирс и Дю Виньо [172] определили молекулярный вес окситоцина равным 1025. Путем электрофоретических исследований, проведенных методом зонального электрофореза с применением фильтровальной бумаги и крахмала в качестве опорной среды, было установлено, что изоэлектрическая точка окситоцина соответствует pH 7,7 [172а].

Мюллер с сотрудниками [173] изучали эффект окисления окситоцина надмуравьиной кислотой. Они установили, что при этой реак-

ции не освобождались ни свободная цистеиновая кислота, ни амид цистеиновой кислоты; однако окисление, несомненно, происходило, так как в гидролизате обработанного вещества присутствовало 2 моля цистеиновой кислоты на каждый моль цистина исходного препарата. Эти данные как будто бы указывают на то, что в структуре прямой пептидной цепи цистин не занимает концевого положения. Поскольку методом противоточного распределения не удается выявить в окисленном окситоцине более одного компонента, то кажется маловероятным, что окситоцин может быть построен из двух пептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. Тарнер с сотрудниками [174], занимавшиеся дальнейшим изучением этого вопроса, проводили опыты по десульфурированию при помощи никеля Ренея. На основании более ранних исследований ожидалось, что десульфурирование приведет к замещению исходного цистеинового остатка двумя аланиновыми остатками, и, кроме того, если цистин не находится на конце открытой цепи, выделение свободного аланина не должно иметь места. Результаты опыта подтвердили это предположение: в обработанном препарате обнаружено 2 дополнительных моля аланина на моль цистина необработанного окситоцина, а сам препарат казался единым веществом, когда его подвергали противоточному распределению и хроматографическим испытаниям. И поскольку препараты окситоцина ведут себя как однородные вещества как после окисления, так и после десульфурирования, то, по всей вероятности, дисульфидные мостики цистина включены в циклопептидную структуру.

Деволл с сотрудниками [176] применили к препаратам окситоцина и десульфурированного окситоцина методики для определения свободных аминогрупп в пептидах и белках—динитрофторбензольный метод Сангера [74] и N-дитиокарбоксильный метод Леви [175]. Эти реагенты действуют на тирозин и цистин, а также на аланин в случае десульфурированного гормона. Судя по результатам, тирозин и цистин находятся в N-концевых частях молекулы.

Фромажо с сотрудниками, самостоятельно получившие высокоактивный препарат окситоцина, в своем сообщении [177] приводят доказательства, которые поддерживают представление об окситоцине как о циклическом полипептиде. По данным Дю Виньо, Фромажо и других можно представить себе, что окситоцин имеет кольцевое строение, а в N-концевых группах молекулы находятся тирозиновый остаток и половина цистинового остатка.

Д. Выделение и свойства вазопрессина

Высокоактивный вазопрессин недавно удалось выделить двум коллективам исследователей [178, 179]. Дю Виньо с сотрудниками приготовляли свой исходный материал (активность 40—70 ед./*мг*)

по методу Камма [154], дающего частичное разделение прессорного и окситоцического факторов. Препараты вазопрессина подвергались противоточному распределению (380 переносов) при температуре 10—13° в системе *втор*-бутиловый спирт—0,05-процентный водный раствор уксусной кислоты. Пробирки, наиболее богатые активным фактором, содержали вещество, активность которого измерялась в 200 ед./*мг*. Это вещество вновь подвергали распределению (100 переносов) в системе *н*-бутиловый спирт—*п*-толуолсульфокислота; прессорноактивное вещество обнаруживалось в пробирке 55 и соседних пробирках. Пользуясь этим методом, можно было получать препараты с большой активностью (400—500 ед./*мг*). Хроматографический анализ на крахмальной колонке продуктов гидролиза таких препаратов указывает на присутствие фенилаланина, тирозина, пролина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, глицина, аргинина и цистина приблизительно в эквимолярных отношениях. В гидролизатах присутствовал и аммиак в молярном отношении 3 : 1 к любой из аминокислот. Предварительные данные, полученные при исследовании реакции вазопрессина с динитрофторбензолом, показывают, как сообщил Дю Виньо [180], что α-аминогруппы тирозинового остатка и одна из α-аминогрупп цистинового остатка являются N-концевыми группами, как и в случае окситоцина.

Аналитические данные по вазопрессину и окситоцину, взятые из работ Дю Виньо с сотрудниками, сведены в табл. 61. Интересно отметить, что шесть из восьми аминокислот, найденных в гидролизатах обоих гормонов, идентичны. Лейцин и изолейцин, обнаруженные в окситоцине, заменены в молекуле вазопрессина аргининовым и фенилаланиновым остатками. Присутствие аргинина должно придавать молекуле вазопрессина более щелочной характер, и, действительно, это согласуется с прежними наблюдениями [181], что прессорное начало имеет более высокую изоэлектрическую точку, чем очищенные препараты окситоцина. Еще в 1942 г. Поттс и Геллегер [182] сообщали о том, что содержание аргинина в их высокоактивном (450 ед./*мг*) прессорном веществе составляло 12,3%, а в полученном ими препарате окситоцина—0,8%. Судя по этому факту и по другим аналитическим данным, весьма вероятно, что препараты этих авторов должны были быть очень близки к чистым веществам.

Попено с сотрудниками [182а] констатировали, что одним из гормональных свойств препарата вазопрессина, полученного Дю Виньо с сотрудниками, является присущее ему окситоцическое действие, которое может быть определено как в тесте на матке крысы, так и методом изменения кровяного давления кур. С другой стороны, окситоцин не обладает ни прессорной, ни антидиуретической активностью. Эти факты согласуются с данными Виттлстона [183], который обнаружил, что препарат окситоцина с активностью приблизительно 500 ед./*мг* обладал млекоизгоняющим действием, эквивалентным его окситоцической активности, и что препарат

Таблица 61

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ОКСИТОЦИНА И ВАЗОПРЕССИНА

(по данным Дю Виньо с сотрудниками [169, 178])

Компонент	Количество, *г* на 100 *г* твердого вещества	
	окситоцин	вазопрессин
C	50,12	49,5
H	6,84	6,12
N	16,12	19,5
S	6,15	
Зола	0,11	1,32
Лейцин	11,5	0,0
Изолейцин	11,5	0,0
Тирозин	15,4	12,6
Пролин	10,2	9,6
Глутаминовая кислота	14,2	12,4
Аспарагиновая кислота	12,7	10,6
Глицин	7,1	6,0
Аммиак	4,9	3,6
Цистин	22,7	14,9
Аргинин	0,0	12,9
Фенилаланин	0,0	11,4

вазопрессина (400 прессорных ед./*мг*) проявлял млекоизгоняющую активность, эквивалентную действию примерно 80 единиц окситоцина.

Е. Выделение белка с постоянной окситоцической, прессорной и антидиуретической активностями

Из приведенного выше обсуждения следует, что из экстрактов задней доли гипофиза, полученных при помощи горячей уксусной кислоты, можно приготовить два отдельных начала, имеющих пептидную природу. Поскольку это установленный факт, нельзя исключить и возможность того, что «нативный» гормон, вырабатываемый и откладывающийся в железе, может быть белком, который служит «материнской молекулой» для образования отдельных активных начал. Как уже упоминалось ранее, Абель с сотрудниками [157, 158] утверждали, что биологические действия задней доли гипо-

физа определяются «единым» веществом. В поддержку этой точки зрения был выдвинут ряд доказательств. Так, Мак-Артур [184] получил из 70-процентного метанолового экстракта (содержавшего 50% уксусной кислоты) свежих обезвоженных желез незначительные количества водорастворимого продукта с изоэлектрической точкой в зоне pH 5,0, который обладал как прессорными, так и окситоцическими свойствами. Розенфельд [158а] установил, что прессорный и окситоцический факторы сока, отжатого из свежих задних долей гипофиза, быстро и с одинаковой скоростью оседают в ультрацентрифуге. На этом основании был сделан вывод о том, что оба активных начала находятся в одной молекуле, вес которой был определен в 20 000—30 000. С другой стороны, очищенные прессорные и окситоцические препараты оседают лишь в очень незначительной степени даже после почти 6-часового центрифугирования со скоростью 61 000 об/мин.

Возможно, наиболее убедительным доказательством в пользу унитарной теории Абеля являются опыты Ван-Дейка с сотрудниками [159], которые получили из экстрактов 0,01 н. серной кислотой бычьих задних долей гипофиза однородный белок, обладавший и окситоцической и прессорной активностями. Посредством фракционного высаливания и изоэлектрического осаждения экстракта эти исследователи получили 700 *мг* очищенного продукта из 1 *кг* ткани задних долей гипофиза. Авторы показали, что полученный препарат ведет себя как чистое вещество при ультрацентрифугировании в 1-процентном растворе 0,1 *М* ацетатного буфера (pH 3,30). Электрофоретические исследования при pH 3,41—3,47 выявили присутствие небольшого количества быстро движущегося компонента, обладающего почти такой же окситоцической активностью (в пересчете на азот), как и главный компонент. Авторы определили этот компонент как вещество, «...тесно связанное с главным компонентом и, возможно, происшедшее от него». Судя по характеристикам растворимости, белковый гормон ведет себя как чистое вещество в 0,5 *М* ацетатном буфере, содержащем 6,5% NaCl при pH 3,90. Биологические пробы разных фракций, полученных при определениях чистоты препарата, не показали качественных различий в активности. Белковый гормон обладал в равной степени прессорной, окситоцической и антидиуретической активностями (постоянное соотношение 1 :1 : 1) в количестве 17 ед./*мг* (т. е. его активность в 8,5 раза превышала активность 1 *мг* международного стандартного препарата) и практически был лишен меланофорорасширяющей активности. Важно отметить, что эти биологические свойства выявляются в однородном белке-гормоне в том же самом отношении, в котором они встречаются в исходном порошке. Величина молекулярного веса (30 000), рассчитанная по содержанию аминоазота, довольно хорошо согласуется с величиной, установленной по седиментационным данным. Интересно, что изоэлектрическая точка (pH 4,8) белкового гормона,

как уже отмечалось выше, очень близка к значению, приводимому Мак-Артуром [184].

Растягивание молекулы белкового гормона в поверхностной пленке приводит фактически к уничтожению биологической активности [185]. Этот факт был использован как доказательство того, что для сохранения действующей силы необходимо, чтобы некоторая часть (или части) молекулы оставалась интактной. Ван-Дейк и др. [159] приводили это наблюдение в качестве аргумента, считая, что, если выделенный белок был бы инертным носителем, адсорбировавшим активные начала, то можно было бы ожидать, что при растягивании активные части переместились бы в нижележащую жидкость или по крайней мере продолжали бы оставаться связанными с белковой пленкой. Однако поскольку пленка оказалась лишенной активности, а гормональное действие жидкости меньше, чем исходного вещества, то напрашивается вывод, что гормоном должен быть сам белок.

Восстановление цистеином снижало как вазопрессорную, так и окситоцическую активность растворов белкового гормона, тогда как восстановление тиогликолевой кислотой вызывало почти полную инактивацию. Можно представить себе, что при восстановлении дисульфидные группы белка превращаются в сульфгидрильные группы, результатом чего и является потеря биологической активности. Приведенные наблюдения противоречат более ранним сообщениям [186] о том, что восстановление очищенного вазопрессина и окситоцина не вызывает изменения их первоначальной активности, и, следовательно, еще раз подчеркивают, что гормональный белок не является инертной субстанцией, адсорбировавшей активные начала.

Исследования Эймса с сотрудниками [187] выявили дополнительные факты, которые согласуются с представлением о истинных гормонах задней доли гипофиза как о высокомолекулярных веществах. Эти авторы нашли, что антидиуретическое начало мочи неспособно проходить через целлюлозную мембрану, но что оно оседает при ультрацентрифугировании. Весьма вероятно, что исследование природы активных начал, находящихся в крови и в моче, имеет первостепенное значение для разрешения вопроса о гормоне задней доли гипофиза в пользу моногормонной или мультигормонной гипотезы.

5. ИНСУЛИН

Поджелудочная железа является органом с внешнесекреторной и внутрисекреторной функциями. Экзокринная функция обусловлена пузырькообразными клетками железы, продуцирующими пищеварительные ферменты, тогда как изолированные группы клеток, разбросанные среди ткани железы и называемые островками Лангерганса, осуществляют эндокринную функцию и регулируют угле-

водный обмен. Удаление поджелудочной железы у подопытных животных приводит к следующим расстройствам обмена: а) гипергликемии и глюкозурии; б) истощению запасов гликогена в печени и мышцах; в) понижению дыхательного коэффициента; г) образованию кетоновых тел; д) увеличению содержания азота в моче. Значение поджелудочной железы как эндокринного органа было впервые показано классическими работами Меринга и Минковского [188], которые установили, что удаление поджелудочной железы у собаки приводит к тяжелому диабету. Это наблюдение вместе с тем фактом, что трансплантация поджелудочной железы собаки, страдающей диабетом, снижает содержание сахара в крови до нормального уровня [189, 190], ясно указывает на существование гормона, выделяемого этой железой.

Первые панкреатические вытяжки, оказавшиеся активными в отношении прекращения глюкозурии и гипергликемии у собак, лишенных поджелудочной железы, получили Бентинг и Бест [191]. Активное начало этих экстрактов, известное в настоящее время как инсулин, представляет собой белковый гормон, позже выделенный в кристаллической форме Абелем [192] и Харрингтоном, Скоттом и др. [193].

А. Методы определения

За интернациональную единицу активности инсулина принимается активность 0,0455 *мг* международного стандартного препарата. Чистый кристаллический инсулин обладает активностью 24 ед./*мг*.

Существуют два биологических метода определения эффективности инсулина: один из них основан на появлении судорог у мыши [194], а другой—на снижении сахара крови у кролика [195]. При использовании первого метода учитывается процентное отношение судорожных движений, вызываемых гормоном у белой мыши за определенное время, а при применении второго метода измеряется снижение содержания сахара крови, следующее за введением инсулина. Недавно Во с сотрудниками [196] предложили методику пробы *in vitro*, основанную на специфической реакции удлинения инсулиновой фибриллы; величину образовавшейся фибриллы принимали за меру содержания инсулина в неизвестном растворе или панкреатическом экстракте.

Б. Выделение инсулина

С тех пор как Бентинг и Бест [191] описали свои первые активные экстракты, были разработаны многочисленные методы получения терапевтически пригодных препаратов. Как правило, во всех методиках применяется экстракция инсулина подкисленным спир-

товым или ацетоновым раствором из размельченных поджелудочных желез быков, свиней или овец. Абель с сотрудниками [197] первые получили кристаллический инсулин из высокоочищенных патентованных препаратов. Позднее Скотт [198] сделал интересное наблюдение, что кристаллический инсулин содержит цинк. Очевидно, присутствие небольших количеств ионов некоторых металлов, таких, как цинк, никель, кобальт или кадмий, является важным дополнительным фактором (хотя он и не абсолютно необходим) для получения инсулина в кристаллической форме. Количество цинка в препаратах кристаллического инсулина меняется в зависимости от способа очистки. Используя радиоактивный цинк, Кон с сотрудниками [199] получили кристаллический инсулин, содержавший 0,31—0,65% цинка; Саюн [200] приготовил кристаллический гормон таким образом, что он содержал только 0,15% цинка. Ленз [201] разработал методику получения кристаллического инсулина высокой степени чистоты (как показала проба на растворимость), пользуясь в качестве исходного материала кристаллическими препаратами инсулина Романса, Скотта и Фишера [202]. Недавно Лоу [202а] и Гутфройнду (личное сообщение, 1952 г.) удалось кристаллизовать сернокислый и фосфорнокислый инсулин в отсутствие цинка.

В. Физико-химические свойства

Изоэлектрическая точка инсулина, определенная электрофоретически, соответствует pH 5,3—5,4 [203, 204]. В области изоэлектрической точки препараты кристаллического инсулина очень плохо растворяются в водных растворах. Так, Кон с сотрудниками [199, 205] установили, что растворимость в воде при 5° близка к 10 *мг/л*, а Ленз [201] получил вещество, растворимость которого в 0,1 *М* ацетатном буфере с pH 5,05 при комнатной температуре равнялась 30 *мг/л*. Инсулин хорошо растворяется в разбавленных кислотах и щелочах, а также в разбавленных спиртовых растворах. В присутствии ионов тиоцианата гормон становится растворимым и в изоэлектрической области [206]. Его биологическая активность более стабильна в кислой, чем в щелочной среде, и, например, в растворе с pH 2,5 не уменьшается сколько-нибудь заметно даже при нагревании до 52° [207].

Кристаллические препараты инсулина ведут себя как однородные вещества при электрофорезе [206, 208], диффузии [209], при осаждении в ультрацентрифуге [210], при исследовании растворимости [201] и при испытаниях методом распределительной хроматографии [210а]. Несмотря на очевидную гомогенность инсулина, на которую указывает его поведение в вышеперечисленных тестах [211], Харфенисту и Крегу [212] удалось еще разделить гормон на два компонента, применяя методику противоточного распре-

деления Крега [213] с 909 переносами. Оказалось, что обе фракции обладают высокой биологической активностью и различаются между собой только одной амидной группой [213а]. Пользуясь этой же методикой, Харфенист и Крег [212] смогли получить препарат инсулина в абсолютно чистой форме, судя по его поведению при противоточном распределении. По-видимому, теперь нет особых оснований сомневаться в том, что кристаллический белок и есть гормон инсулин.

Одной из наиболее интересных характерных черт инсулина является его свойство образовывать фибриллы при кислотно-щелочной обработке. Во [214—216] показал, что при нагревании 2-процентного раствора солянокислого инсулина с pH 2,0 на водяной бане при 100° в течение 30 мин. получается устойчивый двулучепреломляющий тиксотропный гель, что указывает на модификацию белка, образовавшего анизодиаметрические мицеллы. Электронмикрографии этого вещества показывают, что некоторые фибриллы достигают 140 Å в ширину и 16 000 Å в длину. Когда эти фибриллы диспергируются в щелочном растворе, они теряют характерное двойное лучепреломление и вязкость; раствор, полученный таким образом, похож на раствор нативного инсулина, и его снова можно превратить в тиксотропный гель, обладающий статическим двойным лучепреломлением. Показано также, что образование фибрилл является несомненной предпосылкой для формирования флоккул и что эти флоккулы представляют собою сферолиты. Равновесие между флоккуляцией и желатинизацией определяется не только pH и природой аниона, но еще и концентрацией белка, концентрацией соли и температурой. Примечательно, что нативный инсулин превращается в фибриллярную форму, когда раствор затравляется некоторым количеством фибрилл инсулина. Как уже упоминалось, Во, Томпсон и Веймер [196] недавно предложили методику пробы на инсулин, основанную на этом его свойстве.

Еще ранее наблюдалось, что осадок инсулина, который стал физиологически неактивным после нагревания в слабокислом растворе, может быть реактивирован путем обработки разбавленной щелочью [217—219]. Розен с сотрудниками [220] показали, что инсулин, растянутый в пленку, еще сохраняет свою гипогликемическую активность.

Г. Химический состав

По данным элементарного анализа, инсулин имеет типичный для белков химический состав. Он содержит 15,54% азота и 3,33% серы; фосфор и углевод не обнаружены; гормон состоит исключительно из аминокислот. Как уже отмечалось выше, большинство кристаллических препаратов инсулина содержит небольшое количество цинка. Но металл только свободно связан с белко-

выми молекулами и может быть полностью удален электродиализом [199].

Об аминокислотном составе инсулина сообщали многие исследователи, но в приводимых ими данных наблюдается некоторое расхождение. Это можно объяснить тем, что анализируемые препараты инсулина, вероятно, не были идентичны. Но в общем все согласны, что гормон не содержит триптофана, цистеина, метионина и более редких аминокислот—оксипролина и оксилизина. Тристрам [221] и Фромажо [222] в своих работах дают обзор полученных данных и приводят полный аминокислотный состав инсулина. Харфенист [213а] недавно анализировал на содержание аминокислот компонент А инсулина быка, полученный при противоточном распределении. Азот всех перечисленных компонентов составлял 100,15% общего белкового азота, что указывает на полноту анализа (см. табл. 62). Все количество серы, содержащейся

Таблица 62

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КОМПОНЕНТА А ИНСУЛИНА БЫКА, ОПРЕДЕЛЕННЫЙ ПОСЛЕ 24-ЧАСОВОГО ГИДРОЛИЗА

(по данным Харфениста [213а])

Аминокислота	Вес аминокислоты, *г* на 100 *г* белка	Вес аминокислотного остатка, *г* на 100 *г* белка	Азот, % от общего азота	Число остатков в молекуле инсулина[а]
Аспарагиновая	6,71±0,14	5,80±0,12	4,58±0,09	2,89±0,06
Треонин	2,00±0,07	1,70±0,06	1,53±0,05	0,97±0,03
Серин	5,28±0,02	4,38±0,02	4,57±0,02	2,89±0,01
Глутаминовая	17,27±0,28	15,16±0,25	10,68±0,18	6,74±0,11
Пролин[б]	2,13	1,80	1,69	1,07
Глицин	5,17±0,10	3,93±0,08	6,26±0,12	3,95±0,08
Аланин	4,59±0,04	3,66±0,03	4,67±0,03	2,95±0,02
Цистин	12,18	10,36	9,22	2,91
Валин	9,65±0,02	8,17±0,02	7,49±0,02	4,73±0,01
Изолейцин	1,51±0,03	1,30±0,03	1,04±0,03	0,66±0,02
Лейцин	13,45±0,32	11,61±0,28	9,27±0,28	5,85±0,18
Тирозин	12,58±0,31	11,33±0,28	6,31±0,15	3,98±0,10
Фенилаланин	8,60±0,20	7,66±0,18	4,73±0,09	2,98±0,07
Гистидин	5,41±0,16	4,78±0,14	9,50±0,27	2,00±0,06
Лизин	2,58±0,11	2,26±0,10	3,20±0,13	1,10±0,04
Аргинин	3,10±0,13	2,78±0,12	6,46±0,28	1,02±0,05
Аммиак	—	—	8,95±0,39	5,65±0,24
Всего		97,20	100,15	

[а] Молекулярный вес инсулина принят равным 5733.

[б] Определено после 96-часового гидролиза.

в молекуле гормона, целиком относится к присутствующему в ней цистину. Характерной особенностью гормона является высокое содержание цистина и тирозина. Если принять молекулярный вес инсулина равным 12 000, то формулу гормона можно представить следующим образом:

$Ала_6Арг_2Асп_6(Цис\,S_2)_6Глу_{14}Гли_8Гис_4Илей_2Лей_{12}Лиз_2Про_2Фен_6Сер_6Тре_2Тир_8Вал_8$

Д. Молекулярный вес

В течение некоторого времени исследователи не могли прийти к согласию относительно величины молекулярного веса инсулина. В настоящее время выяснилось, что прежние затруднения, по всей вероятности, происходили из-за того, что субъединицы инсулина находились в различной степени ассоциации. Гутфройнд [223], основываясь на измерениях осмотического давления, считал, что минимальный молекулярный вес близок к 12 000. Подобное же заключение было сделано на основании данных ультрацентрифугирования, диффузии [224, 225] и светорассеяния [226, 227]. Чибнелл [228] также установил наименьшую величину молекулярного веса инсулина равной 12 000 на основании анализа аминокислотного состава гормона.

Если принять 12 000 за истинный молекулярный вес, то более высокие значения (от 36 000 до 48 000), которые были определены различными авторами [211, 229—232] по скорости оседания в ультрацентрифуге инсулина в нейтральных растворах, могут указывать на существование тримеров или тетрамеров. Рентгенографический анализ кристаллов инсулина [223, 224] показал, что размер элементарной ячейки ромбоэдрической формы гормона соответствует молекулярному весу 36 000, откуда был сделан вывод, что внутри каждой элементарной ячейки имеются три идентичные единицы весом по 12 000 каждая. Как указывала Кроуфут-Годкин [234], это наблюдение является веским доказательством в пользу того, что молекулярный вес инсулина равен 12 000.

Равновесие ассоциированных форм инсулиновых мономеров, дающих полимеры более высокого молекулярного веса, изучали при помощи ультрацентрифугирования [225] и светорассеяния [227]. Доти и др. [227] показали, что при pH ниже 2,2 константа диссоциации равновесия мономер $\rightleftarrows$ димер ($I_2 = 2I$) может быть определена в $0{,}625 \cdot 10^{-5}$. При более высоких значениях pH появляются тетрамеры и, вероятно, тримеры. Далее, те же исследователи отмечали, что тетрамерная форма является преобладающей при pH 3,17 и при концентрации, превышающей 0,3%. Уменьшение электростатического отталкивания, вызванное понижением общего заряда и увеличением ионной силы или диэлектрической постоянной, благоприятствует полимеризации мономерных единиц инсулина.

Стейнер [236] обнаружил, что повышение температуры способствует диссоциации инсулиновых полимеров.

С другой стороны, несмотря на все эти данные, подтверждающие правильность определения молекулярного веса инсулина в 12 000, имеются наблюдения, которые свидетельствуют о том, что гормон может быть диссоциирован еще дальше, до формы с молекулярным весом около 6000. Когда Фредерик и Нейрат [211] подвергали инсулин седиментационным и диффузионным испытаниям, проводимым в присутствии однозамещенного фосфата при pH 2,6, полученные данные указывали на минимальный молекулярный вес, близкий к 6000*. Фредерик [237] определил также, что в глициновом буфере с pH 10,1 и ионной силой 0,1 величина константы седиментации инсулина равна 1,2 S, а константа диффузии—$16 \cdot 10^{-7}$; сочетание этих данных с величиной парциального удельного объема (0,72) должно давать молекулярный вес, близкий к 6000. Далее, Фредерик [237a, 237b], изучая поверхностные пленки инсулина, растянутые в 0,01 н. растворе HCl, постоянно получал величины молекулярного веса порядка 5000—6000. Новейшие исследования Харфениста и Крега [238], проведенные с помощью новой методики определения молекулярного веса Беттерсби и Крега [239, 240], дают величину 6500. Необходимо указать, что молекулярный вес 6000 для инсулинового мономера не противоречит схеме строения инсулина, предложенной Сангером (см. ниже). Однако в конечном счете определение истинного молекулярного веса гормона зависит от знания структуры его молекулы, и поэтому окончательное решение этой проблемы возможно при условии, что строение инсулина будет полностью выяснено. Во всяком случае, независимо от того, какая величина принимается за предварительную, в настоящее время следует иметь в виду, что получаемые данные по молекулярному весу зависят не только от pH, температуры и концентрации белка, но и от типа и концентрации электролита, находящегося в растворе.

Е. Концевые группы

Иенсен и Эванс [241] сумели выделить фенилгидантоин фенилаланина из гидролизата инсулина, обработанного фенилизоцианатом, показав тем самым, что аминогруппы фенилаланина в инсулине являются свободными. Позже Сангер [74] подтвердил этот вывод, применяя обработку 1-фтор-2,4-динитробензолом, и обнару-

* Титце и Нейрат [211a] вторично исследовали оседание инсулина в условиях, сходных с условиями опытов Фредерика и Нейрата [211], применяя «синтетическую камеру» Пикклса для наблюдения границы раздела» [211б], и получили экстраполированную величину константы седиментации, равную 1,78 S. Авторы пришли к выводу, что молекулярный вес инсулина в фосфатном буфере с pH 2,6 должен быть равен 12 000.

жил, что имеются две концевые аминогруппы, которые можно отнести к фенилаланиновым остаткам, две—к глициновым остаткам и две—к ε-аминогруппам лизиновых остатков. Следовательно, всего имеется шесть свободных аминогрупп, четыре из которых—α-аминогруппы. Чтобы проверить, являются ли N-концевыми группами молекулы инсулина именно фенилаланин и глицин, Сангер [242] подверг динитрофенилинсулин (ДНФ-инсулин) частичному гидролизу; в результате он получил два пептида, содержащие ДНФ-фенилаланин и ДНФ-глицин. Исходя из этого, автор доказал существование следующих цепочек: глицил-изолейцил-валил-глутаминовая кислота и фенилаланил-валил-аспарагил-глутаминовая кислота. На основании полученных данных был сделан вывод, что, поскольку инсулин имеет четыре свободные α-аминогруппы, он состоит из четырех открытых полипептидных цепей, две из которых имеют концевые глициновые остатки, а другие две—фенилаланиновые остатки.

Если инсулин имеет четыре концевые аминогруппы, то он должен содержать и четыре концевые карбоксильные группы. Ленз [243] установил, что аланин является главным продуктом гидролиза при расщеплении инсулина карбоксипептидазой, и пришел к выводу, что эта аминокислота должна быть одним из С-концевых остатков. Фромажо, Чибнелл, Вали и их сотрудники [244—246], пользуясь химическими методами, пришли к аналогичному заключению. Кроме того, эти авторы [244, 245] получили и дополнительные данные, свидетельствующие о том, что другим С-концевым остатком является глицин. Недавно Харрис [247] повторил опыт Ленза [243] с карбоксипептидазой и нашел, что фермент освобождает две аминокислоты—аланин и аспарагин, причем количество освобожденного аланина составляет 2 моля на моль инсулина. Сообщения Чибнелла и Риса [248] и Сангера и Томпсона [249] также свидетельствуют о том, что аланин и аспарагин встречаются в качестве С-концевых остатков. Судя по этим данным, молекула инсулина, очевидно, содержит два С-концевых остатка аспарагина и два С-концевых остатка аланина.

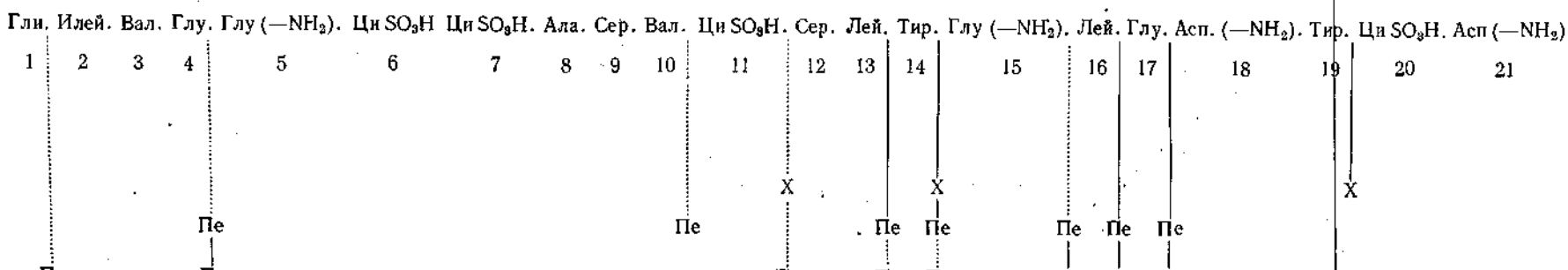
Ж. Фракции А и В окисленного инсулина

На основании исследований, посвященных определению концевых групп, можно прийти к выводу, что молекула инсулина состоит из четырех открытых полипептидных цепей, соединенных мостиками—S—S—. Поскольку известно, что надмуравьиная кислота окисляет цистин, метионин и триптофан в молекуле белка [250], и поскольку инсулин не содержит ни метионина, ни триптофана, то единственным изменением, возникающим при окислении надмуравьиной кислотой, должно бы быть превращение мостиков —S—S— в группы $—SO_3H$. Поэтому Сангер [251], воспользовав-

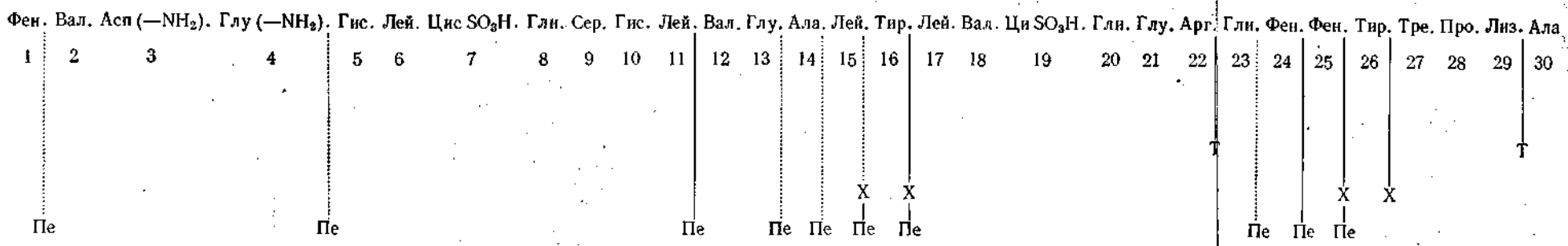
Таблица 63

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЧЕРЕДОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ФРАКЦИЯХ А И В ОКИСЛЕННОГО ИНСУЛИНА (ПО САНГЕРУ, ТОМПСОНУ, ТАППИ [254а])

Фракция А



Фракция В



Примечание. Сплошные линии указывают главные места действия ферментов, пунктирные линии—другие связи, расщепляемые ферментами.

щись такой обработкой, разделил окисленный продукт на две основные фракции: кислотную фракцию (фракция А), которая имеет только глициновые концевые остатки и не содержит аргинина, гистидина, лизина, пролина, треонина и фенилаланина, и щелочную фракцию (фракция В), которая имеет фенилаланиновые концевые остатки и содержит все аминокислоты, присутствующие в инсулине, за исключением изолейцина. Фракции А и В оказались, в сущности, гомогенными препаратами полипептидов, содержащих около 20 и 30 аминокислотных остатков соответственно.

Подвергая эти фракции частичному гидролизу различными агентами (HCl при 37°, пепсин, трипсин и химотрипсин) и применяя методику, разработанную Конденом, Гордоном, Мартином и Синджем [252] для выяснения структуры грамицидина С, Сангер с сотрудниками [249, 253] выяснили последовательность связи аминокислотных остатков фракций А и В (см. табл. 63). Из этой таблицы можно видеть, что глицин, изолейцин и аланин встречаются лишь по одному разу в фракции А, тогда как в фракции В имеется шесть остатков (аспарагиновая кислота, серин, аргинин, треонин, пролин и лизин), которые встречаются в цепи только один раз. Это в значительной степени облегчает определение принадлежности остатков в опытах с частичным гидролизом; например, те пептиды, которые содержат серин, очевидно, имеют одну и ту же последовательность и, следовательно, могут служить индикаторами для правильной локализации других аминокислот.

В табл. 63 указаны пептидные связи обеих цепей, которые легко гидролизуются под влиянием различных ферментов. Трипсин не оказывает никакого действия на фракцию А, а цепочку фракции В он разрывает только по тем пептидным связям, в которых участвуют карбоксильные группы лизина и аргинина в соответствии со специфичностью этого фермента. Если молекула инсулина действительно состоит из этих двух цепей, то следовало ожидать, что продуктами переваривания инсулина трипсином окажутся аланин и какой-нибудь октапептид. Хроматография на бумаге небелковой фракции, полученной при переваривании трипсином, подтверждает это предположение [254].

На основании строения фракций А и В можно теоретически рассчитать аминокислотный состав инсулина, исходя из предположения, что гормон состоит из четырех цепочек (по две в каждой фракции). Из табл. 62 можно видеть, что теоретические и экспериментальные результаты хорошо согласуются. На основании этих данных был вычислен теоретический вес молекулы инсулина (предположительно состоящей из четырех цепочек) и получена величина, равная 11 484.

Как показано в табл. 63, фракция А содержит четыре остатка цистеиновой кислоты, а фракция В—два; учитывая это, Сангер предложил два возможных варианта структуры молекулы инсу-

лина [242]. Эти предполагаемые структуры показаны на рис. 60, где сплошные линии обозначают пептидные цепочки, а пунктирные—мостики —S—S—. Однако результаты опытов с монослоями инсулина [220] наводят на мысль, что тип строения, представленный на рис. 60,*а*, ближе к истинной структуре гормона. Естественно, что следующей структурной проблемой является установление местоположения мостиков —S—S—в четырех цепочках инсулина.

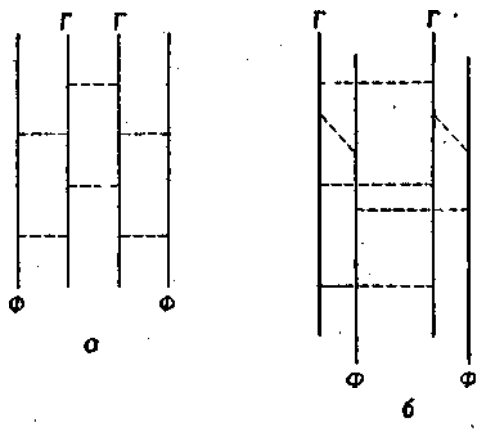


Рис. 60. Структура инсулина (по Сангеру [242, 260а]).
Г—глицин; *Ф*—фенилаланин.

Однако, прежде чем полностью принять данные Сангера и др. и их интерпретацию этих данных, нужно отметить ряд сомнительных пунктов. Во-первых, степень чистоты образцов инсулина, использованных этими авторами, пока не подтверждена тщательными исследованиями. Во-вторых, не исключена возможность перераспределения последовательности аминокислот при ферментном или кислотном гидролизе, и поэтому последовательность, определенная в гидролизате, может не соответствовать последовательности, которая существует в исходной молекуле. Другие затруднения подробно обсуждаются в работе Булла [255].

3. Различия в свойствах препаратов инсулина, полученных из желез животных различных видов

Хотя кристаллический инсулин обычно приготовляют из поджелудочных желез крупного рогатого скота, он также может быть получен из станниусовых телец некоторых рыб [256], из желез овец, свиней [257], бизонов и из поджелудочной железы человека [258]. Препараты кристаллического инсулина, полученные от животных различных видов, обладают одинаковой эффективностью и не могут быть дифференцированы иммунологически [259].

Первое указание на то, что бычий и свиной препараты гормона, вероятно, не идентичны, появилось в работе Сангера [260], который обнаружил некоторую разницу в аминокислотном составе фракций А, полученных из этих препаратов. Более поздние исследования Ленза и Эвертзена [261] подтвердили выводы Сангера. Было отмечено, что содержание валина в бычьем инсулине выше,

чем в свином. Кроме того, из наблюдений голландских исследователей выяснилось, что в фосфатном буфере с pH 6,38 инсулин, полученный из поджелудочной железы свиньи, обладает более высокой растворимостью, чем гормон, приготовленный из железы быка; однако эта разница не обнаруживалась в ацетатном буфере с pH 5.

В процессе выделения чистого инсулина из желез животных разных видов Харфенист и Крег [213а, 262] выявили значительные различия аминокислотного состава свиного, овечьего и бычьего гормонов. Полученные ими данные приведены в табл. 64. Интересно, что ни в одном случае содержание любой из шести аминокислот не отличается сразу у всех трех видов; так, например, овечий и бычий инсулин содержат равные количества изолейцина, тогда как в свином его содержание выше, чем в первых двух.

Таблица 64

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ПРЕПАРАТОВ ИНСУЛИНА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ
(по данным Харфениста с сотрудниками [213а, 262])

Аминокислота	Число остатков [a]			
	бык, фракция А	бык, фракция В	свинья	овца
Аспарагиновая	3	3	3	3
Треонин . . .	1	1	2	1
Серин	3	3	3	2
Глутаминовая	7	7	7	7
Пролин	1	1	1	1
Глицин	4	4	4	5
Аланин	3	3	2	3
Цистин	3	3	3	3
Валин	5	5	4	5
Изолейцин . .	1	1	2	1
Лейцин	6	6	6	6
Тирозин . . .	4	4	4	4
Фенилаланин	3	3	3	3
Гистидин . . .	2	2	2	2
Лизин	1	1	1	1
Аргинин . . .	1	1	1	1
Аммиак	6	5	6	6

[a] На молекулу с молекулярным весом 6000.

И. Группы, существенные для активности

Инсулин не имеет простетических групп, т. е. он не содержит никаких химических компонентов, кроме обычных аминокислот. Проведенные до настоящего времени химические исследования позволяют заключить, что гипогликемическое действие гормона обусловлено структурной характеристикой всей белковой молекулы. Предпринимались многочисленные исследования с целью определения тех групп молекулы, от которых зависят биологические свойства инсулина.

Иодирование фенольных групп [263] и этерификация свободных карбоксильных групп [264—266], как и восстановление мостиков —S—S— [267—270] одинаково приводят к потере биологической активности гормона. Взаимодействие алифатических гидроксильных групп остатков серина и треонина с холодной концентрированной серной кислотой не вызывает инактивации [265—271], так же как и ацетилирование аминогрупп кетеном [272]. Недавно Френкель-Конрат Дж. и Френкель-Конрат Г. [273] еще раз исследовали реакции инсулина со специфическими реагентами и пришли к следующим выводам: а) свободные аминогруппы и алифатические гидроксильные группы не существенны для активности; б) некоторые амидные, гуанидиновые и тирозилфенольные группы, а также имидазольные группы гистидина могут быть замещены без потери активности.

Инсулин необратимо инактивируется кристаллическим химотрипсином и пепсином [274]; некоторая инактивация наблюдается и после обработки кристаллическим трипсином [274, 275]. Ван-Абеле и Кэмпбелл [276] нашли, что при более низком отношении фермент : субстрат переваривание трипсином не вызывает сколько-нибудь заметной инактивации инсулина. Этот факт был впоследствии подтвержден Харрисом и Ли [254].

Как показали Батлер, Доддс, Филиппс и Стефен [276a], при химотриптическом переваривании инсулина освобождаются пептидные фрагменты, растворимые в 0,25 н. трихлоруксусной кислоте, и остается нерастворимое «ядро», молекулярный вес которого равен ~5000. Вещество ядра более подробно исследовали Батлер с сотрудниками [276b] и Стефен [276c]. Число разорванных пептидных связей и распределение аминокислот между ядром и отколовшимися фрагментами пептидов дает основание считать [276b], что химотрипсин расщепляет преимущественно те связи, которые включают карбоксильные группы ароматических остатков, что соответствует специфичности этого фермента, по наблюдениям Бергмана и Фрутона [276d]. Оказалось, что N-концевыми аминокислотами ядра являются глицин и валин, тогда как в интактном инсулине—это глицин и фенилаланин.

Стефен [276c] окислял вещество ядра надмуравьиной кислотой, но применение методики фракционирования по Сангеру [276e] не привело к получению двух гомогенных фракций, как это было в случае инсулина. Однако продукты окисления ДНФ-производного ядра и ДНФ-производные окисленного ядра могли быть фракционированы. Полученные фракции оказались сложными, судя по многочисленности их концевых групп. И лишь одна из ДНФ-фракций с молекулярным весом около 2000, составлявшая приблизительно 13% всего продукта, имела глициновый N-концевой остаток и высокое содержание цистина. После переваривания этой фракции панкреатином был получен концевой ДНФ-пептид, который при кислотном гидролизе давал N-ДНФ-глицин, валин, изолейцин, глутаминовую кислоту и лейцин. На основании этого можно с почти полной уверенностью заключить, что фракция эта является производной глициловой цепочки фракции А Сангера.

Когда Филиппс [276f] пытался фракционировать методом двухмерной хроматографии на бумаге растворимые в трихлоруксусной кислоте пептиды, образовавшиеся в результате химотриптического переваривания инсулина, наблюдалось несколько хорошо очерченных пятен, но ни один из продуктов переваривания не был идентифицирован. Спустя два года тот же автор опубликовал [276g] дополнительные наблюдения над химотриптическим перевариванием инсулина; кривая зависимости скорости переваривания от pH имела два оптимума—при pH 8,6 и pH 9,5, а характер снижения кривой соответствовал закону «все или ничего», постулированному Тизелиусом и Эриксоном-Квенселем [276h].

При нагревании инсулина в 0,1 н. HCl до 100° образуется неактивный осадок [276i]. После обработки этого осадка разбавленной щелочью получается раствор, не менее активный, чем исходное вещество. Гидролиз же гормона 0,8 *M* HCl при 0—2° полностью разрушает его способность оказывать гипогликемическое действие [274]. Обработка инсулина в течение 3 час. 0,33 н. NaOH при 34° также вызывает необратимую инактивацию, сопровождающуюся выделением аммиака [276i].

K. Гипергликемический—гликогенолитический фактор* (ГГФ, глюкагон)

В 1923 г. Мерлин с сотрудниками [277, 277a] обнаружили, что некоторые фракции неочищенного экстракта поджелудочной железы способны увеличивать содержание сахара в крови, и предложили назвать агент, вызывающий этот эффект, глюкагоном.

* Автор весьма обязан д-ру Беренсу и д-ру Штаубу за рецензирование этого отдела и предоставление их неопубликованных данных.

С тех пор появилось много сообщений о преходящей гипергликемии у людей и животных, возникающей при внутривенных вливаниях различных патентованных препаратов инсулина. Гейлинг, Бюргер и их сотрудники [277b, c] показали, что преходящее увеличение содержания сахара в крови вызывается не самим инсулином, а примесями, которые обнаруживаются в аморфных препаратах. Шипли и Хьюмел [277d] наблюдали недавно ускорение гликогенолиза в срезах печени под влиянием препаратов инсулина, а Сезерленд и Кори [277e] установили, что этот эффект вызывают лишь некоторые препараты гормона. Эти авторы [277e] также показали, что фактор, ускоряющий гликогенолиз, устойчив к воздействию щелочи и цистеина в условиях, при которых инсулин инактивируется. Фракционирование инсулина, инкубированного со щелочью, привело к десятикратному увеличению этой специфической активности и дало частично очищенный препарат, не содержащий инсулина [277f].

Штауб, Синн и Беренс [278] недавно опубликовали предварительное сообщение, в котором описана методика кристаллизации ГГФ из аморфных препаратов инсулина. Активное вещество кристаллизуется в изометрической системе в виде ромбических додекаэдров. В противоположность инсулину оно не содержит металла в сколько-нибудь заметных количествах. Аминокислотный состав значительно отличается от аминокислотного состава инсулина. Цистин, пролин и изолейцин, присутствующие в инсулине, не встречаются в глюкагоне, тогда как метионин и триптофан—две аминокислоты, которые не обнаружены в инсулине,—найдены в глюкагоне. Кристаллический глюкагон содержит 0,7—0,8% серы исключительно за счет метионина. Элементарный состав типичен для белка: 52,5% C, 6,6% H, 16,3—16,5% N (Штауб и Беренс, неопубликованные данные). Можно прийти к выводу, что глюкагон является особым белком, а не продуктом деградации инсулина, как утверждалось в более ранних исследованиях. Этот белок обладает высокой степенью биологической активности: так, если кошке ввести внутривенно всего лишь 0,5 *мг/кг*, то это вызовет через 15 мин. увеличение содержания сахара в крови на 30 *мг*%. При работе по выделению глюкагона единица его активности была временно определена на основании этой биологической реакции. Когда же вещество было выделено в кристаллической форме, то за единицу активности была принята активность 0,1 *мг* кристаллического глюкагона.

Исследования биологического влияния кристаллического глюкагона и его связи с инсулином и другими веществами должно дать сведения, важные для понимания углеводного обмена.

6. ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Эффективность заместительной терапии для больных, страдающих гипотиреозом, была впервые показана в 1891 г. Мурреем, который применял для этой цели глицериновые эмульсии щитовидных желез [279]. Позднее было установлено, что щитовидная железа обладает большей потребностью в иоде, чем любая другая ткань организма, и что в ней присутствуют вещества, в состав которых входит иод. Большая часть иода железы содержится в коллоиде, заполняющем фолликулы—пузырьки из железистого эпителия, из которых состоит щитовидная железа. Поскольку количество этого коллоида довольно значительно меняется в зависимости от функционального состояния железы, то его считают вероятным источником активного тиреоидного вещества, которое оказывает регулирующее действие на обмен веществ организма, рост и морфогенез. Впоследствии Освальд [280, 281] выделил из коллоида активную белковую фракцию, названную тиреоглобулином. А еще позже Кендалл [282] идентифицировал активную часть тиреоглобулиновой молекулы как тетраиодтиронин (тироксин).

А. Методы определения гормона щитовидной железы

Поскольку тироксин является иодсодержащей аминокислотой, его можно легко определить химическими методами, различные варианты которых и были предложены для этой цели [283]. Обычно ткань высушенной щитовидной железы гидролизуют щелочью, и тироксин из гидролизата экстрагируют *н*-бутиловым спиртом; количество тироксина определяют колориметрическим методом [284—286].

Среди множества методов, которые могут быть использованы для биологического определения тиреоидного гормона [287], рекомендуются методы, основанные на повышении основного обмена у крыс или морских свинок и стимуляции метаморфоза у головастиков. Что касается первого метода, то замечено, что процент увеличения количества потребляемого кислорода у нормальных, голодавших некоторое время морских свинок прямо пропорционален логарифму дозы тироксина, введенного перорально [288]. Применяя второй метод, Динсли и Паркс [289] использовали в качестве показателя тиреоидной активности появление передних ног у головастиков рода *Xenopus*. Тест является весьма специфичным, так как в этом случае отсутствует реакция на иодид калия, а реакция на дииодтирозин ничтожно мала. Для определения активности тиреоидных препаратов в качестве стандартной пробы применяется также метод мышиной аноксии по Смиту, Эммензу и Парксу [290].

Б. Тиреоглобулин

Систематические исследования, проведенные Освальдом [280, 281], показали, что, применяя последовательное осаждение сульфатом аммония, из солевого экстракта железы можно получить два определенных белка. Один из них нерастворим в полунасыщенном растворе сульфата аммония и содержит иод, а другой растворяется в этом солевом растворе и содержит не иод, а фосфор. Иодсодержащий белок (тиреоглобулин) можно дополнительно очистить осаждением в изоэлектрической области; оказалось, что он очень плохо растворяется в воде и обладает типичными биологическими свойствами, проявляемыми интактной щитовидной железой. Позже Гейдельбергер и Пальмер [292] предложили методику для удаления нуклеопротеидных примесей, которая заключалась в том, что pH тиреоидного экстракта до солевого фракционирования доводили на холоде до значения 4,8—5,0; таким образом, они получили высокоактивный неденатурированный препарат тиреоглобулина.

Недавно Деррье, Мишелю и Роше [293] удалось получить препарат тиреоглобулина, который вел себя как однородное вещество при электрофоретических и ультрацентрифугальных исследованиях. Процесс обработки, по описанию авторов, заключался в следующем. Замороженные свиные щитовидные железы (1 *кг*) разрезали на мелкие ломтики и экстрагировали охлажденным 0,9-процентным раствором NaCl. Затем экстракт фракционировали сульфатом аммония или концентрированным раствором фосфатного буфера с pH 6,5. Осадок, который появляется между 37 и 41% насыщения сульфатом аммония или между 43 и 48% насыщения 3,5 *М* фосфатом калия, является высокоочищенным препаратом тиреоглобулина. Продукт, полученный посредством этой методики, имеет изоэлектрическую точку при pH 4,5 и молекулярный вес 650 000. И хотя по данным электрофореза и ультрацентрифугирования он кажется гомогенным, при исследованиях растворимости этот продукт ведет себя как гетерогенное вещество. Однако химический состав фракций, обладающих различными характеристиками растворимости, оказался одинаковым [294]. Аминокислотный состав и некоторые физико-химические свойства высокоочищенных препаратов тиреоглобулина представлены в табл. 65 и 66. Все количество иода, содержащееся в тиреоглобулине, можно целиком отнести на счет входящих в его состав тироксина и дииодтирозина. Необходимо отметить колебания в содержании иода у различных препаратов тиреоглобулина, причем наивысшее определенное до сих пор количество равняется 0,84%; но, с другой стороны, отношение иода тироксина к общему количеству иода остается относительно постоянным. Существуют небольшие различия в составе тиреоглобулинов, полученных от животных разных

Таблица 65

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТИРЕОГЛОБУЛИНА СВИНЬИ
(по данным Деррье, Мишеля, Педерсена и Роше [294])

Характеристика	Величина
Константа седиментации s_{20}, S	19,4
Константа диффузии D_A, $см^2/сек$	$2{,}60 \cdot 10^{-7}$
Удельный объем V_{20}	0,723
Молекулярный вес M_s	650 000
Изоэлектрическая точка	pH 4,5
Электрофоретическая подвижность в фосфатном буфере с pH 7,68 и ионной силой 0,2, $см^2/в \cdot сек$	$4{,}54 \cdot 10^{-5}$

Таблица 66

СОСТАВ ТИРЕОГЛОБУЛИНА СВИНЬИ
(по данным Деррье, Мишеля и Роше [294])

Компонент	Вес. %	Компонент	Вес. %
Азот	15,8	Тироксин	0,21
Аргинин	12,72	Цистин	3,60
Гистидин	2,23	Метионин	1,30
Лизин	3,42	Аланин	7,40
Фенилаланин	6,68	Глицин	3,70
Триптофан	2,08	Лейцин	12,80
Тирозин	3,12	Валин	1,45
Дииодтирозин	0,54	Серин	10,80

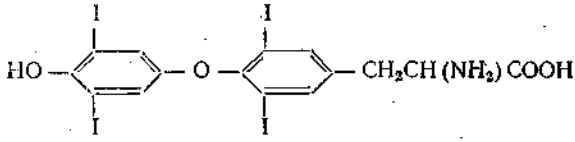
видов. Кроме того, белковый гормон, выделенный из коллоида базедовического зоба, содержит меньше цистина и больше тирозина, чем гормон, полученный из нормальных желез.

Как отмечали еще Гейдельбергер и Пальмер [292], тиреоглобулин чрезвычайно чувствителен к уксусной кислоте. Так, обработка на холоде в течение часа растворами с pH 4,1 вызывает уже некоторую денатурацию белка, а при комнатной температуре этот процесс значительно ускоряется. Тиреоглобулин, частично денатурированный кислотой, способен осаждаться в таких растворах, в которых нативный белок хорошо растворим. Например, нативный тиреоглобулин растворяется в ацетатных буферных растворах с pH вплоть до 4,8, а ниже этой точки происходит денатурация. Денатурированный же тиреоглобулин почти совсем нерастворим в ацетатном буфере при pH 4,3—5,5 и в фосфатных буферных рас-

творах с pH до 5,9. Денатурированный гормон отличается от неденатурированного также и своими электрофоретическими свойствами. Установлено, что изоэлектрическая точка денатурированного тиреоглобулина соответствует pH 5,0, а нативного белка — pH 4,5. Ультрацентрифугальный анализ в присутствии соли подтвердил, что денатурированный тиреоглобулин отличается от нативного белка. Ландгрену удалось даже обнаружить нестойкое промежуточное соединение при тепловой денатурации тиреоглобулина в не содержащих солей растворах [295, 296]. Кроме того, он отметил, что денатурация гормона катализируется активным папаином до проявления гидролизующего действия этого фермента [297].

В. Тироксин

Выделение тироксина из гидролизатов тиреоглобулина впервые осуществил Кендалл [282]. Позже Харингтон [298—301] разработал усовершенствованный метод выделения тироксина и установил, что по своему строению он является 3,5,3′, 5′-тетраиод-*l*-тиронином:



В соответствии с методикой Харингтона [298] тиреоглобулин гидролизуется 10-процентным водным раствором окиси бария в течение 5 час.; при подкислении профильтрованного гидролизата иодсодержащее вещество разделяется примерно на равные части; затем нерастворимую фракцию подвергают более жесткому гидролизу путем нагревания до 100° в течение 18 час. с 40-процентным водным раствором окиси бария; разложение нерастворимых бариевых солей, образовавшихся в результате этого гидролиза, дает вещество кислотного характера, из которого при растворении в щелочном растворе спирта с последующим подкислением при температуре кипения уксусной кислотой получается кристаллическое соединение, идентичное продукту, полученному Кендаллом [282]. Однако тироксин, полученный таким образом из щелочного гидролизата тиреоглобулина, не обладает оптической активностью. Более поздняя работа Харингтона и Селтера [299], которые применяли сложную методику, включающую последовательное переваривание белкового гормона пепсином, трипсином и в конце концов экстрактом слизистой кишечника, содержащим пептидазу, позволила получить небольшое количество оптически активного кристаллического тироксина, имевшего $[\alpha]_{5461} = -3{,}5°$. Из этих исследований ясно, что тироксин должен присутствовать в молекуле тиреоглобулина в качестве составной части.

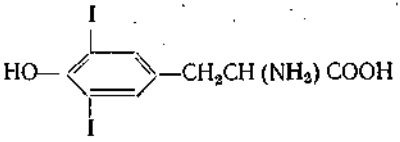
Строение тироксина было установлено Харингтоном [300, 301] в серии остроумных экспериментов по расщеплению молекулы и окончательно подтверждено получением синтетического продукта, который химически и физиологически неотличим от тироксина, изолированного из щитовидной железы. Харингтон и Берджер [301], впервые осуществившие синтез тироксина, использовали в качестве исходного материала *n*-нитроанилин, превращая его в 3,4,5-трииоднитробензол. Конденсация последнего с монометиловым эфиром гидрохинона в растворе метилэтилкетона и в присутствии карбоната калия давала дифениловый эфир, нитрогруппу которого восстанавливали до аминогруппы, а затем заменяли по реакции Сандмейера на цианогруппу. При восстановлении цианогруппы безводным хлоридом олова получался альдегид, который конденсировали с гиппуровой кислотой для введения аланиновой боковой цепи. Образовавшийся вначале азолактон гидролизовали и восстанавливали, а затем подвергали деметилированию и дебензоилированию, получая кислоту с двумя атомами иода. Добавочные атомы иода вводились посредством дальнейшего иодирования в аммиачном растворе. При подкислении раствора выделялась свободная кислота, что давало *dl*-тироксин. Разложение рацемического тироксина достигалось при помощи обработки, включающей преобразование рацемической смеси в соль с *l*-α-фенилэтиламином [302].

Борроу, Чалмерс и их сотрудники [303, 304] недавно сообщили о разработанном ими усовершенствованном синтезе тироксина. По этой методике *l*-тирозин превращается в 3,5-динитротирозин, который подвергается ацетилированию и этерификации, образуя сложный эфир. Реакция с монометиловым эфиром гидрохинона в пиридине дает 3,5-динитро-4-*n*-метоксифенокси-N-ацетил-*l*-фенилаланинэтиловый эфир, который затем восстанавливается до диамина и подвергается обработке по Сандмейеру для получения эфира с двумя атомами иода. Последующий гидролиз и иодирование иодом в этиламине дают *l*-тироксин. Общий выход *l*-тироксина составляет 25%.

Тироксин является бесцветным веществом, кристаллизующимся в виде снопиков и розеток, состоящих из микроскопических иголочек; он содержит 65% иода и проявляет физиологическую активность, характерную для гормона щитовидной железы. Он разлагается при температуре 235°; в смешанном растворе, в состав которого входит 1 ч. 1 н. NaOH и 2 ч. этилового спирта, $[\alpha]_{5461}$ равняется —5,7°. Чистый гормон почти нерастворим в воде, но растворяется в *n*-бутиловом спирте, насыщенном водой. Щелочные соли тироксина довольно легко растворяются в воде и очень хорошо растворяются в смесях спирта и воды. Тироксин очень стабилен в сильных щелочных растворах, но менее устойчив по отношению к неорганическим кислотам.

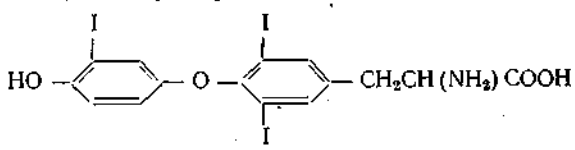
Биологическая активность левовращающего тироксина значительно выше, чем у правовращающей формы, как это определил Гаддум на головастиках и крысах [305]. Рейнеке и Тарнер [306] показали в тесте на морских свинках, что *l*-тироксин вызывает вдвое бо́льшую стимуляцию обмена по сравнению с рацемической смесью. Более того, согласно недавним исследованиям Питт-Риверса и Лермана [307], интенсивность физиологического действия *d*-тироксина на больных микседемой равна примерно $^1/_8$—$^1/_{10}$ того действия, которое оказывает на них *l*-тироксин. Были предприняты многочисленные физиологические исследования [308] с целью выяснения структурных особенностей тироксина, от которых зависит его специфическая физиологическая активность. В настоящее время представляется несомненным, что для биологической активности существенно присутствие тиронинового ядра и замещающих атомов галоида в положениях 3 и 5.

Тиреоглобулин, кроме тироксина, содержит и 3,5-диодтирозин [309]:



Эта аминокислота не обладает тиреоидной активностью; ее содержание в препаратах тиреоглобулина составляет примерно 0,5% [294]. Возможно, *l*-тироксин образуется в железе, как впервые предположили Харингтон и Берджер [301], из *l*-тирозина или 3,5-диод-*l*-тирозина. Только в последнее время было твердо установлено, что диодтирозин можно рассматривать в качестве предшественника в биогенезе тироксина [310]. Этот вывод основан на наблюдениях, согласно которым тирозин или белок, содержащий тирозин, может одновременно иодироваться и окисляться, образуя тироксин или тироксинсодержащие белки [311, 312].

Применение распределительной хроматографии на бумаге с радиоактивным иодом в качестве индикатора позволило показать, что щитовидная железа содержит, кроме тироксина, диодтирозин, моноиодгистидин [313], моноиодтирозин [314, 315] и не менее трех других неизвестных иодсодержащих соединений [312, 316]. Одно из них сейчас идентифицировано как триодтиронин [317, 318]:



Гросс и Питт-Риверс [319, 319а] отметили, что биологическая активность *l*-триодтиронина почти в три раза больше активности

l-тироксина. Присутствие в щитовидной железе *l*-триодтиронина, возможно, объясняет аномалию, известную уже много лет. Она заключается в том, что физиологическая активность, проявляемая щитовидной железой в целом, больше активности максимально содержащегося в ней тироксина, полученного в изолированном состоянии. Триодтиронин, как и тироксин, следует рассматривать в качестве одного из циркулирующих тиреоидных гормонов.

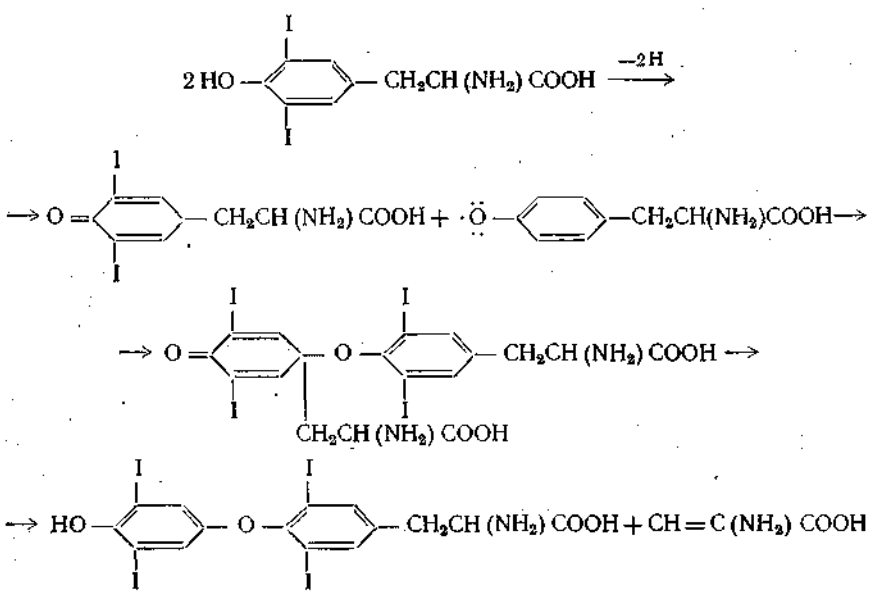
Г. Иодированные белки, обладающие тиреоидной активностью

С тех пор как впервые было установлено, что биологическая активность щитовидной железы связана с иодом и что иод органически входит в молекулу тиреоглобулина, предпринимались многочисленные попытки получить тиреоидноактивные препараты путем обработки иодом других белков. Абелин [320] утверждает в целом ряде своих работ, что он получил вещество, обладающее тиреоидной активностью, из гидролизатов иодированных белков. Людвиг и фон Мутценбеккер [321] сообщили о выделении кристаллического тироксина из иодированного казеина и других белков; этот факт был подтвержден Харрингтоном и Питт-Риверсом [322]. Рейнеке с сотрудниками [323] предприняли широкое исследование тех реакций между белками и иодом, которые дают тиреоидноактивные продукты. Они установили, что наилучшим методом является прибавление в течение 2,5 часа к раствору белка в 1,4-процентном водном растворе $NaHCO_3$ небольших порций порошкообразного иода при постоянном взбалтывании в закрытом стеклянном сосуде. Максимальная активность достигается, когда на каждую молекулу тирозина в белке приходится по 6 атомов иода [324]. Иодированный белок, приготовленный таким образом, всегда оказывает тиреоподобное действие как на нормальных, так и на лишенных щитовидной железы животных, при пероральном или парентеральном введении [325, 326]. В дальнейшем было отмечено, что результат биологических определений тиреоидной активности всегда хорошо согласуется с активностью, которую можно было бы ожидать, исходя из содержания тироксина в иодированном белке [327].

Методы, применяемые для выделения тироксина из иодированных белков, основываются на принципах, установленных еще Кендаллом и Харингтоном. По сообщению Рейнеке и Тарнера [328], выход кристаллического тироксина, полученного ими из иодированного казеина, равнялся 0,424%. Как указывает Харингтон [329], образование тироксина в процессе иодирования белка можно объяснить двояко: а) тем, что тиронин уже присутствует в белковой молекуле, б) иодированием тирозиновых остатков и частичным превращением образовавшегося дииодтирозина в тироксин. Поскольку нет никаких данных, говорящих о присутствии в белках тиронина, второе объяснение представляется наиболее приемлемым. И, дей-

ствительно, фон Мутценбеккеру [330] удалось получить тироксин (выход продукта составлял приблизительно 0,23%) непосредственно из дииодтирозина посредством инкубации его в слегка щелочном растворе при 37° в течение 2 недель. Харингтон и Питт-Риверс [331] добились значительного увеличения выхода продукта (до 4,1%), применяя экстракцию тироксина бутиловым спиртом в процессе его образования при 100° в растворе, содержащем перекись водорода.

В связи с тем, что в отсутствие кислорода тироксин не образуется, кажется очевидным, что окисление перекисью водорода весьма существенно для его образования. Кроме того, состав молекул дииодтирозина также является важным фактором в этой реакции. Питт-Риверс [331a] показал, что если аминогруппы дииодтирозина ацетилированы, то выход возрастает, а если амино- и карбоксигруппы связаны, как в пептиде N-ацетил-*dl*-дииодтирозилглутаминовая кислота, то выход N-ацетил-*dl*-тироксилглутаминовой кислоты увеличивается до 36%. Особое значение имеет тот факт, что pH 7,5 является оптимальным для этой реакции; это делает возможным предположение, что биосинтез тироксина протекает аналогично. Механизм этого процесса, как считают Джонсон и Тьюксбери [332], а также Харингтон [329], включает начальную конденсацию 2 молекул дииодтирозина, что приводит к образованию лабильного промежуточного продукта, который может перегруппировываться в тироксин, теряя одну боковую цепь, которая отделяется в виде дегидроаланина, образующего аммиак и пировиноградную кислоту или серин:

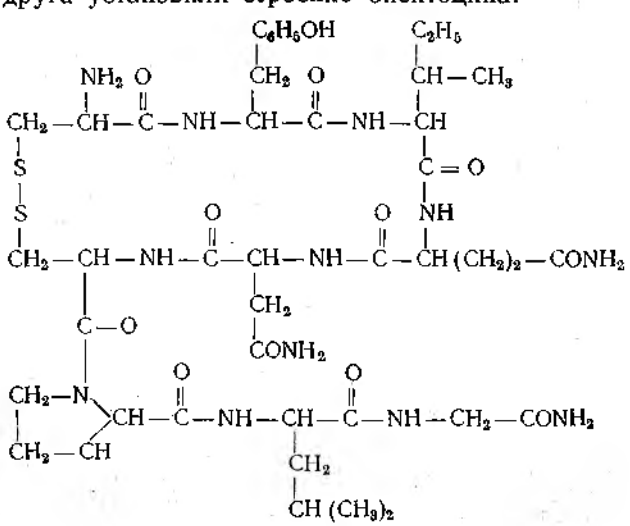


Если эта гипотеза верна и механизм образования тироксина действительно представляет собою окислительное соединение двух молекул дииодтирозина, то в реакционной смеси непременно можно было бы обнаруживать присутствие или серина, или пировиноградной кислоты, что и было подтверждено; Джонсон и Тьюксбери [332] получили пировиноградную кислоту и аммиак, а Оно*, пользуясь хроматографическими методами, определил среди продуктов реакции серин.

Таким образом, кажется ясным, что в процессе иодирования белков тироксин образуется внутри белковых молекул посредством окислительного соединения двух дииодтирозиновых остатков и последующего отделения одной боковой цепи. Следовательно, дииодтирозиновые остатки должны располагаться в белковой молекуле таким образом, что пространственная конфигурация позволяет им реагировать внутримолекулярно. И так как известно, что не все тирозиновые группы в белках расположены одинаково [333, 334], то неудивительно, что действительное количество тироксина, получаемого из иодированных белков, никогда не достигает теоретической величины, вычисляемой по содержанию тирозина в белковой молекуле.

ДОПОЛНЕНИЕ

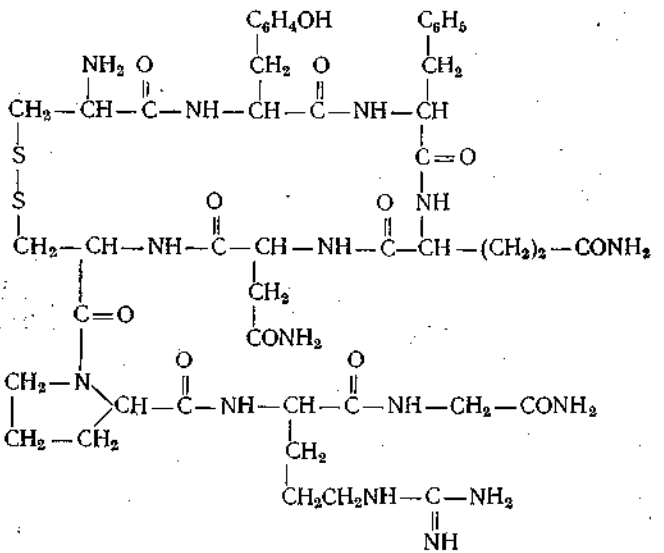
Как следует из недавно опубликованных сообщений Таппи [335] и Дю Виньо с сотрудниками [336, 336a], эти авторы независимо друг от друга установили строение окситоцина:



* Неопубликованные данные, приводимые в работе Роше и Мишеля [312].

Полный синтез гормона также был осуществлен Дю Виньо с сотрудниками [336], которые получили пептидное производное N-карбобензокси-S-бензил-*l*-цистеинил-*l*-тирозин-*l*-изолейцил-*l*-глютаминил-*l*-аспарагинил-S-бензил-*l*-цистеинил-*l*-пролил-*l*-лейцилглицинамид. Синтезированное вещество оказывало ожидаемое окситоцическое действие на изолированную крысиную матку и оказалось эффективным при стимуляции родовых схваток и млекоотделения у женщин. Этот первый синтез полипептидного гормона, молекулярный вес которого близок к 1000, является замечательным достижением.

Дю Виньо с сотрудниками предложили расшифровку структуры вазопрессина [337]; такое же строение было дано и исследователями из лаборатории Фромажо [337а]:



По сообщению группы сотрудников Корнелльского университета [337] синтез октапептида такой структуры привел к получению биологически активного вещества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayliss W. M., Starling E. H., J. Physiol., 28, 325, 1902.
2. Addison Thomas, On the Constitutional and Local Effects of Diseases of the Suprarenal Capsules. S. Highley, London, 1855.
3. Smith P. E., J. Am. Med. Assoc., 88, 158, 1927.
4. Fevold H. L., Hisaw F. L., Leonard S. L., Am. J. Physiol., 97, 291, 1931.
5. Evans H. M., Simpson M. E., Lyons W. R., Turpeinen K., Endocrinology, 28, 933, 1941.

6. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., Endocrinology, 27, 803, 1940.
7. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., Science, 92, 355, 1940.
8. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., J. Am. Chem. Soc., 64, 367, 1942.
9. Shedlovsky T., Rothen A., Greep R. O., van Dyke H. B., Chow B. F., Science, 92, 178, 1940.
10. Chow B. F., van Dyke H. B., Greep R. O., Rothen A., Shedlovsky T., Endocrinology, 30, 650, 1942.
11. Chow B. F., Endocrinology, 30, 657, 1942.
12. Greep R. O., van Dyke H. B., Chow B. F., Endocrinology, 30, 635, 1942.
13. Chow B. F., Greep R. O., van Dyke H. B., Endocrinology, 1, 440, 1939.
14. Fraenkel-Conrat H. L., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 130, 247, 1939.
15. Greep R. O., van Dyke H. B., Chow B. F., J. Biol. Chem., 133, 289, 1940.
16. Chow B. F., Ann. N. Y. Acad. Sci., 43, 309, 1943.
17. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., Science, 109, 445, 1949.
18. Li C. H., Vitamins and Hormones, 7, 223, 1949.
19. Li C. H., Pedersen K. O., J. Gen. Physiol., 35, 629, 1952.
20. McShan W. H., Meyer R. K., J. Biol. Chem., 135, 4733, 1940.
21. Li C. H., J. Am. Chem. Soc., 72, 2815, 1950.
22. Van Dyke H. B., Pan S. Y., Shedlovsky T., Endocrinology, 46, 563, 1950.
23. Stricker P., Grueter F., Compt. rend. soc. biol., 99, 1978, 1928.
24. Corner G. W., Am. J. Physiol., 95, 43, 1930.
25. Riddle O., Bates R. W., Dykeshorn S. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 29, 1211, 1932.
26. Riddle O., Bates R. W., Dykeshorn S. W., Am. J. Physiol., 105, 191, 1933.
27. Lyons W. R., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 5, 198, 1937.
28. League Nations Bull. Health Organisation, 7, 887, 1938; 8, 909, 1939.
29. Lyons W. R., Endocrinology, 28, 161, 1941.
30. Bates R. W., Riddle O., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 55, 365, 1935.
31. Lyons W. R., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 35, 645, 1937.
32. Li C. H., Lyons W. R., Evans H. M., J. Gen. Physiol., 23, 433, 1940.
33. Li C. H., Lyons W. R., Evans H. M., J. Biol. Chem., 140, 43, 1941.
34. Li C. H., Lyons W. R., Evans H. M., J. Gen. Physiol., 24, 303, 1941.
35. White A., Vitamins and Hormones, 7, 253, 1949.
36. Li C. H., Lyons W. R., Evans H. M., J. Biol. Chem., 139, 43, 1941.
37. Li C. H., Kalman A., J. Am. Chem. Soc., 68, 285, 1946.
38. Fraenkel-Conrat H. L., J. Biol. Chem., 142, 119, 1942.
39. Fraenkel-Conrat H. L., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 142, 107, 1942.
40. Li C. H., Fraenkel-Conrat H. L., J. Biol. Chem., 167, 2, 1947.
41. Li C. H., J. Biol. Chem., 175, 459, 1949.
42. Fleisher J. A., J. Biol. Chem., 147, 525, 1943.
43. Li C. H., Growth Symposium, 12, 47, 1948.
44. Smith P. E., Smith I. P., J. Metabolic Res., 43, 267, 1922.
45. Smith P. E., Am. J. Anat., 45, 205, 1930.

46. Houssay B. A., Biosotti A., Magdalena A., Comp. rend., soc., biol., 110, 142, 1932.
47. Loeb L., Bassett R. B., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 27, 490, 1930.
48. Janssen S., Loeser A., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 163, 517, 1931.
49. Ciereszko L. S., J. Biol. Chem., 160, 585, 1945.
50. Fraenkel-Conrat J., Fraenkel-Conrat H. L., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 135, 199, 1940.
51. Albert A., Ann. N. Y. Acad. Sci., 50, 466, 1949.
52. Albert A., Rawson R. W., Merrill P., Lennon B., Riddell C. B., J. Biol. Chem., 166, 637, 1946.
53. Borell U., Holmgren H., Acta Endocrinol., 3, 331, 1949.
54. Levin L., Smelser G. K., Moore D. H., Endocrinol., 30, 171, 1942.
55. Steelman S. L., Griffee J. W., Jr., Hawrylewicz E. J., Federation Proc., 11, 292, 1952.
56. White A., Physiol. Rev., 26, 574, 1946.
57. Chow B. F., Greep R. O., van Dyke H. B., J. Endocrinol., 1, 440, 1939.
58. Crowe S. J., Cushing H., Homans J., Bull. Johns Hopkins Hosp., 21, 127, 1910.
59. Evans H. M., Long J. A., Anat. Record, 21, 61, 1921.
60. Li C. H., Evans H. M., Simpson M. E., J. Biol. Chem., 159, 353, 1945; Science, 108, 624, 1948.
61. Wilhelmi A. E., Fishman J. B., Russell J. A., J. Biol. Chem., 176, 735, 1948.
62. Greenspan F. S., Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M., in Emmens C. W., ed., Hormone Assay, Academic Press, New York, 1950, Chap. XII, p. 273.
63. Teel H. M., Science, 69, 405, 1929.
64. Evans H. M., Uyei N., Bartz Q. R., Simpson M. E., Endocrinology, 22, 483, 1938.
65. Collip J. B., Selye H., Thompson D. L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 30, 544, 1933.
66. Dingemanse E., Freud J., Acta Brevia Neerland. Physiol., Pharmacol., Microbiol., 5, 109, 1935.
67. Li C. H., Pedersen K. O., J. Biol. Chem., 201, 595, 1953.
68. Evans H. M., Simpson M. E., Li C. H., Growth, 12, 15, 1948.
69. Simpson M. E., Evans H. M., Li C. H., Growth, 13, 151, 1949.
70. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 176, 2, 1948.
71. Li C. H., Evans H. M., Recent Progr. Hormone Research, 3, 3, 1948.
72. Li C. H., Moskowitz M., J. Biol. Chem., 178, 203, 1949.
72a. Li C. H., J. Phys. Coll. Chem., 51, 218, 1947.
73. Smith E. L., Brown D. M., Fishman J. B., Wilhelmi A. E., J. Biol. Chem., 177, 305, 1949.
74. Sanger F., Biochem. J., 39, 507, 1945.
75. Li C. H., Ash L., J. Biol. Chem., 203, 419, 1953.
76. Condliffe P., Li C. H., Federation Proc., 11, 198, 1952.
77. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., Science, 96, 450, 1942.
78. Li C. H., Evans H. M., Simpson M. E., J. Biol. Chem., 149, 413, 1943.
79. Sayers G., White A., Long C. N. H., J. Biol. Chem., 149, 425, 1943.
80. Anselmino K. J., Hoffman F., Herold L., Klin. Wochschr., 13, 209, 1943; Arch. Gynäkol., 157, 86, 1934.

81. Grooke A. C., Henly A. A., Morris C. J. O. B., Intern. Congr. Physiol., Abstr. of Communs. 17th Congr. 1947, p. 139.
82. Tislowitz R., Science, **98**, 225, 1943.
83. Li C. H., Conf. on Metabolic Aspects Convalescence, Trans. 17th Meeting 1948, p. 114.
84. Li C. H., Federation Proc., **8**, 219, 1949.
85. Li C. H., Pedersen K. O., Arkiv Kemi, **1**, 333, 1950.
86. Luft R., Sjögren B., Li C. H., Acta Endocrinol., **3**, 299, 1949.
87. Brink N. G., Meisinger M. A. P., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **72**, 1040, 1950.
88. Brink N. G., Kuehl F. A., Jr., Meisinger M. A. P., Bishop M. N., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **74**, 480, 1952.
89. Lesh J. B., Fisher J. D., Bunding T. M., Kocsis J. J., Walaszek W. F., White W. F., Hays E. E., Science, **112**, 43, 1950.
90. Forsham P. H., Renold A., Lesh J. B., Proc. Clin. ACTH Conf. 2nd Conf., 1950, **1**, 7, 1951.
91. White W. F., Fierce W. L., Lesh J. B., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **78**, 616, 1951.
91a. White W. F., Fierce W. L., J. Am. Chem. Soc., **75**, 245, 1953.
91b. White W. F., J. Am. Chem. Soc., **75**, 503, 1953.
92. Cortis-Jones B., Crooke A. C., Henly A. A., Morris P., Morris C. J. O. R., Biochem. J., **46**, 173, 1950.
93. Morris P., Morris C. J. O. R., Lancet, **258**, p. 117 (Jan. 21, 1950).
94. Sayers M. A., Sayers G., Woodbury L. A., Endocrinol., **42**, 379, 1949.
95. Reinhardt W. O., Li C. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **77**, 229, 1951.
96. Ingle D. J., Li C. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **79**, 128, 1952.
97. Moyer A. W., Van der Scheer J., Ritter H., Tesar W. C., Logan J. B., Oleson J. J., Cox H. R., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **79**, 1, 1952.
98. Dixon H. B. F., Stack-Dunne M. P., Young F. G., Nature, **168**, 1044, 1951.
99. Moon H. D., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **35**, 649, 1937.
100. Parkes A. S., Bruce H. M., Perry W., Lancet, **260**, p. 790 (Apr. 19, 1952).
101. Li C. H., Tiselius A., Pedersen K. O., Hagdahl L., Carstensen H., J. Biol. Chem., **190**, 317, 1951.
102. Tiselius A., Hagdahl L., Acta Chem. Scand., **4**, 394, 1950.
103. Li C. H., Ash L., Papkoff H., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1923, 1952.
104. Payne R. W., Raben W. S., Astwood E. B., J. Biol. Chem., **187**, 719, 1950.
105. Kamm O., Aldrich T. B., Grotz I. W., Rowe L. W., Brigbee Y. P., J. Am. Chem. Soc., **50**, 573, 1928.
106. Astwood E. B., Raben M. S., Payne R. W., Grady A. B., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2969, 1951.
107. Astwood E. B., Raben M. S., Payne R. W., Recent Progr. Hormone Res., **7**, 1, 1952.
108. Li C. H., Liddle G. W., Reinhardt W. O., Bennett L. L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **78**, 665, 1951.
109. Li C. H., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2124, 1952.
110. Li C. H., Acta Endocrinol., **10**, 255, 1952.
111. Brink N. G., Kuehl F. A., Jr., Richter J. W., Bazemore A. W., Meisinger M. A. P., Ayer D. E., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2120, 1952.
111a. Brink N. G., Bazemore A. W., Richter J. W., Ayer D. B., Finnerty J., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1949, 1953;

Richter J. W., Ayer D. E., Bazemore A. W., Brink N. G., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., 75, 1952/1953; Kuehl F. A., Jr., Meisinger M. A. P., Brink N. G., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., 75, 1955/1953; Brink N. G., Boxer G. A., Jelinek V. C., Kuehl F. A., Jr., Richter J. W., Folkers K., J. Am. Chem. Soc., 75, 1960, 1953.
112. Porath J. O., Li C. H., Biochem. Biophys. Acta, in press.
113. Ascheim S., Zondek B., Klin. Wochshr., 6, 1322, 1927.
114. Browne J. S. L., Venning E. M., Lancet, 2, 1507, 1936.
115. Elder J. H., Bruhn J. M., Yale J. Biol. Med., 12, 155, 1939.
116. Delfs E., Endocrinol., 28, 196, 1941.
117. Collip J. B., Can. Med. Assoc. J., 22, 215, 1930.
118. Kido I., Zentralbl. Gynäkol., 61, 1551, 1937.
119. Aschheim S., Zondek B., Klin. Wochschr., 7, 8, 1404, 1928.
120. Katzman P. A., Doisey E. A., J. Biol. Chem., 98, 739, 1932.
121. Gurin S., Bachman C., Wilson D. W., J. Biol. Chem., 128, 525, 1939.
122. Katzman P. A., Godfrid M., Cain C. K., Doisey E. A., J. Biol. Chem., 148, 501, 1943.
123. Claesson L., Hogberg B., Rosenberg Th., Westerman A., Acta Endocrinol., 1, 1, 1948.
124. Lundgren H. P., Gurin S., Bachman C., Wilson D. W., Biol. Chem., 142, 367, 1942.
125. Gurin S., Bachman C., Wilson D. W., J. Biol. Chem., 133, 467, 1940.
126. Abramowitz A. A., Hisaw F. L., Endocrinology, 25, 623, 1939.
127. Reiss M., Haurowitz F., Z. ges. exptl. Med., 68, 371, 1929.
128. Wiesner B. P., Marshall P. G., Quart. J. Exptl. Physiol., 21, 147, 1931.
129. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 131, 259, 1939.
130. Bischoff F., Endocrinol., 30, 525, 1942.
131. Evans H. M., Simpson M. E., Hormones, 2, 351, 1950.
132. Simpson M. E., Li C. H., Evans H. M., Endocrinol., 30, 969, 1942.
133. Cole H. H., Hart G. H., Am. J. Physiol., 93, 57, 1930.
134. Cole H. H., Saunders F. J., Endocrinol., 19, 199, 1935.
135. Cole H. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 38, 193, 1938.
136. Catchpole H. R., Lyons W. R., Am. J. Anat., 55, 167, 1934.
137. Cole H. H., Goss H., in Essays in Biology, Univ. Calif. Press, Berkeley, Calif., 1943, p. 107.
138. Levin L., in The Chemistry and Physiology of Hormones, Am. Assoc. for Advancement of Sci., Washington, D. C., 1944, p. 162.
139. Cole H. H., Pencharz R. I., Goss H., Endocrinol., 27, 548, 1940.
140. Goss H., Cole H. H., Endocrinol., 15, 214, 1931.
141. Goss H., Cole H. H., Endocrinol., 26, 244, 1940.
142. Cartland F. G., Nelson J. W., J. Biol. Chem., 119, 59, 1937.
143. Li C. H., Evans H. M., Wonder D. H., J. Gen. Physiol., 23, 733, 1940.
144. Rimington C., Rowlands I. W., Biochem. J., 38, 54, 1944.
145. Evans J. S., Nelson J. W., Cartland G. F., Endocrinol., 30, 387, 1942.
146. Evans J. S., Hauschildt J. D., J. Biol. Chem., 145, 335, 1942.
147. Gurin S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 49, 48, 1942.
148. Li C. H., Simpson M. E., Evans H. M., J. Biol. Chem., 131, 259, 1939.

149. Bischoff F., Endocrinol., 30, 525, 1942.
150. Bischoff F., Endocrinol., 29, 520, 1941.
151. Fraenkel-Conrat H. L., Simpson M. E., Evans H. M., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 45, 627, 1940.
152. Oliver G., Shäfer E. A., J. Physiol., 18, 277, 1895.
153. Howell W. H., J. Exptl. Med., 3, 245, 1898.
154. Kamm O., Aldrich T. B., Grote I. W., Rowe L. W., Bugbee E. P., J. Am. Chem. Soc., 50, 573, 1928.
155. Stehl R. L., Fraser A. M., J. Pharmacol., 55, 136, 1935.
156. Irving G. W., Dyer H. M., du Vigneaud V., J. Am. Chem. Soc., 63, 503, 1941.
157. Abel J. J., Rouiller Chas. A., Geiling E. M. K., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 22, 289, 1924.
158. Abel J. J., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 40, 139, 1930.
158a. Rosenfeld M., Bull. Johns Hopkins Hosp., 66, 398, 1940.
159. Van Dyke H. B., Chow B. F., Greep R. O., Rothen A., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 74, 190, 1942.
160. Dale H. H., Laidlaw P. P., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 4, 75, 1912.
161. Coon J. M., Arch. intern. pharmakodynamie, 62, 79, 1939.
162. Burn J. H., Quart. J. Pharm. Pharmacol., 4, 517, 1931.
163. Birnie J. H., Eversole W. J., Boss W. R., Osborn C. M., Gaunt R., Endocrinol., 47, 1, 1950.
163a. Stein M., Ginko R., Mirsky R. A., Endocrinol., 51, 492, 1952.
164. I. G. Farbenindustrie, герм. пат. 550935, May 24, 1932.
165. Gulland J. M., Newton W. H., Biochem. J., 26, 337, 1932.
166. Potts A. M., Gallagher T. F., J. Biol. Chem., 154, 349, 1944.
167. Craig L. C., J. Biol. Chem., 155, 519, 1944.
168. du Vigneaud V., Livermore A. H., J. Biol. Chem., 180, 365, 1949.
169. du Vigneaud V., Pierce J. G., J. Biol. Chem., 182, 359, 1950.
169a. Pierce J. G., Gordon S., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., 199, 929, 1952.
170. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., 178, 53, 1949.
171. Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., 176, 337, 1948.
172. Pierce J. G., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., 186, 77, 1950.
172a. Kunkel H. G., Taylor S. P., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., 200, 559, 1953.
173. Mueller J. M., Pierce J. G., Davoll H., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., 191, 309, 1951.
174. Turner R. A., Pierce J. G., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., 193, 359, 1951.
175. Levy A. L., J. Chem. Soc., 1950, 404.
176. Davoll H., Turner R. A., Pierce J. G., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., 193, 363, 1951.
177. Privat de Garilhe M., Maier-Hüser H., Fromageot C., Biochim. Biophys. Acta, 7, 471, 1951.
178. du Vigneaud V., Turner R. S., Pierce J. G., J. Biol. Chem., 191, 21, 1951.
179. Fromageot C., Maier-Hüser H., Compt. rend., 232, 2367, 1951.
180. du Vigneaud V., Am. Chem. Soc. Symposium, 12, 97, 1951.
181. Irving G. W., du Vigneaud V., Ann. N. Y. Acad. Sci., 43, 273, 1943.
182. Potts A. M., Gallagher T. F., J. Biol. Chem., 143, 561, 1942.
182a. Popenoe E. A., Pierce J. G., du Vigneaud V., van Dyke H. B., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 81, 506, 1952.

183. Whittlestone W. J., J. Endocrinol., 8, 89, 1952.
184. MacArthur C. G., Science, 73, 448, 1931.
185. Rothen A., Chow B. F., Greep R. O., van Dyke H. B., Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 9, 272, 1941.
186. Sealock R. R., du Vigneaud V., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 54, 433, 1935.
187. Ames R. G., Moore D. H., van Dyke H. B., Endocrinology, 46, 215, 1950.
188. Von Mering J., Minlowski V., Arch. expti. Path. Pharmakol., 26, 371, 1890.
189. Minkowsky O., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 31, 85, 1892.
190. Hedon E., Compt. rend. soc., biol., 44, 678, 1892.
191. Banting F. G., Best C. H., J. Lab. Clin. Med., 7, 251, 1921/1922.
192. Abel J. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 12, 132, 1926.
193. Harington C. R., Scott D. A., Culhane K., Marks H. P., Trevan J. W., Biochem. J., 23, 384, 1929.
194. Hemmingsen A. M., Krough A., Pub. League Nations, III, Health, III, C. H., 398, 1926.
195. Banting F. G., Best C. H., Collip J. B., Macleod J. J. R., Noble E. C., Am. J. Physiol., 62, 162, 1922.
196. Waugh D. F., Thompson R. E., Weimer R. J., J. Biol. Chem., 185, 85, 1950.
197. Abel J. J., Geiling E. M. K., Rouiller C. A., Bell F. K., Wintersteiner O., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 31, 65, 1927.
198. Scott D. A., Biochem. J., 28, 1592, 1934.
199. Cohn E. J., Ferry J. D., Livingood J. J., Blanchard M. H., J. Am. Chem. Soc., 63, 17, 1941.
200. Sahyun M., J. Biol. Chem., 138, 487, 1941.
201. Lens J., Biochim. Biophysica Acta, 2, 76, 1948.
202. Romans R. G., Scott D. A., Fisher A. M., Ind. Eng. Chem., 32, 508, 1940.
202a. Low B., Nature, 169, 955, 1952.
203. Wintersteiner O., Abramson H. A., J. Biol. Chem., 99, 741, 1933.
204. Howitt F. O., Prideaux E. B. R., Proc. Roy. Soc. (London), B112, 13, 1932.
205. Cohn E. J., Ferry J. D., Livingood J. J., Blanchard M. H., Science, 90, 183, 1939.
206. Volkin E., J. Biol. Chem., 175, 675, 1948.
207. Scott D. A., Endocrinol., 25, 437, 1939.
208. Hali J. L., J. Biol. Chem., 139, 175, 1941.
209. Miller J. L., Andersson K. J. I., J. Biol. Chem., 144, 459, 1942.
210. Sjögren B., Svedberg T., J. Am. Chem. Soc., 53, 2657, 1931.
210a. Porter R. R., Biochem. J., 53, 320, 1953.
211. Fredericq E., Neurath H., J. Am. Chem. Soc., 72, 2684, 1950.
211a. Tietze F., Neurath H., J. Am. Chem. Soc., 75, 1758, 1953.
211b. Pickels E. G., Harrington W. F., Schachman H. K., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 38, 943, 1952.
212. Harfenist E. J., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., 74, 3083, 1952.
213. Craig L. C., Hausmann W., Ahrens E. H., Jr., Harfenist E. J., Anal. Chem., 23, 1236, 1951.
213a. Harfenist E. J., J. Am. Chem. Soc., 75, 5528, 1953.
214. Waugh D. F., Am. J. Physiol., 133, 484, 1941.
215. Waugh D. F., J. Am. Chem. Soc., 68, 247, 1946.
216. Waugh D. F., J. Am. Chem. Soc., 70, 1850, 1948.
217. Du Vigneaud V., Geiling E. M. K., Eddy C. A., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 33, 497, 1928.

218. Gerloch T. D., Bates R. W., J. Pharmacol. Exptl. Therap., **45**, 19, 1932.
219. Du Vigneaud V., Sifferd R. H., Sealock R. R., J. Biol. Chem., **102**, 521, 1933.
220. Rothen A., Chow B. F., Greep R. O., Van Dyke H. B., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 9, 272, 1941.
221. Tristram G. R., Advances in Protein Chem., **5**, 83, 1949.
222. Fromageot C., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 49, 1949.
223. Gutfreund H., Biochem. J., **42**, 544, 1948.
224. Gutfreund H., Biochem. J., **50**, 564, 1952.
225. Oncley J. L., Ellenbogen E., Gitlin D., Gurd F. R. N., J. Phys. Chem., **56**, 85, 1952.
226. Tietze F., Neurath H., J. Biol. Chem., **194**, 1, 1952.
227. Doty P., Gellart M., Rabinowitch B., J. Am. Chem. Soc., 74, 2065, 1952.
228. Chibnall A. C., J. Intern. Soc. Leather Trades' Chemists, **30**, 1, 1946.
229. Miller G. L., Andersson K. J. I., J. Biol. Chem., **144**, 459, 1942.
230. Gutfreund H., Ogston A. G., Biochem. J., **40**, 432, 1946.
231. Creeth J. M., Nature, **170**, 210, 1952.
232. Pedersen K. O., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 65, 1949.
233. Crowfoot D., Proc. Roy. Soc. (London), **A164**, 580, 1938.
234. Crowfoot-Hodgkin D., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **14**, 65, 1949.
235. Mommaerts W. F. H. M., Neurath H., J. Biol. Chem., **186**, 815, 1950.
236. Steiner R. F., Arch. Biochem. Biophys, **39**, 355, 1952.
237. Fredericq E., Nature, **171**, 570, 1953.
237a. Fredericq E., Bull. soc. chim. biol., **33**, 420, 1951.
237b. Fredericq E., Biochim. Biophys. Acta, **9**, 601, 1952.
238. Harfenist E. J., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3087, 1952.
239. Battersby S. R., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1887, 1951.
240. Battersby S. R., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4023, 1952.
241. Jensen H., Evans E. A., Jr., J. Biol. Chem., 108, 1, 1935.
242. Sanger F., Nature, **162**, 491 1948.
243. Lens J., Biochim. Biophys. Acta, **3**, 367, 1949.
244. Fromageot C., Justisz M., Meyer D., Penasse L., Biochim. Biophys. Acta, 6, 283, 1950.
245. Chibnall A. C., Reese M. W., Biochem. J., **48**, XLVII, 1951.
246. Waley S. G., Watson J., J. Chem. Soc., **1951**, 2394.
247. Harris J. I., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2944, 1952.
248. Chibnall A. C., Reese M. C., Biochem. J., **52**, No. 1, III, 1952.
249. Sanger F., Thompson E. O. P., Biochem. J., **53**, 353, 366, 1953.
250. Toennies G., Homiller R. P., J. Am. Chem. Soc., **64**, 3054, 1942.
251. Sanger F., Biochem. J., **44**, 596, 1947.
252. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., Synge R. L.M., Biochem. J., **41**, 596, 1947.
253. Sanger F., Tuppy H., Biochem. J., **49**, 463, 481, 1951.
254. Harris J. I., Li C. H., J. Am. Chem. Soc., **74**, 2945, 1952.
254a. Sanger F., Thompson E. O. P., Tuppy H., Symposium sur les Hormones proteiques et derivees des proteines, Congr. biochim., II Congr. Paris, 1952, p. 36.
255. Bull H. B., Ann. Rev. Biochem., 21, 197, 1952.

256. Jensen H., Wintersteiner O., Geiling E. M. K., J. Pharnacol. Exptl. Therap., 36, 115, 1929.
257. Scott D. A., J. Biol. Chem., 92, 281, 1931.
258. Scott D. A., Fisher A. M., Trans. Roy. Soc. Can., 34, 137, 1940.
259. Wasserman P. W., Mirsky I. A., Endocrinol., 31, 115, 1942.
260. Sanger F., Nature, 164, 529, 1949.
260a. Sanger F., Ann. Repts. on Progr. Chem. (Chem. Soc. London), 45, 289, 1949.
261. Lens J., Evertzen A., Biochim. Biophys. Acta, 8, 332, 1952.
262. Harfenist E. J., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., 74, 4216, 1952.
263. Harrington C. R., Neuberger A., Biochem. J., 30, 809, 1936.
264. Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S., J. Biol. Chem., 161, 259, 1945.
265. Glendening M. B., Greenberg D. M., Fraenkel-Conrat H., J. Biol. Chem., 167, 125, 1947.
266. Mommaerts W. F. H. M., Neurath H., J. Biol. Chem., 185, 909, 1950.
267. Du Vigneaud V., Fitch A., Pekarek E., Lockwood W. W., J. Biol. Chem., 94, 273, 1931.
268. Stern K. G., White A., J. Biol. Chem., 117, 95, 1937.
269. Lens J., Neutelings J., Biochim. Biophys. Acta, 4, 501, 1950.
270. Frendenberg K., Wegman T., Z. physiol. Chem., 233, 159, 1935.
271. Reitz H. C., Ferrel R. E., Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S., J. Am. Chem. Soc., 68, 1024, 1946.
272. Stern K. G., White A., J. Biol. Chem., 122, 371, 1938.
273. Fraenkel-Conrat H., Fraenkel-Conrat J., Biochim. Biophys. Asta, 5, 89, 1950.
274. Philips D. M. P., Biochem J., 50, 479, 1952.
275. Butler J. A. V., Dodds E. C., Philips D. M. P., Stephen J. M. L., Biochem. J., 44, 224, 1949.
276. Van Abelee F. R., Campbell E. D., Federation Proc., 10, 263, 1951.
276a. Butler J. A. V., Dodds E. C., Phillips D. M. P., Stephen J. M. L., Biochem. J., 42, 116, 1948.
276b. Butler J. A. V., Phillips D. M. P., Stephen J. M. L., Creeth J. M., Biochem. J., 46, 74, 1950.
276c. Stephen J. M. L., Biochem. J., 49, 629, 1951.
276d. Bergmann M., Fruton J. S., Advances in Enzymol., 1, 63, 1941.
276e. Sanger F., Biochem. J., 44, 126, 1949.
276f. Phillips D. M. P., Biochim. Biophys. Acta, 3, 341, 1949.
276g. Phillips D. M. P., Biochem. J., 49, 506, 1951.
276h. Tiselius A., Eriksson-Quensel I. B., Biochem. J., 33, 1752, 1939.
276i. Jensen H., Insulin: Its Chemistry and Physiology, Commonwealth Fund, New York, 1938, p. 56.
277. Murlin J. R., Clough H. D., Gibbs C. B. F., Stokes A. M., J. Biol. Chem., 56, 252, 1923.
277a. Murlin J. R., Kimball C. P., J. Biol. Chem., 58, 337, 1923.
277b. Geiling E. M. K., De Lawder A. M., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 39, 369, 1930.
277c. Bürger M., Kramer H., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 156, 1, 1930.
277d. Shipley R. A., Hummel E. J., Am. J. Physiol., 144, 51, 1945.
277e. Sutherland E. W., Cori C. F., J. Biol. Chem., 172, 737, 1948.
277f. Sutherland E. W., Cori C. F., Haynes R., Olsen N. S., J. Biol. Chem., 180, 825, 1949.
278. Staub A., Sinn L., Behrens O. K., Science, 117, 628, 1953.

279. Mirray G. R., Brit. Med., J., 2, 296, 1891.
280. Oswald A., Z. physiol. Chem., 27, 14, 1899.
281. Oswald A., Z. physiol. Chem., 32, 121, 1901.
282. Kendall E. C., J. Biol. Chem., 39, 125, 1951.
283. Pitt-Rivers R., in Emmens C. W., ed., Hormone Assay, Academic Press, New York, 1950, p. 513.
284. Leland J. P., Foster G. C., J. Biol. Chem., 95, 165, 1932.
285. Roche J., Michel R., Biochim. Biophys. Acta, 1, 335, 1947.
286. Winikoff D., Trikojus V. M., Biochem. J., 42, 475, 1948.
287. Reineke E. P., Turner C. W., in Emmens C. W., ed., Hormone Assay, Academic Press, New York, 1950, p. 489.
288. Reineke E. P., Turner C. W., Mo. Agr. Expt. Sta., Res. Bull., 355, 1942.
289. Deanesly R., Parkes A. S., J. Endocrinol., 4, 324, 1945.
290. Smith A. U., Emmens C. W., Parkes A. S., J. Endocrinol., 5, 186, 1947.
291. Bauman E., Z. physiol. Chem., 21, 319, 1896.
292. Heidelberger M., Palmer W. W., J. Biol. Chem., 101, 433, 1933.
293. Derrien Y., Michel R., Roche J., Biochim. Biophys. Acta, 2, 454, 1948.
294. Derrien Y., Michel R., Pedersen K. O., Roche J., Biochim. Biophys. Acta, 3, 436, 1949.
295. Lundgren H. P., Nature, 138, 122, 1936; 143, 899, 1939; J. Chem. Phys., 6, 177, 1938.
296. Lundgren H. P., Williams J. W., J. Phys. Chem., 43, 989, 1939.
297. Lundgren H. P., J. Biol. Chem., 138, 293, 1941.
298. Harington C. R., Biochem. J., 20, 293, 1926.
299. Harington C. R., Salter W. T., Biochem. J., 24, 456, 1930.
300. Harington C. R., Biochem. J., 20, 300, 1926.
301. Harington C. R., Barger G., Biochem. J., 21, 169, 1927.
302. Harington C. R., Biochem. J., 22, 1429, 1928.
303. Borrows E. T., Clayton J. C., Hems B. A., J. Chem. Soc., 1949, 199.
304. Chalmers J. R., Dickson G. T., Elks J., Hems B. A., J. Chem. Soc., 1949, 3424.
305. Gaddum J. H., J. Physiol., 68, 383, 1930.
306. Reineke E. P., Turner C. W., Biol. Chem., 149, 563, 1943.
307 Pitt-Rivers R., Lerman J., J. Endocrinol., 5, 223, 1948.
308. Niemann C., Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 7, 167, 1950.
309. Harington C. R., Randall S. S., Biochem. J., 23, 373, 1929
310. Harington C. R., Proc. Roy. Soc. (London), B132, 223, 1944.
311. Reineke E. P., Vitamins and Hormones, 4, 207, 1946.
312. Roche J., Michel R., Advances in Protein Chem., 6, 253, 1951.
313. Roche J., Lissetzky S., Michel R., Compt. rend. soc. biol., 232, 2047, 1951.
314. Fink K., Fink R. M., Science, 108, 358, 1948.
315. Taurog A., Chaikoff I. L., Tong W., J. Biol. Chem., 179, 997, 1949.
316. Gross J., Leblond C. L., Endocrinol., 48, 714, 1951.
317. Gross J., Pitt-Rivers R., Lancet, 262, 439 (Mar. 1, 1952).
318. Roche J., Lissetzky S., Michel R., Ann. pharm. franc., 10, 166, 1952.
319. Gross J., Pitt-Rivers R., Lancet, 262, 593 (Mar. 22, 1952).
319a. Gross J., Pitt-Rivers R., Trotter W. R., Lancet, 262, 1044 (May 24, 1952).

320. Abelin A., Arch. exptl. Path. Pharmacol., **173**, 146, 1934; **175**, 151, 1934; **181**, 250, 1936; **189**, 473, 1938.
321. Ludwig W., von Mutzenbecker P., Z. physiol. Chem., **258**, 195, 1939.
322. Harington C. R., Pitt-Rivers R., Nature, **144**, 205, 1939.
323. Reineke E. P., Ann. N. Y. Acad. Sci., **50**, 450, 1949.
324. Reineke E. P., Williams M. B., Turner C. W., J. Biol. Chem., **147**, 115, 1943.
325. Reineke E. P., Turner C. W., Endocrinology, **29**, 667, 1941.
326. Koger M., Turner C. W., Mo. Agr. Expt. Sta. Res. Bull., **377**, 1943.
327. Reineke E. P., Turner C. W., Kohler G. O., Hoover R. D., Beesley M. B., J. Biol. Chem., **161**, 599, 1945.
328. Reineke E. P., Turner C. W., J. Biol. Chem., **149**, 55, 1943.
329. Harington C. R., J. Chem. Soc., **1944**, 193.
330. Von Mutzenbecker P., Z. physiol. Chem., **261**, 253, 1939.
331. Harington C. R., Pitt-Rivers R., Biochem. J., **39**, 157, 1945.
331a. Pitt-Rivers R., Biochem. J., **43**, 223, 1948.
332. Johnson T. B., Tewkesbury L. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **28**, 73, 1942.
333. Cramme J. L., Neuberger A., Biochem. J., **37**, 302, 1943.
334. Li C. H., J. Am. Chem. Soc., **67**, 1065, 1945.
335. Tuppy H., Biochim. Biophys. Acta, **11**, 449, 1953.
336. du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. G., Gordon S., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4879, 1953.
336a. du Vigneaud V., Ressler C., Trippett S., J. Biol. Chem., **205**, 949, 1953.
337. du Vigneaud V., Lawler H. C., Popenoe E. A., J. Am. Chem. Soc., 75, 4880, 1953.
337a. Acher R., Chauvet J., Biochim. Biophys. Acta, **12**, 487, 1953.

ТОКСИЧНЫЕ БЕЛКИ

В. Ван-Хайнинген

W. E. Van Heyningen, «Toxic Proteins» (vol. II, part A, pp. 345—387)

1. ВВЕДЕНИЕ

В литературе, посвященной токсичным белкам, рассматриваются главным образом неочищенные белки животного, растительного или бактериального происхождения, причем далеко не всегда можно быть уверенным в том, что они действительно являются белками. Это нетрудно выяснить для тех немногих белков, которые были выделены в состоянии, позволяющем применить обычные к ним критерии однородности (табл. 67). Однако подавляющее большинство токсинов до сих пор не выделено в чистом виде. Заключения относительно их белковой природы делались с большей или меньшей степенью достоверности на основании следующих критериев (всех или некоторых из них): а) инактивация при обработке, которая вызывает денатурацию белков (например, нагревание при 50—100°, очень резкие колебания pH и т. д.); б) неспособность к диализу; в) осаждение обычными осадителями белков и солями при высоких концентрациях; г) нерастворимость в органических растворителях; д) расщепление протеолитическими ферментами; е) антигенность. Вероятно, последнее является наиболее важным доказательством того, что рассматриваемое вещество имеет белковую природу, тем более, что часто это единственный доступный критерий. Конечно, этот критерий нельзя считать безошибочным, поскольку некоторые небелковые тела являются антигенами [1]. Положительные химические реакции на белки, как правило, ничего не доказывают, поскольку токсичные вещества содержат примеси неактивных белков. Кроме того, высокотоксичные растворы белков часто дают отрицательные реакции. Например, токсин столбняка активен при таких больших разведениях, что его нельзя обнаружить химическими методами.

Поскольку все вещества при введении в организм животного в достаточном количестве и при определенных условиях оказываются токсичными, то указание на токсичность должно сопровождаться ссылкой на верхний весовой предел летальной дозы (LD). Если в качестве такого предела избрать $1 \cdot 10^{-6}$ ч. веса уби-

Таблица 67

СВОЙСТВА ОЧИЩЕННЫХ ТОКСИЧНЫХ БЕЛКОВ

Характеристика	Дифтерийный токсин [2]	Нейротоксин бациллы ботулизма типа А [2, 2a]	Столбнячный нейротоксин [2]	Нейротоксин палочки Шига [2b, 2c]	Рицин	Нейротоксин *Crotalus terrificus* (кротоксин)	Гемолизин кобры
Летальная доза (на 1 *кг* веса животного)	286 *мг* (мышь)	1,6 *нг*[а] (мышь)	5,0 *нг* (мышь)	1,3 *мг* (мышь)	78 *мг* (мышь) [3]	360 *мг* (мышь) [5]	7,2 *мг* (голубь) [6]
	286 *нг* (морская свинка)	0,83 *нг* (морская свинка)	0,83 *нг* (морская свинка)	0,83 *нг* (кролик)	100 *нг* (кролик) [4]		
Изоэлектрическая точка	4,1	5,5	5,1	~4	5,4—5,5 [3]	4,71 [7]	8,55—8,66 [8]
Константа диффузии (20°), $см^2/сек \times 10^7$	6,0	2,14	—	5,7	6,0 [3]	8,59 [9]	9,9[б]
Константа осаждения	4,6	17,3	4,5	4,8	4,8 [3]	3,13 [9]	—
Коэффициент диссиметрии $f/f°$	1,22	1,76	—	1,26	1,2 [3]	1,2 [9]	—
Молекулярный вес	72 000	900 000—1 130 000	67 000	82 000	77 000 [3]	30 000 [9]	33 200 [10]

[а] 1 *нг* $1 \cdot 10^{-9}$ *г* $= 1 \cdot 10^{-3}$ *мг* (см. стр. 641 и [14]).

[б] Вычислено по $D_7^0 = 0{,}0579$ *см²/сутки* (см. [8]).

ваемого животного*, то это исключит большинство низкомолекулярных ядов, подобных атропину (LD для кошки 30 *мг/кг*) [11]. Останутся же только более токсичные, такие, как аконитин (LD для кролика 120 *мг/кг*) [12] и фторацетат натрия (LD для собаки 50 *мг/кг*) [13]. Большинство токсичных белков, описываемых

* Летальная доза тогда была бы 1 *мг* на килограмм веса животного. Для удобства под обозначением LD подразумевается как MLD, так и LD_{50}, поскольку разница между этими двумя величинами не имеет значения для целей настоящей работы.

в этой главе, вероятно, войдет в эту группу, поскольку они находятся среди наиболее ядовитых из известных в настоящее время веществ. Летальные дозы некоторых из них могут быть выражены в наноrраммах (т. е. миллимикрограммах: 1 *мμг*=1 *нг*=10^{-9} *г*) или в пикограммах (т. е. микромикрограммах: 1 *ммг*= 1 *пг*=10^{-12} *г*) [14].

А. Факторы, влияющие на токсичность

Некоторые токсичные белки являются ферментами, и их ядовитость—следствие ферментативной активности. Например, α-токсин *Clostridium welchii* (*perfringens*) и кротоксин *Crotalus terrificus* представляют собой фосфатидазы, а ×-токсин *Cl. welchii* и коагулирующие токсины многих змеиных ядов являются протеолитическими ферментами. Однако из этого не следует, что все токсичные белки—ферменты. В большинстве случаев механизм их действия еще не известен, но имеются данные, что по крайней мере один токсин, а именно дифтерийный токсин, может действовать путем конкурентного ингибирования синтеза цитохрома.

Токсины и ферменты могут быть инактивированы (токсоидированы) таким образом, что они теряют ядовитость, но сохраняют свои антигенные свойства или способность соединяться с антителами. Поскольку это справедливо для белков, сильно отличающихся один от другого по характеру действия, то разрушаемые функциональные группы нельзя отнести к какому-нибудь определенному типу активности. Токсоидирование может протекать самопроизвольно, но может быть и ускорено различными реагентами, такими, как формальдегид, кетен, иод, азотистая кислота, сероуглерод, аскорбиновая кислота и пепсин. Ацетилирование свободных аминогрупп пепсина не приводит к потере его активности, но изменение тирозиновых остатков кетеном, иодом или азотистой кислотой вызывает инактивацию [15—17]. Хроматограммы на бумаге гидролизатов дифтерийного токсоида не содержат пятен тирозина [18], но это объясняется разрушением тирозина непрочно связанным формальдегидом во время кислотного гидролиза (Войвуд, частное сообщение). Химические данные относительно тирозиновых групп еще не доказывают, что эти группы существенно необходимы для токсичности или ферментативной активности; изменение тирозина может сопровождаться другими реакциями, влияющими на активность. На первый взгляд кажется, что биологические данные, полученные в последнее время, указывают на более тесную связь тирозина с ядовитостью дифтерийного токсина. Если выращивать дифтерийные палочки на средах, не содержащих тирозина, то фильтрат культуры содержит мало токсина, но много токсоида [19]. Однако это наблюдение пока не подтверждено [19а].

Вероятно, имеется много способов, при помощи которых белки можно слегка денатурировать таким образом, чтобы они токсоидировались без полной денатурации. При отстаивании растворов чистого столбнячного токсина последний самопроизвольно токсоидируется, и в то же время его константа осаждения увеличивается с 4,5 до 7,5. Эти изменения ускоряются при добавлении формальдегида в очень малых концентрациях. Предполагалось, что токсоид может образоваться при димеризации молекул токсина, соединяющихся посредством своих токсичных групп [20]. Дифтерийный токсин токсоидируется миелопероксидазой или пероксидазой хрена в присутствии перекиси водорода и одного или нескольких неидентифицированных диализирующихся факторов, которые найдены в неочищенном культуральном фильтрате, в продуктах переваривания казеина и в моче [20a].

Сравнение токсичности усложняется еще тем, что различные виды животных сильно различаются по своей чувствительности к определенному токсичному белку. Дифтерийный токсин в 1000 раз более ядовит для морских свинок (на единицу веса), чем для мышей [20b]. Токсичность нейротоксина палочки Шига для кроликов в 100—1000 раз больше, чем для мышей [2b, 21]. Растительный белок рицин в 140 раз более ядовит для лошадей, чем для мышей [22]. Токсичность яда кобры для лошадей в 20 раз больше, чем для собак [23]. Кроме того, различные образцы одного и того же токсина могут изменяться по своей относительной токсичности для различных видов животных. Так, некоторые образцы токсина *Clostridium botulinum* типа B в 6000 раз токсичнее для морских свинок, чем для мышей [24], тогда как для других препаратов это различие гораздо меньше (всего в 3 раза) [25]. Одни препараты токсина столбняка в 350 раз токсичнее для морских свинок, чем для мышей, тогда как другие—только в 3 раза [26]. Аналогичное различие наблюдается и в действии токсичных и гемолитических фосфатидаз, которые имеют одинаковую ферментативную активность *in vitro* (см. стр. 657). Фосфатидаза бактерии *Cl. welchii* (α-токсин) быстро вызывает лизис эритроцитов овцы и медленно—эритроцитов лошади, тогда как одна из фосфатидаз бактерии *Clostridium oedematiens* (γ-токсин), наоборот, медленно гемолизирует эритроциты овцы и быстро—эритроциты лошади [27]. Однако обе эти фосфатидазы с одинаковой скоростью гидролизуют фосфатиды, экстрагированные из эритроцитов как лошади, так и овцы [28]. Подобные фосфатидазы трех различных штаммов бактерии *Clostridium bifermentans* дают соответственно в 9, 60 и 70 раз меньший токсический и гемолитический эффекты на единицу ферментативной активности *in vitro*, чем фосфатидаза *Clostridium welchii* [29]. Фосфатидаза *Bacillus cereus* в 4 раза менее токсична для мышей, чем фосфатидаза *Cl. welchii* [30].

Ясно, что токсичность белков зависит не только от их способности вызывать или изменять некоторые основные биохимические реакции, но и от других факторов. Очевидно, что в организме животного, которое собираются убить, обязательно должен быть субстрат для молекулы яда. Например, уреаза ядовита для кроликов потому, что она превращает мочевину крови в аммиак; кровь кур не содержит мочевину, и поэтому куры не чувствительны к уреазе [31]. Кроме того, токсичные белки могут становиться частично или полностью неэффективными в присутствии соответствующих ингибиторов. Так, фосфатидаза *B. cereus* менее токсична, чем фосфатидаза *Cl. welchii*, потому что первая угнетается одним из компонентов нормальной сыворотки, а вторая—нет [30]. Однако таким образом нельзя объяснить относительно низкую токсичность фосфатидаз *Cl. bifermentans*, потому что эти ферменты не угнетаются нормальной сывороткой *in vitro* [29]. Необходимо также учитывать разрушение токсинов *in vivo*. Большинство токсичных белков эффективно только при парэнтеральном введении, а при поступлении *per os* они расщепляются протеолитическими ферментами кишечника. Из всех известных токсинов только токсин бациллы ботулизма и рицин ядовиты при введении *per os*. Но, с другой стороны, изменения токсичности могут вызываться присутствием соответствующих активаторов в живом организме. Так, определенные компоненты сыворотки и некоторых бульонов могут увеличивать ядовитость токсина столбняка в 64 раза [32].

Вероятно, кроме этих внешних факторов, на активность *in vivo* могут влиять также физические свойства молекулы токсина (ее форма, размер, заряд) или ее простетической группы (если она имеется), поскольку от этих свойств зависит способность токсина проникать к субстрату. Можно привести много примеров, когда два (или больше) фермента катализируют одну и ту же реакцию (так называемые изодинамические ферменты), но имеют различные простетические группы, молекулярные веса, изоэлектрические точки и стабильность. Так, оксидаза *l*-аминокислоты змеиного яда с молекулярным весом 61 600 имеет одну простетическую группу (флавинадениндинуклеотидную), и этот фермент в 500 раз активнее, чем оксидаза *l*-аминокислоты печени крысы с молекулярным весом 138 000, имеющая две флавинмононуклеотидные простетические группы. Печень крысы содержит и другую оксидазу *l*-аминокислоты, электрофоретически неотличимую от первой, но имеющую молекулярный вес в 4 раза больше [33]. Если бы подобные различия существовали между препаратами изодинамических токсинов, полученных из разных источников, то они могли бы влиять на поведение токсина в живом организме. С другой стороны, клетки животных различных видов, вероятно, различаются по своему внутреннему строению, что является причиной их неодинаковой восприимчивости к токсинам одного молекулярного типа.

Б. Иммунологические свойства [33а]

Токсичные белки, как и практически все другие белки, являются антигенами. Антитела, выработанные против токсинов и токсоидов, флоккулируются или осаждаются белком и часто (но не всегда) нейтрализуют или тормозят действие токсина. Так, ферментативная активность α-токсина *Cl. welchii* нейтрализуется соответствующим антитоксином как *in vitro*, так и *in vivo*. Но имеется несколько ферментов (например, тирозиназа, каталаза, инвертаза), которые хотя и осаждаются соответствующим антителом, но нейтрализуются лишь частично или не нейтрализуются совсем. Особенно интересна в этом отношении уреаза: ее токсический эффект *in vivo* подавляется антителом, в то время как флоккулят уреазы-антиуреазы *in vitro* сохраняет бо́льшую часть активности уреазы, находящейся в нем [31].

Люди и животные могут быть защищены от токсического действия белков посредством пассивной или активной иммунизации. При пассивной иммунизации пациенту вводится антитоксическая сыворотка крови лошади или другого животного. Этот способ имеет тот недостаток, что, будучи применен с опозданием, не дает желательных результатов, так как токсичные белки обычно очень быстро соединяются со своими субстратами. Активная иммунизация значительно эффективнее. В этом случае люди или животные, которые могут подвергаться воздействию токсичных белков при инфекциях, укусах змей или при лабораторных авариях, заранее иммунизируются соответствующим токсоидом. Тогда при введении токсичного белка антитела уже имеются в организме как раз в то время, когда они наиболее необходимы. И, кроме того, иммунизированное животное сразу реагирует на вторичный стимул, доводя количество антител до высокого уровня [34]. В странах, где применяется активная иммунизация, смертность от токсимических заболеваний, например от дифтерии и столбняка, фактически сведена к нулю.

Поскольку практически все чужеродные белки являются антигенами, то независимо от того, оказывают они или нет специфическое фармакологическое действие, белки способны специфически сенсибилизировать ткани тела. Именно повторная доза белка оказывается токсичной (анафилактичной) из-за ее иммунологического действия. Этот эффект, хотя и вызывается специфически определенным антигеном, совершенно не зависит от природы антигена, который может быть совершенно безвредным при первичном введении. Однако одни антигены могут вызывать реакцию анафилаксии легче, чем другие. Что касается патологических поражений при анафилактическом шоке, то они, вероятно, возникают вследствие сокращения гладких мышц и повреждения капиллярного эндотелия и связаны с освобождением из тканей гистаминоподобных веществ при реакции между антигеном и антителом на поверхности клетки.

Возможно, что случаи естественной сверхчувствительности людей к некоторым белкам, высокотоксичным для одних индивидуумов, но совершенно безвредным для других, также имеют анафилактическую природу. Не всегда возможно проследить первичное столкновение организма с этим белком, необходимое для анафилактической сенсибилизации, но имеются все основания полагать, что во многих случаях сенсибилизация произошла, хотя и не была опознана. Общая патология и присутствие в крови антител, хотя и нетипичных, но специфичных и способных соединяться с антигеном, полностью соответствуют чертам классической анафилаксии.

Даже собственные белки индивидуума могут стать токсичными. Имеются указания, что в некоторых случаях идиосинкразии к лекарствам, не вызывающим появления сверхчувствительности своим непосредственным фармакологическим действием, происходит сенсибилизация «чужеродным» антигеном вследствие соединения лекарственного вещества с белками ткани [1]. Однако в этих случаях антитела не удалось обнаружить, да и патологические изменения не типичны для классической анафилаксии.

Известно много случаев, когда белки патогенных бактерий, нетоксичные для здоровых животных, высокотоксичны для животных, страдающих данной инфекционной болезнью. Классическим примером является чувствительность к туберкулину [35, 36]. Для больных туберкулезом морских свинок 1—2 *мг* подогретого туберкулина *Mycobacterium tuberculosis* является смертельной дозой, а чтобы убить здоровое животное, необходимо 100—150 *мг* [37]. Хотя туберкулин обладает антигенными свойствами, но иммунизированное к туберкулину животное не обнаруживает большой устойчивости к туберкулезной инфекции по сравнению с нормальным животным. Сам туберкулин не оказывает сенсибилизирующего действия, и животное может быть сенсибилизировано к его токсическому действию только предварительной инъекцией живых или мертвых интактных бацилл, а также естественным заражением.

Раньше из соображений удобства туберкулин получали в основном из культур, убитых нагреванием [38], но продукт, полученный таким образом, менее активен, чем полученный из живых культур [39]. Электрофоретический анализ препаратов туберкулина показывает, что они состоят из смеси белков, дезоксирибонуклеиновой кислоты и антигенного полисахарида, причем фактор кожной чувствительности связан с белковым компонентом [40, 41]. Этот компонент содержит три главные группы—A, B и C, которые различаются электрофоретической подвижностью, константой осаждения и растворимостью в холодном водном растворе этилового спирта [42]. Белки группы A наиболее активны; их подвижность меньше, чем у других белков; средний молекулярный вес порядка 32 000—44 000. Содержание триптофана и тирозина выше, чем у белков других групп [43, 44].

Белки могут также увеличивать вирулентность патогенных бактерий, даже не будучи токсичными для нормальных или сенсибилизированных животных. Например, гемолитические стрептококки группы А содержат не менее двух типоспецифичных антигенных белков (М - и Т-белки) и один видоспецифичный Р-белок, который перекрестно реагирует с пневмококками. Предполагают, что вирулентность обусловлена наличием белка М [20b]. Вирулентность *Bacillus anthracis* связана с капсулой, содержащей специфический белок, состоящий исключительно из остатков *d*-глутаминовой кислоты с молекулярным весом более 50 000 [45].

2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТОКСИЧНЫХ БЕЛКОВ

А. Яды животных

Способность продуцировать ядовитые выделения присуща целому ряду животных—от однопроходных млекопитающих до простейших [46]. Эти яды либо активно выделяются из зубов, жал или шпор и используются для защиты или нападения, либо они секернируются в кожу, где играют пассивнозащитную роль. Яды кожных желез жаб, лягушек, саламандр и аксолотлей являются низкомолекулярными веществами; «активные» же яды обычно содержат большой процент белков, а во многих случаях само ядовитое начало их имеет белковую природу. Состав некоторых животных ядов не выяснен, и, кроме того факта, что иногда возможна иммунизация, нет оснований утверждать, что эти яды являются белками.

1. Самец австралийского утконоса (*Ornithorhynchus anatinus*)—единственное млекопитающее, о котором известно, что оно выделяет яд. На внутренней стороне задних конечностей животного, около пятки, имеются короткие шпоры, пронизанные каналами, из которых выдавливается яд. Этот яд—слабый коагулянт, он гемолитичен и цитолитичен, а также способен вызывать падение кровяного давления вследствие периферической вазодилатации. Попытки иммунизации не предпринимались [47].

2. Мексиканский ядозуб (*Heloderma horridum*, *Heloderma suspectum*) является единственной ядовитой ящерицей (вопреки распространенному мнению). Он имеет бороздчатые зубы, по которым стекает антигенный паралитический яд [48].

3. Рыбы из отряда угреобразных (например, *Murana helena*) вводят яд при укусе, а рыбы из отряда брюхогорлых (например, *Trachinus draco*) снабжены ядоинъецирующими спинными плавниками. Кролики могут быть иммунизированы к яду этой рыбы [49]. Имеются также рыбы с ядовитыми кожными выделениями и рыбы, вызывающие токсикоз, если их едят сырыми; в последнем случае яд или распространен по всему телу, или находится в отдельных органах [46].

4. Тела и щупальца некоторых кишечнополостных, например медузы («португальский кораблик»—*Physalia*), морского анемона (*Actinia*), а также осьминога покрыты ядовитыми шипами. LD яда из щупалец осьминога (так называемой «конджестины») равна 450 *мг/кг* (для собаки). Этот яд дает белковые реакции, вызывает анафилаксию [50]. Яд медуз («гипнотоксин») вызывает смерть вследствие паралича дыхательной мускулатуры; он инактивируется при 55° [51]. Яд морского анемона дает белковые реакции, содержит 2—4,6% серы и имеет молекулярный вес около 2000 [52].

5. Кролики могут быть иммунизированы к ядовитым выделениям иглокожих [53], о которых известно, что они содержат фосфатидазу А (см. стр. 657) [54].

6. В кожных железах жаб, лягушек, саламандр и аксолотлей, кроме низкомолекулярных стероидных ядов, имеется и ядовитое вещество, по отношению к которому могут быть иммунизированы морские свинки и кролики [55].

7. У скорпионов (родов *Centruroides*, *Tityus*, *Butus*, *Priomirus* и *Euscorpio*) последний постабдоминальный сегмент заканчивается ядовитым жалом, которое связано протоком с ядовитой железой, находящейся в этом сегменте. Этот яд подобен яду аспидовых змей (см. стр. 648), но он еще очень мало исследован. Получены лишь частично очищенные токсичные препараты [56, 57]; яд скорпионов содержит гемолитическую фосфатидазу А (см. стр. 657).

8. Ядовитый аппарат пауков состоит из пары щупальцеобразных коготков на голове. Яд пауков рода *Lycosa* сходен с ядом гремучниковых змей, тогда как яд пауков рода *Lactrodectus* больше похож на яд аспидовых змей (см. стр. 648). Яд пауков содержит гемолитическую фосфатидазу А (см. стр. 657).

1) ЗМЕИНЫЕ ЯДЫ

Всего в животном мире насчитывается около 2500 видов змей; 600 из них имеют ядовитые железы, но только 150 опасны для человека. В настоящее время ядовитых змей разделяют на шесть семейств: широкоголовых (Amblycephalidae), ужевых (Colubridae), морских змей (Hydrophidae), аспидовых (Elaphidae), гремучниковых (Crotalidae) и гадюковых (Viperidae). По старой классификации морские змеи и аспидовые рассматривались как подсемейства переднебороздчатых ужеобразных, а гремучниковые (ямкоголовые гадюки) и гадюковые (настоящие гадюки) как подсемейства гадюк. Семейство ужевых в принятой в настоящее время классификации соответствует систематической группе переднебороздчатых ужей старой классификации.

Яды гладкозубых широкоголовых змей, заднебороздчатых ужевых и переднебороздчатых морских змей не менее токсичны и не менее интересны, чем яды змей трех других семейств, но

поскольку первые не имеют ядоинъецирующего аппарата, у вторых он недостаточно совершенен, а третьи редко встречаются, то они не представляют практического интереса для человека. По этой причине яды змей трех перечисленных семейств не исследовались детально, и в этой главе рассматриваются только яды аспидовых, гремучниковых и гадюковых змей. Ниже перечислены общепринятые названия наиболее хорошо известных ядовитых змей [58].

Аспидовые. Азия: кобра (*Naja naja*), крайт (*Bungarus candidus*). Африка: настоящий аспид, или гая (*Naja haje*), черношеяя кобра (*Sepedon haemachates*), капская кобра (*Naja flava*), мамба (*Dendraspis augusticeps*). Северная Америка: коралловый, или арлекиновый, аспид (*Micrurus fulvius*). Австралия: шипохвостая ехидна, или змея смерти (*Acanthophis antarcticus*), тигровая змея (*Notechis scutatus*), медноголовая (*Denisonia superba*), коричневая змея (*Demansia textilis*), черная ехидна (*Pseudechis porphyriacus*).

Гремучниковые. Азия: хабу (*Trimeresurus mucrosquamatus*). Северная Америка: мокассиновая змея (*Agkistrodon mokasen*), водяной щитомордик (*Agkistrodon piscivorus*), гремучие змеи рода *Crotalus* (например, ромбическая гремучая змея *Cr. adamanteus*). Южная Америка: гремучая змея, или каскавелла (*Crotalus terrificus*), ярарака (*Bothrops atrox*), бушмейстер (*Lachesis mutus*).

Гадюковые. Европа: обыкновенная гадюка (*Vipera berus*), рогатая гадюка (*Vipera ammodytes*). Азия: гадюка Русселя (*Vipera russellii*), эфа (*Echis carinatus*). Африка: южноафриканская гадюка (*Bitis arietans*), гадюка Габона (*Bitis gabonica*), песчаная эфа (*Echis cornuta*).

Змеиный яд выделяется из желез, которые гомологичны слюнным железам млекопитающих и расположены на поверхности позади глазных впадин. Ядовитая железа окружена плотной капсулой из соединительной ткани, в которую входит передняя височная мышца. При сокращении этой мышцы яд выдавливается в проток, который идет вперед и открывается посредством сосочка, приближенного к верхней части зубной бороздки или зубного канала. У видов рода *Doliophus* железа и проток занимают по длине почти одну треть тела. Гремучниковые и гадюковые имеют канальчатые ядовитые зубы, расположенные в передней части верхней челюсти; при спокойном состоянии животного они загнуты назад, но при нападении выставляются вперед. Аспидовые имеют в верхней челюсти более короткие глубокоборозчатые ядовитые зубы, которые при спокойном состоянии змеи не обращены назад. Ядовитые вещества найдены также в сыворотке змей, в различных органах и особенно в яйцах [59].

Вес яда, выделяемого железой при укусе, изменяется в зависимости от вида змеи, сезона, времени, прошедшего с момента последнего укуса, и других факторов. Вес колеблется в пределах от 30 *мг* до 1 *г*. Приблизительно $^2/_3$ выделенного яда составляет вода,

а сухой остаток содержит белки и их производные, небольшое количество эфирорастворимых веществ, хлориды и фосфаты. Многие яды содержат цинк в концентрации от 0,04% (*Vipera russellii*) до 0,554% (*Naja naja*) [60]. Летальная доза сухого яда на 1 *кг* веса (для кролика) колеблется от 10 *мг* (*Lachesis atrox*) до 3 *мг* (*Elaps frontalis*) и выше [54].

Токсичность ядов змей обусловлена их белковым (или белковоподобным) компонентом. Хотя Фауст [61] утверждал, что ему удалось выделить не содержащий азота «офиотоксин» ($C_{17}H_{26}O_{10}$) из яда кобры и «кроталотоксин» ($C_{34}H_{54}O_{21}$) из яда гремучей змеи, а позднее Клобузицкий [62] сообщил о получении не содержащего азота «ботропотоксина» из яда *Bothrops jararaca*, но эти данные не были подтверждены [63, 64].

Яды, введенные животным, оказывают как местное, так и общее действие. Локальный эффект заключается в геморрагии (разрыв кровеносных сосудов), цитолизе (растворение тканей), некрозе и отеке, которые приводят к шоку и нарушению кровообращения. Причиной общего действия являются нейротоксины, поражающие периферическую и центральную нервную систему. Смерть может наступить вследствие паралича дыхательной мускулатуры. Кроме того, яды действуют на компоненты крови, вызывая гемолиз (растворение эритроцитов), лейкоцитолиз, иногда свертывание кровяной плазмы, а иногда задержку этого процесса.

Семейства змей в какой-то степени характеризуются различным патологическим действием их ядов. Так, яды аспидовых змей оказывают сильное общее действие и незначительное локальное. Они главным образом нейротоксичны и гемолитичны и лишь слегка геморрагичны и цитолитичны. Яды некоторых австралийских аспидовых змей (*Notechis scutatus*, *Demansia textilis*) оказывают сильное коагулирующее действие. Яды гремучниковых змей оказывают главным образом местное действие и лишь ограниченно влияют на общее состояние организма. Они вызывают гемолиз, свертывание, сильную геморрагию и цитолиз, но нейротоксическое действие их незначительно. Южноамериканская гремучая змея (*Crotalus terrificus*) является исключением: ее яд оказывает слабое свертывающее и цитолитическое действие, но он сильно нейротоксичен. Яды гадюк сходны по своему действию с ядами гремучниковых змей. Все эти разнообразные эффекты зависят прямо или косвенно от белковых компонентов яда, описываемых в разделе 3. Часто случается, что один и тот же компонент является причиной нескольких патологических эффектов.

Ядовитые змеи иммунны к своему собственному яду и яду змей близких видов. Но, по-видимому, этот иммунитет отличается от невосприимчивости, активно создаваемой у млекопитающих. Предполагают, что он зависит главным образом от ферментов, разрушающих яды неизвестным пока способом [65].

2) ПЧЕЛИНЫЙ ЯД

Яд пчел (*Apis mellifera*) оказывает нейротоксическое, геморрагическое, цитолитическое, гемолитическое и коагулирующее действия, а также вызывает сильное воспаление глаз (см. раздел 3, Г). Насекомые имеют две ядовитые железы: одна, бо́льшая, вырабатывает кислый секрет, а другая, меньшая—щелочной. Протоки этих желез впадают в приемную камеру, которая оканчивается жалом и служит резервуаром для смешанных ядовитых выделений. При диализе или при обработке аммиаком яд можно разделить на низкомолекулярный кислый компонент, содержащий фосфор, и белок основного характера. При соединении оба компонента образуют солеподобный комплекс, распадающийся в воде и более стабильный в слегка подкисленных растворах. Оба компонента содержат 1% серы и оба токсичны, причем кислый компонент вызывает конвульсии, а белковый оказывает нейротоксическое действие [66].

Нескольким исследователям удалось выделить из яда диализирующиеся токсичные компоненты со сравнительно низким молекулярным весом [67]. Согласно Фасбендеру, в состав яда входит токсичный полипептид с молекулярным весом около 1000, содержащий группы —SH или —S—S— [68]; по Райнерту [67] диализирующийся токсичный компонент является «протеозой».

Пчелиный яд содержит гемолитическую фосфатидазу А [69]. Этот фермент является нейротоксином яда *Crotalus terrificus* (см. стр. 667), и, очевидно, он придает нейротоксические свойства пчелиному яду. Этот яд известен также как богатейший источник ингибитора дегидразы; считают, что именно этот его компонент вызывает воспаление глаз (см. раздел 3, Г).

Некоторые индивидуумы реагируют немедленно и крайне бурно на укус пчел и могут даже умереть, вероятно от анафилактического шока. Утверждают, что у людей, часто кусаемых пчелами, развивается местное сопротивление яду, однако нет оснований полагать, что оно является следствием появления защитных антител. Энтон [70] сообщает, что сыворотка пчеловода, которого часто кусали пчелы, не обладала бо́льшим нейтрализующим действием по сравнению с сывороткой других людей и не вызывала сопротивления у кроликов и мышей, получавших повторные дозы яда.

Пчелиный яд содержит гистамин и, кроме того, будучи введен в организм, освобождает гистамин из тканей, что, возможно, является результатом действия его А-фосфатидазного компонента [71].

Б. Фитотоксины

Название «фитотоксин» обычно относят к растительным ядам, имеющим белковую природу. Список их ограничивается абрином

из *Abrus precatorius*, кротином из *Croton tiglium*, курцином из *Jatropha curcas*, рицином из *Ricinus communis* и робином из *Robinia pseudaccacia*. Аманитин и фаллоидин—ядовитые продукты *Amanita phalloides*—являются неантигенными полипептидами. Молекула фаллоидина состоит из шести аминокислотных остатков четырех различных типов, соединенных в кольцо [72]. Если почва, на которой выращивают зерновые злаки, богата селеном, они содержат белки, ядовитые за счет имеющегося в них селена [73].

Абрин, кротин, курцин и рицин находятся в семенах соответствующих растений; робин содержится в коре. Из всех этих токсинов рицин является наиболее изученным, о других же известно очень мало.

1) РИЦИН

В 1891 г. Эрлих получил препарат рицина, LD которого равнялась 1 *мг/кг* (для морской свинки) [74]. В том же году после открытия Берингом дифтерийного антитоксина Эрлих приготовил антирициновую сыворотку. В то время рицин относили к алкалоидам и считали, что подобные вещества могут быть антигенами. Классической работой по рицину является исследование Осборна, Менделя и Харриса [75], которые получили препарат, LD которого равнялась 0,5 *мг/кг* (для кролика). Препарат Филда [4] имел LD, равную 0,1 *мг/кг* (для кролика). Недавно был получен продукт, электрофоретически, ультрацентрифугически и иммунологически однородный. Этот препарат можно разделить на токсичную и нетоксичную (быть может, токсоидную?) формы путем кристаллизации; кристаллический токсин является глобулином, LD которого равна 78 *мг/кг* (для мыши). Его физические свойства указаны в табл. 67 [3]. Измерения растворимости другого препарата, полученного из четырежды перекристаллизованного рицина, который обладал такой же токсичностью, показали, что очищенный продукт является твердым раствором нескольких белковых компонентов [76].

Рицин устойчив к перевариванию протеолитическими ферментами, хотя в этом отношении данные несколько расходятся. Осборн, Мендель и Харрис сообщают, что после 5-месячного переваривания трипсином препарата рицина он полностью потерял свою токсичность [75]. При переваривании кристаллического рицина пепсином или трипсином в течение 1—2 недель до низкомолекулярных продуктов распадалось только 40—50% [3]. Другие же исследователи наблюдали почти полное расщепление высокоочищенных препаратов рицина (LD для кролика < 1 *мг/кг*) при 48-часовом переваривании папаином, пепсином и трипсином [77]. Эта устойчивость рицина к действию протеолитических ферментов, возможно, является причиной того, что только рицин, подобно токсину бациллы ботулизма, остается токсичным при введении *per os*. Летальная доза

рицина почти одинакова как для внутривенного, так и для внутримышечного или подкожного введения, но его доза *per os* в 100—500 раз превышает парэнтеральную дозу [22].

Все препараты рицина, в том числе и наиболее очищенные, сильно агглютинируют взвеси эритроцитов, лейкоцитов, клеток различных тканей, холестерина и кармина, но *in vivo*, когда кроликов убивают большими дозами рицина, гемоагглютинация незначительна [78]. Добавление электролитов способствует агглютинации эритроцитов, а увеличение кислотности среды уменьшает ее. Неясно, идентичен ли гемоагглютинин токсическому фактору, особенно если учесть, что ряд кристаллических препаратов рицина, возможно, содержит несколько белков [76] и что кристаллический препарат токсина бациллы ботулизма, считавшийся ранее гемоагглютинином, оказался смесью токсина и гемоагглютинина [79, 80]. Различные обработки могут неодинаково влиять на токсичность и гемоагглютинирующую активность рицина. Так, при действии протеолитических ферментов гемоагглютинирующая активность исчезает быстрее токсичности [81]; инкубирование рицина с сывороткой увеличивает его токсичность и уменьшает гемоагглютинирующую активность [78]; иод обратимо инактивирует его токсические свойства, но не уменьшает его гемоагглютинирующую активность [82]; токсическое действие рицина на лягушку сказывается больше при 37°, чем при 4°, а гемоагглютинирующая активность при 4° выражена сильнее, чем при 25° [83]. Эти наблюдения наводят на мысль, что гемоагглютинирующие свойства препаратов рицина обусловлены не теми его качествами, от которых зависят его токсические свойства. Не исключена возможность, что гемоагглютинация обусловлена физическими свойствами молекулы токсина. Токсин, возможно, адсорбируется клеточными суспензиями и делает их «липкими», причем эта адсорбция может зависеть от факторов, не всегда изменяющих их токсичность. Многие растительные белки вызывают гемоагглютинацию, но не оказывают токсического действия.

Механизм токсического действия рицина не известен. Смерти обычно предшествует латентный период, что характерно и для многих бактериальных токсинов. У животных, убитых рицином, очень часто обнаруживается воспаление желудка, сопровождаемое отеком и кровоизлиянием. Гистологические исследования показывают значительное разрушение клеток. При действии раствора рицина на глаза возникает сильное воспаление, приводящее иногда к слепоте. По данным Иноуэ [84], препараты рицина свертывают молоко, а Ле-Бретон и Моул [85] пришли к выводу, что он является мощным протеолитическим ферментом. Это свойство рицина ранее не отмечалось. Подробный материал о влиянии температуры и pH на скорость денатурации рицина собран в работе Леви и Бенальи [85а]. Абрин и кротин по своим свойствам подобны рицину.

В. Бактериальные токсины [86]

Бактериальные токсины находятся в клетках микроорганизмов или в фильтратах их культур. Обычно токсины грамположительных бактерий экстрацеллюлярны и активно сецернируются в процессе роста. Некоторые токсины (ε-и τ-токсины *Cl. welchii* типов B, D и E) выделяются в среду в виде неактивных протоксинов, которые превращаются в активную форму протеолитическими ферментами [87, 88]. Концентрация токсинов в фильтратах культур порядка 1—100 *мг/л*. Токсины грамотрицательных бактерий интрацеллюлярны, но они могут появляться в культуральной жидкости при автолизе микроорганизмов. Токсины грамположительных бактерий и некоторые токсины грамотрицательных бактерий представляют собой простые белки. Токсины грамотрицательных бактерий кишечной группы являются структурными компонентами их клеток, составляя около 5% веса. Они идентичны с доминантными О-антигенами бактерий и состоят из полимолекулярных комплексов фосфолипида, полисахарида и белка.

При некоторых инфекционных болезнях (например, столбняке, дифтерии) бактериальные токсины являются единственной причиной патологических явлений. Ботулизмом заболевают животные, поедающие пищу, в которой рос и вырабатывал токсин *Cl. botulinum*; эту болезнь нельзя назвать инфекционной, поскольку бацилла ботулизма неинвазионна и очень редко заражает животных. При других инфекционных болезнях (газовой гангрене, вызываемой анаэробами рода Clostridium, стафилококковой и стрептококковой инфекциях, при заражениях некоторыми грамотрицательными бактериями) токсины играют важную, но не исключительную роль. Есть и такие инфекционные болезни (например, сибирская язва, пневмококковые инфекции), при которых бактериальные токсины, по-видимому, не имеют значения.

Ниже перечислены токсины, вырабатываемые основными патогенными грамположительными бактериями. Болезни, вызываемые этими микробами, указаны в квадратных скобках.

Corynebacterium diphtheriae—летален, гистотоксический токсин [дифтерия у людей].

Staphylococcus aureus (*Micrococcus pyogenes*, разновидность *aureus*): 1) α-токсин—летален, гистотоксичен, гемолитичен; 2) β-токсин—летален, гемолитичен; 3) γ-токсин—летален, гемолитичен; 4) ε-токсин—гемолитичен; 5) гиалуронидаза—фактор распространения; 6) стафилокоагулаза—свертывающий фактор; 7) стафилокиназа—фибринолитична [гнойные инфекции у человека и животных].

Streptococcus pyogenes: 1) токсин Дика—летален, эритрогенен; 2) стрептолизин О—летален, кардиотоксичен, гемолитичен; 3) стрептолизин S—летален, гемолитичен; 4) гиалуронидаза—фактор рас-

пространения; 5) стрептокиназа—фибринолитична; 6) стрептодорназа—дезоксирибонуклеаза [скарлатина, тонзиллит, гнойные инфекции и т. п. у людей].

Clostridium botulinum: 1—6) шесть типоспецифичных нейротоксинов; 7) гемоагглютинин [ботулизм у людей и животных].

Clostridium oedematiens: 1) α-токсин—летален, гистотоксичен; 2) β-токсин (фосфатидаза С)—летален, гемолитичен; 3) γ-токсин (фосфатидаза С)—летален, гемолитичен; 4) δ-токсин—гемолитичен; 5) ε-токсин (липаза)—летален, гемолитичен; 6) ξ-токсин—гемолитичен [газовая гангрена у людей; «черная болезнь» (некротический гепатит) и братзот у овец; бациллярный остеомиелит у буйволов].

Clostridium septicum: 1) α-токсин—летален, гемолитичен; 2) β-токсин—дезоксирибонуклеаза [газовая гангрена у людей; «черная нога» и братзот у овец].

Clostridium tetani: 1) тетаноспазмин—нейротоксичен; 2) тетанолизин—кардиотоксичен, гемолитичен [столбняк у людей и животных].

Clostridium welchii: 1) α-токсин (фосфатидаза С)—летален, гистотоксичен, гемолитичен; 2) β-токсин—летален; 3) γ-токсин—летален; 4) δ-токсин—летален; 5) ε-токсин—летален, гистотоксичен; 6) η-токсин—летален (?); 7) ι-токсин—летален, гистотоксичен; 8) θ-токсин—летален, кардиотоксичен, гемолитичен; 9) κ-токсин (коллагеназа)—летален, протеолитичен; 10) λ-токсин—протеолитичен; 11) μ-токсин (гиалуронидаза) —фактор распространения; 12) дезоксирибонуклеаза [газовая гангрена и некротический энтерит у людей; дизентерия ягнят, «удар» и инфекционная энтеротоксемия у овец].

Хотя мы и можем определить летальные и другие биологические эффекты вышеперечисленных токсинов, но лишь небольшая часть их изучена детально. Их идентификация основывается в большинстве случаев скорее на иммунологических, чем на химических данных. Выражение «гистотоксичны», которое употребляется в этом перечне, обозначает, что при внутрикожном введении токсина он создает в ткани участок клеточного повреждения или некроза. Токсичность некоторых из упомянутых веществ (например, дезоксирибонуклеаз) либо невыяснена, либо сравнительно невелика, но тем не менее они включены в список, поскольку они, вероятно, способствуют распространению бактерий и их ядовитых продуктов.

Свойства наиболее известных токсинов обсуждаются в разделе 3. Стрептококковый скарлатинозный токсин и стафилококковый кишечный токсин в этом обзоре не рассматриваются. Первый не летален, хотя даже 5 *пг* его вызывают эритрогенную реакцию кожи [88а]. Стафилококковый энтеротоксин важен, так как он часто является причиной пищевых отравлений, но о нем очень мало известно.

3. СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИЧНЫХ БЕЛКОВ

А. Дифтерийный токсин

Токсин *Corynebacterium diphtheriae* был открыт первым (Ру и Иерсеном в 1888 г.) и изучен лучше других. Он является основной причиной патологических явлений при дифтерии—болезни, которая когда-то уносила множество жизней, но теперь практически уничтожена в странах, где применяется активная иммунизация. В Англии, например, в 1950 г. было менее 100 смертельных случаев от дифтерии. Физические свойства очищенного токсина [89, 90] указаны в табл. 67.

Недавно было высказано мнение, что препарат токсина, полученный Паппенгеймером [90] и содержавший 2170 *Lf/мг*, не был чистым [90a, b,c]. Это утверждение основывалось главным образом на следующих фактах: а) в препаратах с указанной активностью было обнаружено несколько преципитационных зон антиген—антитело (по методу Орудина [90d]); б) были получены препараты, активность которых заметно превышала 2170 *Lf/мг*. Однако Боуэну [90в] удалось показать, что, хотя число посторонних антигенов может быть велико, общее количество чужеродных белков, представленное этими антигенами, не обязательно значительно. Когда говорят об однородности или «чистоте», основываясь на обычных критериях, обычно подразумевается присутствие чужеродного белка в количестве 1—2% и более, и это не должно вызывать удивления. Тот факт, что эти чужеродные белки случайно оказались антигенами, не сказывается на степени загрязнения. Более того, сравнение препаратов токсина по флоккуляционной способности (*Lf*) возможно только тогда, когда в образце использовался один и тот же препарат антитоксина. Сравнение с образцами из других лабораторий с иными препаратами антитоксина может быть только приблизительным, поскольку последние сравниваются с международным стандартом, а следовательно, и друг с другом только по опытам с предохранением мышей, а не по тестам *Lf*. Образцы антитоксина, оказывающие одинаковое защитное действие, не обязательно обладают одинаковой флоккуляционной способностью. Кроме того, флоккуляционная способность одного и того же препарата антитоксина может изменяться со временем, и поэтому препарат токсина, апробируемый с его помощью, по истечении нескольких лет может показывать кажущееся увеличение *Lf*.

В настоящее время дифтерийный токсин представляет интерес в основном в связи с теорией Паппенгеймера о механизме образования его микроорганизмами [91—93]. Когда микроб выделяет токсин в культуральную среду, он выделяет и копропорфирин III (группы $-CH_2CH_2COOH$ в положениях 2 и 4 [94, 95]), и продуцирование

обоих этих веществ тормозится в присутствии железа. (Железо влияет на образование не только токсинов, но и других белков [96].) Концентрация железа порядка 100 *мг/л* необходима для нормального роста дифтерийной палочки, но каждые 4 атома железа сверх этого уровня уменьшают образование порфирина на 4 молекулы и токсина—на 1 молекулу. При концентрации железа 100 *мг/л* продуцирование токсина достигает максимума и микроорганизмы практически не могут окислять янтарную кислоту; при этом цвет экстрактов бактерий становится бледным. При концентрации железа 500 *мг/л* токсин и порфирин практически совсем не выделяются из клеток, микроорганизмы интенсивно окисляют янтарную кислоту и экстракты бактерий окрашиваются в глубокий красновато-коричневый цвет, обусловленный присутствием цитохрома b. Последний имеет четыре простетические группы железопротопорфирина IX (группы—$CH{=}CH_2$ в положениях 2 и 4 [97]) на молекулу белка и участвует в окислении янтарной кислоты. Когда концентрация железа такова, что количество продуцируемого токсина падает до половины его максимального количества, то скорость окисления янтарной кислоты возрастает до половины наивысшего значения. Паппенгеймер предположил, что токсин родственен белковому компоненту цитохрома b дифтерийной палочки. В отсутствие железа микроорганизмы продолжают синтезировать порфирин и белковые компоненты цитохрома b, но экскретируют их как отбросы, ибо без железа они не могут построить конъюгированный белок. Обмен порфирина также должен подвергаться изменениям, поскольку внутриклеточный железопорфирин имеет винильные боковые группы в положениях 2 и 4, а внеклеточный свободный порфирин—боковые группы пропионовой кислоты [98]. Если эта гипотеза верна, то дифтерийный токсин, вероятно, подобен (но не идентичен) белковому компоненту цитохрома b у млекопитающих, и поэтому он, возможно, оказывает токсическое действие вследствие конкурентного ингибирования синтеза этого дыхательного пигмента в тканях хозяина. Недавно Паппенгеймер и Вильямс [99] подтвердили эту гипотезу при исследовании действия токсина на шелкопрядов *Samia Cecropia*. Гусеницы этого шелкопряда содержат много сочетающейся с цитохромом сукциноксидазы, и дифтерийный токсин убивает их, хотя и довольно медленно. Через 6 недель после выхода из яйца у гусениц начинается стадия куколочной диапаузы. Куколка устойчива к действию токсина, так как содержание сукциноксидазы в ее теле, за исключением межсегментных мышц брюшка, сохраняющих высокую концентрацию этого фермента, чрезвычайно незначительно. При обработке куколки токсином межсегментные мышцы брюшка дегенерируют, но сердечная мышца, которая не содержит цитохрома, продолжает функционировать. По окончании куколочной диапаузы начало и дальнейшее развитие имагинальной формы сопровождаются прогрессирующим синтезом во всей цитохромной

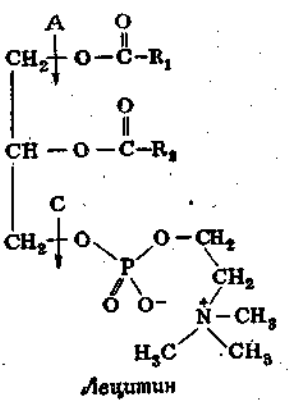
системе. На этой стадии, когда развитие, очевидно, непосредственно зависит от синтеза цитохрома, токсин действует быстро, приводя спустя несколько часов к прекращению развития и вызывая состояние искусственной диапаузы, за которым в конечном счете следует смерть. На ткани, в которых синтез цитохрома требуется только для поддержания уже достигнутого уровня, токсин действует медленнее.

Б. Гемолизины

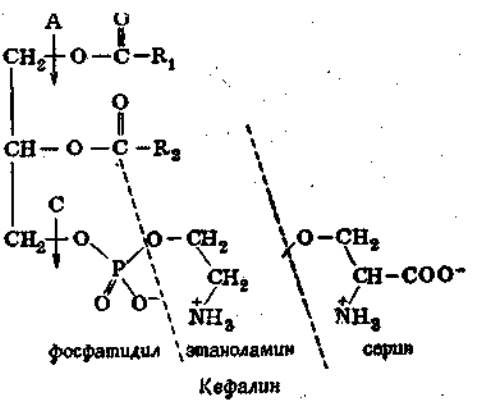
Белки, обладающие гемолитическим действием, вызывают лизис эритроцитов и, как правило, лейкоцитов крови. Большинство из них токсично, но причиной этой токсичности является, вероятно, не их гемолизирующее действие, а влияние на другие элементы тканей тела. Главные биохимические процессы, лежащие в основе различных действий какого-нибудь одного гемолизина, по всей вероятности, одинаковы. Во многих случаях гемолизины не столько вызывают непосредственное растворение эритроцитов, сколько изменяют клетку таким образом, что становится возможным самопроизвольный лизис. Когда эритроциты находятся в таком «хрупком» состоянии, они часто разбухают и становятся более прозрачными, чем нормальные клетки.

1) СТОЙКИЕ К КИСЛОРОДУ ГЕМОЛИЗИНЫ

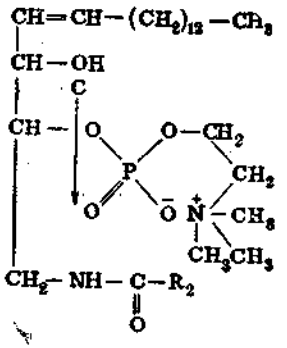
а) Фосфатидазы. Два гемолизина являются ферментами—фосфатидазы А и С. Эти ферменты катализируют гидролиз эфирных связей с жирной или фосфорной кислотой в молекулах лецитина, кефалина и сфингомиелина; в приведенных ниже формулах стрелками указаны места расщепления.



Лецитин



Кефалин



Сфингомиелин

R_1—ненасыщенная жирная кислота, R_2—насыщенная жирная кислота.

Эти ферменты было предложено назвать лецитиназами А и С, но поскольку они гидролизуют не только лецитин, но и другие фосфолипиды (фосфатиды), то вместо этого решили называть их фосфолипазами А и С [69]. Однако и это название неудачно, так как оно обозначает, что оба фермента являются липазами, тогда как фермент С является фосфатазой. Поэтому лучше сохранить старое название—фосфатидазы.

1) Фосфатидаза А. Уже давно известно, что гемолизины змеиного яда активируются лецитином, но Делезен и Ледебт [100] первые показали, что эти яды содержат фосфатидазу А и что продукты гидролиза—лизолецитин и лизокефалин—обладают мощным гемолитическим действием. В присутствии лецитина или кефалина фосфатидаза А растворяет эритроциты животных всех видов; в отсутствие этих фосфолипидов некоторый лизис эритроцитов, которому предшествует их разбухание, все же имеет место, но лишь в небольшой степени. Это действие, вероятно, вызвано изменением состояния лецитина в оболочке эритроцита, а не образованием лизолецитина в гемолитических концентрациях. Площадь, приходящаяся на углеводородную цепь, в пленке лизолецитина приблизительно в 2 раза больше соответствующей площади в пленке лецитина; поэтому получаются растянутые, хрупкие и более проницаемые пленки [101].

Слотта и Фрэнкель-Конрат [5] выделили кристаллическую фосфатидазу А (кротоксин) из яда бразильской гремучей змеи (*Crotalus terrificus terrificus*). В табл. 67 указаны физические свойства этого белка, который оказался однородным при электрофоретических [7] и ультрацентрифугальных [9] исследованиях. От кротоксина зависит все гемолитическое и нейротоксическое действие неочищенного яда, и причиной этого, вероятно, является его А-фосфатидазная активность. Кротоксин необратимо инактивирует-

ся при обработке цистеином, который расщепляет молекулу на более мелкие части, не обладающие ферментативным действием [9].

Фермент содержит около 4% серы, частично в форме дисульфидных связей, которые разрываются при восстановлении цистеином. В молекуле фермента имеется 41 атом серы, из них 36 атомов принадлежат цистину, 3—метионину и 2—находятся в каком-то другом, еще не известном соединении [102]. Ферментативная активность может исчезать также при обработке многими другими агентами [103]. Кротоксин составляет около 60% белковой части яда; половина же остальной части белка состоит из протеолитической и коагулирующей фракций (см. стр. 673).

Токсикологи индийской школы опубликовали наблюдения, которые кажутся противоречащими наблюдениям токсикологов бразильской школы. Осаждая яд *Crotalus t. terrificus* насыщенным раствором NaCl, Гош и Де [104] получили фракцию, в которой отношение гемолитической активности к нейротоксической было в 4 раза больше, чем в неочищенном яде. Поэтому они предположили, что кротоксин является смесью разделяемых компонентов: гемолитического и нейротоксического. Другое кажущееся противоречие заключалось в том, что кристаллический препарат гемолитической «лецитиназы», который Де отделил от нейротоксических компонентов яда кобры, оказался относительно нетоксичным (см. стр. 664). Этот препарат не только не инактивировался восстанавливающими агентами, подобно фосфатидазе яда гремучей змеи, но обратимо инактивировался слабыми окислителями и реактивировался восстановителями.

Эти, на первый взгляд столь противоречивые, данные можно объяснить следующим образом. Известно, что некоторые яды содержат не менее двух гемолизинов [105]. Один из них—это фосфатидаза А, оказывающая непрямое гемолизирующее действие и разрушающая эритроциты животных всех видов только в присутствии лецитина; другой же гемолизин действует непосредственно на эритроциты без участия лецитина, но он гемолизирует эритроциты животных только некоторых видов, а именно кошек, кроликов и морских свинок, а также человека. Исследователи бразильской школы использовали в своих гемолизиновых пробах систему гемолизин—лецитин—эритроциты лошади и поэтому определяли только фосфатидазу А, так как эритроциты лошади не чувствительны к непосредственно действующему гемолизину. Исследователи индийской школы не указывают, эритроциты какого животного они использовали в опытах с ядом *C. t. terrificus*, но можно предположить, что это были эритроциты морской свинки, поскольку они всегда их использовали (с добавлением лецитина или без него) в своих работах с ядами аспидовых змей. Эритроциты морской свинки чувствительны к непосредственно действующему гемолизину, и поэтому остается в силе предположение, что, кроме фосфатидазы А, яд *C. t. terrificus* содержит и непосредственно действующий

гемолизин и что гемолитическую активность фракции, выделенной индийскими токсикологами, следует отнести главным образом за счет этого гемолизина. Подобным же образом исследовавшийся ими кристаллический гемолизин из яда кобры, возможно, является непосредственно действующим гемолизином. Хотя его и назвали «лецитиназой», однако нет доказательств, что он действительно является таким ферментом. Его испытывали на эритроцитах морской свинки, в некоторых случаях и без добавления лецитина. Гемолитическая активность сырого яда усиливалась лецитином, однако нет данных о влиянии лецитина на активность очищенного гемолизина.

2) Фосфатидаза С. Основной токсин бактерии *Cl. welchii*—α-токсин является фосфатидазой С [106]. Этот фермент также продуцируется, хотя и в значительно меньших количествах, анаэробными клостридиями *Cl. oedematiens* (β- и γ-токсины) [27], *Cl. hemolyticum* (η-токсин) [27, 107], *Cl. bifermentans* [29], *Cl. chauvoei*, *Cl.sporogenes*, *Cl. centrosporogenes*, *Cl.tertium* [108] и аэробными спорообразующими бактериями *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* [30]. В других организмах, кроме бактерий, этот фермент не обнаружен.

Фермент *Cl. welchii* ($D_{20} = 7{,}41 \cdot 10^{-7}$ *см²/сек*; LD для мыши < 5 *μг/кг* [109]) расщепляет лецитин и очень медленно—сфингомиелин [110]. Фермент *B. cereus* расщепляет также кефалин [30]. Фермент *Cl. bifermentans* является единственной фосфатидазой С, которая активна в отсутствие ионов кальция [29].

Фосфатидаза С оказывает непосредственное гемолитическое действие, так как она не активируется ни лецитином, ни продуктами его гидролиза—глицеролстеаратолеатом и фосфорилхолином; она сама по себе является гемолизином. Очевидно, расщепление лецитина эритроцитов по эфирной связи с фосфорной кислотой (С) нарушает его способность поддерживать оболочку клетки в интактном состоянии в большей степени, чем разрыв эфирной связи с ненасыщенной жирной кислотой (А), катализируемый фосфатидазой змеиного яда. Когда разрывается С-связь, бóльшая часть молекулы отделяется от сильно поляризованного фосфорилхолинового радикала, от которого, возможно, зависело ее соединение с белком. Когда фермент инкубируется с эритроцитами при температуре 37°, фосфолипиды клеток разрушаются [28], но гемолиза не происходит при условии, что не применялись высокие концентрации гемолизина. Если же эритроциты затем охладить, гемолиз наступает немедленно, и на этой стадии он уже не зависит от гемолизина, так как происходит и в присутствии антитоксина [111]. Подобное же явление гемолиза при переходе от тепла к холоду наблюдалось и для стафилококкового β-гемолизина (см. стр. 661).

Для α-токсина *Clostridium welchii* характерно действие не только на эритроциты, но и на другие элементы тканей тела. При инкуба-

ции его с человеческой сывороткой [112] или раствором яичного желтка [113, 114] на поверхность всплывает слой жира: вероятно, токсин освобождает его из липопротеидов. Фосфатидаза змеиного яда такого действия не оказывает (Ван-Хайнинген, неопубликованные данные). При внутрикожном введении этот токсин, подобно многим другим, вызывает некроз. Было замечено также (и, возможно, это имеет важное отношение к его токсическому действию), что токсин разрушает активируемую магнием аденозинтрифосфатазу мышц, расщепляя ее фосфолипидную простетическую группу [115].

б) Стафилококковые гемолизины. Стафилококки продуцируют не менее четырех антигенных гемолизинов: α, β, γ и ε. О их природе известно очень мало. Описанный Ллевеллином Смитом и Прайсом [116] γ-гемолизин, вероятно, идентичен α_2-токсину Моргана и Грейдона [117] и δ-токсину Вильямса и Харпера [118]. α-, β- и γ-гемолизины можно различить по серологическим данным и по их действию на эритроциты животных различных видов. Что касается ε-гемолизина, то он продуцируется лишь коагулязотрицательными штаммами стафилококков, которые не выделяют α-, β- и γ-гемолизинов [119]. Других данных относительно ε-гемолизина не имеется.

1) α-Гемолизин. Действует на эритроциты овец и кроликов, но не действует на эритроциты людей и лошадей. Когда α-гемолизин действует на чувствительные к нему эритроциты, суспендированные в агар-агаре, зона гемолиза имеет расплывчатые края. Этот гемолизин изучен лучше других стафилококковых гемолизинов. Он обладает токсическим и кожнонекротическим действием, продуцируется почти всеми (около 96%) патогенными коагулязоположительными (см. стр. 671) штаммами стафилококков [119]. Летальная доза частично очищенного препарата токсина для мыши оказалась равной 20 *мг/кг* [120].

2) β-Гемолизин. Действует только на эритроциты овцы и не оказывает влияния на эритроциты кролика, лошади и человека. Этот гемолизин вызывает явление гемолиза при переходе от тепла к холоду. При действии на эритроциты овцы, суспендированные в агар-агаре, при температуре 37° β-гемолизин создает зону затемнения, которая при охлаждении эритроцитов превращается в резко ограниченную зону полного гемолиза. Эти «β-выдержанные» эритроциты могут подвергаться лизису при 37° при действии следующих агентов: глицерина [121], некоторых компонентов бульона [121], бактериальной липазы [122], бактериальной протеазы [122], теплостойкого продукта *Streptococcus agalactiae* [123], δ- (γ-?) гемолизина [120, 124]. Описываемый гемолизин не обладает кожнонекротическим действием, и он значительно менее токсичен для мышей (в пересчете на единицу гемолитической активности), чем α-токсин. По отношению к кроликам он токсичен [121].

3) γ-Гемолизин. Действует на эритроциты овцы, кролика, лошади и человека, создавая нечетко ограниченную зону гемолиза в чашках Петри с агар-агаром и кровью. Не ясно, идентичен ли этот токсин δ-токсину, описанному Марксом и Военом. По их данным, δ-токсин или часть его растворяется в абсолютном спирте, но не растворяется в ацетоне и эфире [124]. Спирторастворимая фракция, которая сохраняет 25% гемолитической активности, выдерживает нагревание при температуре 100° в течение 2 час., не теряя своего гемолизирующего действия, а неочищенные препараты теряют 75—87,5% своей активности после 30-минутного нагревания при 65°. В некоторых отношениях эта фракция напоминает жирную кислоту: она спирторастворима, термостабильна, нейтрализуется нормальной сывороткой и в отличие от других стафилококковых гемолизинов действует на эритроциты многих животных. Но, с другой стороны, она не растворяется в эфире и ацетоне. Маркс и Воган предполагают, что эта фракция может быть простетической группой конъюгированного белка [124]. γ-Гемолизин связан с несколько бо́льшим относительным количеством коагулязоположительных штаммов стафилококков, чем α-гемолизин [119]. Он является кожнонекротическим и летальным ядом для кроликов.

в) Гемолизин *Clostribium septicum*. Фильтраты культуры анаэробного возбудителя газовой гангрены *Cl. septicum* содержат антигенный гемолизин, который характеризуется очень быстрым токсическим действием. Лизису эритроцитов, вызываемому этим гемолизином, предшествует индукционный период, в течение которого наблюдается взаимодействие между токсином и эритроцитами. Последние разбухают и становятся полупрозрачными, и в этом состоянии они способны самопроизвольно разрушаться. Самопроизвольный лизис (но не реакции, происходящие в течение индукционного периода) тормозится сахарозой. Максимальная скорость гемолиза прямо пропорциональна концентрации токсина, энергия активации реакции равна 12 700 *кал/моль*. Эти кинетические данные свидетельствуют о ферментативном действии [125, 126]. В чистом виде этот гемолизин еще не получен.

г) Стрептолизин S. Некоторые штаммы гемолитических стрептококков, кроме нестойкого к кислороду стрептолизина О (см. стр. 663), продуцируют и кислородустойчивый гемолизин S. Его образование происходит в присутствии сыворотки [127, 128], или неочищенного лецитовителлина яичного желтка [129], или углевода ($5 \cdot 10^{-5}$ *М* мальтозы или 10^{-4} *М* глюкозамина) и активной фракции, полученной при расщеплении рибонуклеиновой кислоты рибонуклеазой [130]. Присутствие этих веществ не обязательно для образования стрептолизина О. Гемолизин также продуцируется при суспендировании отмытых взрослых стрептококков в растворе, содержащем активную фракцию, глюкозамин, ионы Na, K, Mg, PO_4 и восстанавливающий агент. Гемолизин, полученный в таких условиях, веро

ятно, содержит активную фракцию, гексозамин и небольшое количество белка или полипептида. Его активность не уменьшается фосфатазой, которая превращает 40% фосфора активной фракции в неорганическую форму, но она подавляется протеолитическими ферментами. Когда стрептококки мутантной расы, неспособные продуцировать гемолизин, были обработаны аналогичным образом, то получился неактивный продукт примерно такого же состава [131].

Стрептолизин S не является антигеном в обычном смысле этого слова, но в нормальной человеческой сыворотке имеется антистрептолизин S. Антитоксическую сыворотку нельзя получить при инъекциях гемолизина (или соответствующих микроорганизмов) подопытным животным, а сыворотка людей, страдающих от стрептококковых инфекций, содержит меньше антистрептолизина S, чем сыворотка здорового человека. Сывороточный антистрептолизин S, по-видимому, связан с неустойчивым липопротеидным компонентом альбуминовой фракции [132—134]. При добавке небольшого количества красного конго к стрептолизину S *in vitro* его токсическое действие подавляется, но этого не происходит при применении больших количеств красителя. Предварительное введение мышам красного конго не предохраняет их от действия токсина, так как краситель связывается сывороткой [134а].

2) НЕСТОЙКИЕ К КИСЛОРОДУ ГЕМОЛИЗИНЫ

а) Бактериальные гемолизины. Тетанолизин *Cl. tetani*, θ-токсин *Cl. welchii*, пневмолизин пневмококков и стрептолизин О гемолитических стрептококков имеют следующие общие свойства.

1) Они обратимо инактивируются слабыми окислителями и реактивируются восстановителями. Восстанавливающие агенты также необходимы для образования по крайней мере одного из этих токсинов (стрептолизина О), но аскорбиновая кислота, которая действует на образование этого токсина так же эффективно, как и цистеин [135], не влияет на его активацию [136].

2) Они необратимо ингибируются холестерином. Последний подавляет действие очень многих гемолизинов, включая поверхностно-активные сапонины и мыла, а также гемолизины змеиных ядов, но он не действует на кислородустойчивые бактериальные гемолизины. Если холестерин добавить к раствору восстановленного гемолизина и затем отцентрифугировать, надосадочная жидкость не становится гемолитичной, даже если добавить еще некоторое количество восстанавливающего агента; если холестерин суспендировать в воде и экстрагировать бензолом, гемолизин может быть восстановлен в водной фазе. Если же этот ингибитор добавить к окисленному гемолизину и отцентрифугировать, то надосадочная жидкость после восстановления становится гемолитичной. Исходя из этого, можно

предположить, что восстановленный гемолизин адсорбируется холестерином [137]. Другие стеролы, имеющие гидрофильную гидроксильную группу у третьего углеродного атома стерольного ядра в *цис-* (или β-) положении к метильной группе у десятого углеродного атома и гидрофобную группу у семнадцатого углеродного атома (эргостерол, стигмастерол, холестанол и копростанол), также ингибируют гемолизины [137a]. Плазма кроликов, у которых была вызвана гиперхолестеринемия, не оказывает ингибирующего действия на гемолизины, возможно, потому, что холестерин прочно связан глобулинами плазмы [137 b, c].

3) Нестойкие к кислороду гемолизины серологически родственны, т. е. каждый из них нейтрализуется антитоксином другого.

По своему биологическому действию эти гемолизины имеют много общего с сапонином: 1) вещества обоих типов гемолитичны, кардиотоксичны и летальны [138, 139]; 2) активность обоих ингибируется холестерином и родственными стеролами [137a]; 3) одна доза стрептолизина О, пневмолизина или θ-токсина не оказывает непосредственного влияния на изолированное сердце лягушки, но освобождает какое-то ингибирующее вещество. Это вещество термостабильно, неспособно к диализу, растворимо в хлороформе. Если смыть этот ингибитор (холестерин?), то вторичная доза гемолизина приводит сердце в состояние систолической контрактуры [138, 139]; 4) при введении мышам сублетальной дозы бактериального гемолизина или сапонина у них развивается временная (неиммуногенная) специфическая нечувствительность к гемолизинам обоих типов [140]; 5) предварительная инъекция холестерина предохраняет мышей от действия стрептолизина О [141].

Возможно, эти гемолизины имеют общую гемолизирующую простетическую группу, вероятно, какое-нибудь поверхностноактивное вещество, от которого зависят их биологическое действие и их серологическое родство.

б) Гемолизин яда кобры. Об очищенном кристаллическом гемолизине, который Де получил из яда кобры, уже упоминалось выше (см. стр. 659); его физические свойства приведены в табл. 67. При исследованиях растворимости он оказался однородным. Аминокислоты, присутствие которых было установлено, находились в следующих соотношениях (остатки на молекулу белка): $Арг_{36}$, $ЦиSH_{32}$, $Гис_{24}$, $Лиз_{12}$, $Мет_8$, $Три_3$, $Тир_8$. Токсин инактивируется J_2; H_2O_2 и $K_3Fe(CN)_6$ и реактивируется цистеином, H_2S и KCN [6, 8, 10, 142—144].

Если этот гемолизин является фосфатидазой А, то он отличается от фосфатидазы А кротоксина относительной нетоксичностью, отношением к восстанавливающим агентам и физическими свойствами (см. табл. 67). Различия в биологических, химических и физических свойствах ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию, не являются неожиданными (см. раздел 1, А).

B. Нейротоксины

Бактериальные нейротоксины характеризуются чрезвычайно сильной токсичностью и медленным действием. Чтобы убить животное одной летальной дозой нейротоксина бациллы ботулизма, палочки Шига или столбняка, требуется не менее 3—4 дней. Обычно при опытах с этими токсинами за животными наблюдают в течение недели. Нейротоксины змеиных ядов значительно менее токсичны, но действуют гораздо быстрее. В опытах с токсинами змеиных ядов обычно практикуется наблюдение за животными в течение одного дня или меньше. Но при таком методе исследования не принимаются в расчет более медленно действующие токсические компоненты ядов.

1) НЕЙРОТОКСИНЫ БАЦИЛЛЫ БОТУЛИЗМА

Бактерии *Clostridium botulinum* пяти типов (A—E) продуцируют шесть токсинов (бактерии типа C продуцируют два токсина). Форма пищевого отравления, известная как ботулизм, вызывается исключительно токсином бактерий типа A вследствие введения в пищеварительный тракт пищи, на которой рос и продуцировал свой токсин этот микроорганизм. Этот токсин был выделен в кристаллической форме несколько лет назад; ультрацентрифугальные, электрофоретические и иммунологические исследования показали его однородность; физические свойства токсина указаны в табл. 67 [2a, 145, 146]. При осаждении в ультрацентрифуге очищенные препараты токсина показывают более размытую границу, чем это бывает при нормальной диффузии, однако эта кажущаяся небольшая молекулярная неоднородность может быть результатом отмеченной лабильности белка [2a]. Токсин является глобулиноподобным неконъюгированным белком со следующим аминокислотным составом (остатки на молекулу белка): $Ала_{394}$ $Арг_{239}$ $Асп\text{-}NH_{2/370}$ $ЦиSH_{20}$ (ЦиS—)$_{40}$ $Глу_{953}$ $Гли_{166}$ $Гис_{60}$ $Лей_{703}$ *изо*-$Лей_{820}$ $Лиз_{477}$ $Мет_{64}$ $Фе_{64}$ $Про_{203}$ $Сер_{374}$ $Тре_{642}$ $Три_{32}$ $Тир_{672}$ $Вал_{406}$ [147].

LD этого токсина для морской свинки равна 0,83 *нг/кг*, или 20 млн. молекул для мыши, или 1 *мг* на 1200 *т* живого веса. Пока не известно, каким образом он осуществляет столь фантастически высокую активность. Токсин действует специфически на нервную ткань и не дает кожнонекротического эффекта. Вызываемые им периферические параличи происходят вследствие того, что он угнетает выделение ацетилхолина как в парасимпатических, так и в скелетных холинэргических нервно-мышечных окончаниях; влияния на мышцы, двигательные мионевральные пластинки и проводимость нервов не отмечено [148—150].

Токсин бациллы ботулизма типа B обладает такой же токсичностью по весу, как и токсин типа A; его молекулярный вес

предположительно равен 60 000. Высокоочищенный, но аморфный препарат токсина оказался нерастворимым в воде и солевых растворах с pH выше 5,5 [25].

Данные предварительного исследования показывают, что свежевыделенный токсин бацилл типа D почти в 3 раза токсичнее токсина бацилл типа A, а при разведении раствором желатины или бульоном его токсичность возрастает в 6000 раз. LD образующегося продукта равна 77 *мпг/кг* (для мыши) [151]. Эта удивительная токсичность означает, что примерно 10 *мг* «усиленного» токсина достаточно, чтобы убить количество живого вещества, эквивалентное населению всего земного шара. В молодых культурах (48 час.) бóльшая часть токсина (около 90%), по-видимому, находится в самих микроорганизмах, а не в культуральной жидкости. При диализе экстрактов этих организмов выпадает нерастворимая фракция с высоким содержанием токсина [151a]. Не ясно, является ли она другой формой токсина или инертным белком, абсорбировавшим токсин.

2) СТОЛБНЯЧНЫЙ НЕЙРОТОКСИН

Столбнячный нейротоксин, известный так же как тетаноспазмин, не менее токсичен, чем токсин бациллы ботулизма типа A; заражение неинвазионным микробом *Cl. tetani* может привести к летальному исходу именно вследствие действия этого токсина. Столбнячный нейротоксин был выделен в виде однородных кристаллов; его свойства указаны в табл. 67 [152, 153]. Аминокислоты, которые были определены, встречаются в следующих соотношениях (остатки на молекулу белка): $Арг_{13}$ $Асп_{26}$ $Глу_{47}$ $Гли_{30}$ $Гис_5$ $Лей_{43}$ *изо*-$Лей_{48}$ $Лиз_{46}$ $Мет_8$ $Фе_{20}$ $Тре_{29}$ $Три_3$ $Вал_{31}$ [154].

Столбнячный токсин по своему влиянию на парасимпатические холинэргические нервные окончания похож на токсин бациллы ботулизма [155, 156], но главное действие он оказывает на центральную нервную систему, достигая клеток передних рогов спинного мозга после абсорбции двигательными нервами и перемещения вдоль нервных стволов [157, 157a, 157b].

Вензинк показал, что в мышце столбнячного животного нарушен синтез гликогена даже в предсудорожный период, когда мышечная функция кажется нормальной. Анаэробный гликолиз и содержание креатинфосфата уменьшены, а гликоген практически совсем не откладывается в печени, хотя глюкоза всасывается нормально. Вероятно, ингибирование гликолиза происходит на какой-то стадии между разложением глюкозо-6-фосфата и образованием пировиноградной кислоты. Автор предполагает, что контрактуры при столбняке могут возникать из-за нарушения гликолиза, ведущего к уменьшению образования фосфата, обладающего значительной потенциальной энергией [158—160].

3) НЕЙРОТОКСИН *SHIGELLA SHIGAE* [160a]

S-Формы грамотрицательной бактерии *Shigella shigae* содержат два токсичных вещества: полимолекулярный комплекс фосфолипида, полисахарида и белка (см. раздел 3, К) и белковый нейротоксин. R-формы, которые не синтезируют полисахарид, содержат только нейротоксин [161—163]. Образование токсина ингибируется железом [21], как в случае дифтерийного токсина. Преобладающим дыхательным пигментом микроба является цитохром b; скорость окисления янтарной кислоты обратно пропорциональна образованию токсина, и, для того чтобы уменьшить образование токсина на 1 молекулу [2a, 157, 157a, 157b], требуется несколько сотен атомов железа (а не четыре). В отличие от дифтерийной палочки бацилла Шига не выделяет свободный порфирин вместе с токсином [164]. Токсин получен электрофоретически однородным; его свойства приведены в табл. 67. Он так же токсичен, как нейротоксины ботулизма и столбняка, но его концентрация в микроорганизмах очень низка [2b].

4) НЕЙРОТОКСИНЫ ЗМЕИНЫХ ЯДОВ

а) Нейротоксин гремучниковых. *Crotalus terrificus terrificus* интересен во многих отношениях. Это единственная гремучая змея Южной Америки, и в отличие от других гремучих змей ее яд оказывает сильное нейротоксическое и слабое протеолитическое действие. Он также более гемолитичен, чем относительно менее нейротоксичные яды других представителей семейства гремучниковых [165]. Яд гремучих змей Центральной Америки подобен яду змей Северной Америки по своему сильному протеолитическому и слабому нейротоксическому действию, а яд змей венесуэльских видов занимает промежуточное положение [166]. Нейротоксин яда гремучей змеи действует главным образом на центральную нервную систему [167], тогда как нейротоксическое действие ядов аспидовых змей проявляется в основном на периферической нервной системе [65].

В работах Слотта и Фрэнкеля-Конрата (см. стр. 658) предполагается, что нейротоксин и гемолитическая фосфатидаза А яда *Crotalust. terrificus* идентичны. Вся токсическая и гемолитическая активность яда была связана с однородной фракцией кротоксина, LD которого для мыши равнялась 360 *мг/кг*. (Таким образом, он примерно в полмиллиона раз менее токсичен для мышей, чем нейротоксины палочки Шига, бациллы ботулизма и столбняка для морских свинок и кроликов.) Лизолецитин, освобождаемый фосфатидазой А, вызывает различные эффекты. Он оказывает токсическое действие на сердце и влияет на изолированные поперечнополосатые мышцы, вызывая *in vivo* контрактуру, фибрилляцию, невозбуди-

мость, увеличение содержания воды и молочной кислоты и уменьшение содержания калия и фосфатов [168]. Он разрушает эндотелий капилляров, вызывая кровоизлияние, отек и некроз [169]; освобождает гистамин из тканей, что приводит к общему падению кровяного давления [170]. Тресеви и Дей [171] считают, что гистамин играет важную роль в механизме летального действия яда. Токсичная фосфатидаза А оказывает сильное подавляющее действие на ряд «нерастворимых» дыхательных ферментов митохондрий, включая дегидразы янтарной и пировиноградной кислот, но она не влияет на некоторые «растворимые» ферменты, принимающие участие в процессах гликолиза, брожения и окисления [171a]. Разрушение менее 10% лецитина митохондрий в препаратах сукциноксидазы из гомогенатов печени крыс и митохондрий печени крыс приводит к полному ингибированию сукциндегидразы. Эта часть лецитина, вероятно, локализована между сукциндегидразой и цитохромом c, и, возможно, от нее зависит поддержание правильного пространственного соотношения между цитохромами b и c [171b].

Был получен частично очищенный нейротоксический компонент ядов гадюк. Подобно кротоксину, его активность также полностью подавляется восстанавливающими агентами [172].

б) Нейротоксины аспидовых змей. Считают, что яды аспидовых змей содержат несколько нейротоксинов, и эти нейротоксины совершенно отличны от нейротоксинов ядов гремучниковых змей не только по эффективности действия, но и по поведению с восстанавливающими агентами. Токсикологам индийской [173] и немецкой [64, 174—179] школ удалось получить частично очищенные препараты. По данным немецких исследователей, все нейротоксичные компоненты ядов аспидовых змей (*Naja naja* и *Naja flava*; LD для мыши 0,5—1 *мг/кг*) диффундируют через полупроницаемые мембраны, оставляя относительно нетоксичный остаток, который составляет 30—40% всей массы яда. Считают, что токсичная, проходящая через мембрану фракция содержит три нейротоксичных компонента— A, B и C; все они обратимо инактивируются кислородом в щелочной среде и реактивируются цистеином в кислой среде. Компонент A неустойчив и инактивируется даже воздухом. Его LD для мыши равна 30—120 *мг/кг*, а молекулярный вес, найденный в опытах с диализом, находится в интервале между 1500 и 4000. Очищенные препараты содержат около 5% серы. Компонент A образует пикраты и хлоргидраты, из которых токсин можно получить обратно с очень небольшой потерей активности. Компонент B имеет меньший молекулярный вес, чем компонент A, а его LD для мыши равна 1 *мг/кг*. Кристаллический препарат компонента C имеет LD, равную 6—9 *мг/кг* (для мыши). Все эти компоненты необратимо инактивируются бисульфитом, хотя цистеин действует на них противоположным образом. Во многих работах рассматривается вопрос о механизме обратимой инактивации окислителями и необратимой инактивации

бисульфитом, а также об отношении этих процессов к характеру связей серы в препаратах; но, поскольку нет критериев, по которым можно было бы судить о чистоте фракций, трудно прийти к каким-либо определенным выводам.

Активность нейротоксичных фракций яда кобры в какой-то степени (10—25%) снижается цистеином, и это, по-видимому, обусловлено присутствием компонента, отличного от рассматривавшихся. Известно, что нейротоксичная фосфатидаза А яда гремучей змеи инактивируется цистеином (см. стр. 658) и что яды аспидовых змей содержат фосфатидазу А, но является ли она нейротоксичной и инактивируется ли цистеином или идентична чувствительному к кислороду, активируемому цистеином гемолизину, описанному выше (стр. 664), еще не ясно.

Яды аспидовых обладают «курареподобным» нейротоксическим действием, влияя преимущественно на периферическую двигательную нервную систему [65]. Они являются также единственными ядами, содержащими холинэстеразу [69]. Поскольку нарушение выделения ацетилхолина в области нервных окончаний может привести к проявлению «курареподобного» эффекта на холинэргических двигательных нервах, то было выдвинуто предположение, что холинэстераза является нейротоксином ядов аспидовых змей [180, 181]. Однако это маловероятно, так как очищенная холинэстераза не обладает нейротоксической активностью, а очищенные препараты нейротоксина не обладают холинэстеразной активностью, и, во всяком случае, «курареподобное» действие ядов не изменяется пропорционально содержанию в них холинэстеразы [182]. В области концевой двигательной пластинки обычно содержится холинэстераза, которая играет важную роль в нормальной передаче возбуждения холинэргическим нервам [183].

По данным Гоша, Де и Саркара [184], яд кобры содержит вещество, подавляющее синтез ацетилхолина, но оно находится не в той фракции, в которой содержится их нейротоксин, тормозящий дыхательные движения. Авторы предполагают, что оно может быть идентично веществу, ингибирующему дыхательные ферменты ткани мозга. Это вещество, в свою очередь, может быть идентично ингибитору системы цитохром—цитохромоксидаза [185] и (или) ингибитору дегидразы, который, как известно, присутствует в ядах змей (см. раздел 3, Г). Маловероятно, чтобы этот фермент был нейротоксичным, поскольку он также обнаружен в высоких концентрациях в ядах гремучниковых и гадюк, не обладающих нейротоксическим действием.

Саркару удалось получить частично очищенный кардиотоксичный компонент яда кобры. Маловероятно, что он относится к сравнительно низкомолекулярным нейротоксичным компонентам, поскольку его скорость диффузии соответствует молекулярному весу 46 200 [186].

Г. Ингибиторы дегидразы

Чейн [187] показал, что яды *Naja naja* и *Notechis scutatus* подавляют брожение и гликолиз в дрожжевых экстрактах путем ингибирования различных дегидраз. Эта работа была подтверждена и продолжена Флекенштейном [188—193], который предварительно изучал способность ингибировать дегидразу вызывающими боль и воспаление низкомолекулярными веществами известного строения (аллиловое горчичное масло, бромистый циан, хлорацетофенон, бромистый бензил, бромистый ксилил, монобромацетон, этиловый эфир монобромуксусной кислоты, монобром- и монохлорацетаты). Предполагают, что эти вещества причиняют боль и воспаление, создавая условия для накопления лимонной, пировиноградной и щавелевоуксусной кислот, о которых известно, что они действуют болезненно, когда вводятся под кожу при нейтральном pH. Яды пчел и змей также содержат вещества, причиняющие боль и воспаление даже при миллионных разведениях; их активность в этом отношении приблизительно соответствует их способности ингибировать дегидразы. По сравнению с ядами гремучниковых змей и гадюк яды пчел и аспидовых змей оказывают лишь небольшое локальное действие при подкожном введении, но они зато вызывают чрезвычайно сильное воспаление глаз (южноафриканская черношеяя кобра *Sepedon haemachates* может ослепить свою жертву, выплевывая яд ей в глаза).

Способность подавлять дегидразную активность и способность вызывать воспаление и кератит глаз кролика не связаны строгой зависимостью. Пчелиный яд оказался наиболее сильно действующим как в отношении воспалительного эффекта, так и в отношении ингибирования дегидразы лимонной кислоты. Яд *Bitis arietans* не вызывает воспаления и практически не влияет на дегидразы; воспалительная способность изменяется параллельно способности ингибировать дегидразу в пределах ряда ядов аспидовых змей и ряда ядов гремучниковых змей и гадюк, но яды аспидовых, имеющие бо́льшую воспалительную активность, чем яды змей двух других семейств, могут иметь меньшую подавляющую активность в отношении дегидраз. Флекенштейн также наблюдал параллелизм между способностью ядов ингибировать дегидразы и их способностью препятствовать тепловой коагуляции яичного желтка—явление, впервые замеченное Боке, Дворецким и Эссексом [194]. Между токсичностью при внутривенном введении змеиного и пчелиного ядов для крыс и их способностью подавлять дегидразу мышц параллелизма не наблюдается.

В настоящее время считают, что есть несколько ингибиторов дегидраз. Пчелиные и змеиные яды ингибируют дегидразу янтарной кислоты, которая действует без участия кофермента I, но еще Чейн показал, что яд аспидовых, являющийся ингибитором

дегидраз молочной, яблочной, β-оксимасляной кислот и аминокислот, представляет собой пирофосфатазу, разрушающую кофермент I (дифосфопиридиннуклеотид) [187]. Ингибирование же дегидразы янтарной кислоты, возможно, происходит благодаря фосфатидазе А (см. стр. 668) [171a, 171b].

Флекенштейн показал также, что 0,01 *М* цинка подавляет активность пчелиного и змеиного ядов по отношению к дегидразе и коагуляцию яичного желтка. Содержание цинка в свежем яде кобры составляет примерно 0,02—0,03 *М*, и при этой концентрации он будет уменьшать ингибиторную (по отношению к дегидразе и коагуляции яичного желтка) активность яда при разведении $^1/_{1000}$. (Влияние цинка на действие неразведенного яда не выяснено.) При разведении яда до таких концентраций, при которых он еще обладает сильным воспалительным действием, содержание цинка уменьшается до субингибиторных количеств. Флекенштейн предполагает, что естественная функция цинка, находящегося в яде, заключается в защите самих ядовитых желез от вредного действия яда.

Д. Коагулянты

Химизм свертывания крови чрезвычайно сложен, но для целей настоящей работы можно считать, что свертывание нормальными компонентами плазмы происходит, грубо говоря, по следующим стадиям: а) при контакте с чужеродной поверхностью в цельной крови появляется тромбопластин, очевидно, в результате какого-то взаимодействия между тромбоцитами и так называемым «антигемофилическим глобулином»; б) в присутствии ионов кальция и факторов V и VII тромбопластин катализирует превращение протромбина в протеолитический фермент тромбин; в) тромбин катализирует распад растворимого белка—фибриногена на «фибринопептид» и белок фибрин, частицы которого, соединяясь друг с другом участками, обнаженными в результате распада фибриногена, образуют нерастворимый сгусток [195, 195a].

1) СТАФИЛОКОАГУЛЯЗА

Все патогенные стафилококки продуцируют вещество, свертывающее кровь. Очевидно, коагулязоположительные микроорганизмы защищаются от фагоцитоза в макроорганизме барьером или оболочкой из фибрина, так как и кокки, и лейкоциты имеют тенденцию ассоциироваться. Кроме того, можно предположить, что фибрин предотвращает или сводит к нулю опсонизацию, предшествующую фагоцитозу [196].

Смит и Хейл [197, 198] показали, что стафилокоагуляза не свертывает фибриногена непосредственно, но для ее действия необходимо участие фактора, который встречается в плазме человека, кролика

и лошади в большей концентрации по сравнению с плазмой морских свинок, мышей и крыс. Они пришли к выводу, что этот фактор не является протромбином, так как очищенный препарат фибриноген—протромбин, который свертывается комплексом тромбопластина, не свертывался стафилокоагулязой. Кроме того, авторы обнаружили, что одни штаммы стафилококков продуцируют коагулязу, свертывающую кроличью плазму, но не свертывающую плазму морских свинок, другие штаммы—коагулязу, свертывающую плазму кроликов и морских свинок, но не свертывающую плазму мышей, а третьи—коагулязу, которая свертывает плазму животных всех трех видов. С другой стороны, Дьюси и Лоренц [199, 200] считают, что коагулязный фактор плазмы или является протромбином, или очень тесно связан с ним. Эти авторы нашли, что очищенный фибриноген свертывается стафилокоагулязой в присутствии очищенного протромбина. Кроме того, им удалось показать в противоположность более ранним данным, что стафилокоагуляза обладает антигенными свойствами. Причем имеется не менее трех различных по своим антигенным свойствам коагуляз, происходящих от различных штаммов стафилококков. Плазма всех трех видов экспериментальных животных свертывалась коагулязой любого штамма стафилококков в тех случаях, когда коагулязу применяли в достаточных количествах и отсутствовала специфическая антикоагуляза. Эти данные нетрудно согласовать с данными Смита и Хейла. Если концентрация «прокоагулянта» (протромбин, коагулязный фактор) ниже концентрации, оптимальной для данного субстрата, скорость образования коагулянта должна быть пропорциональна произведению концентраций «прокоагулянта» и активатора (комплекс тромбопластина или стафилокоагуляза). Другими словами, необходимая концентрация коагулянта должна создаваться за определенное время из прокоагулянта высокой концентрации и активатора низкой концентрации, или наоборот; однако коагулянт нужной концентрации не образуется, если концентрации прокоагулянта и активатора низки. Дьюси и Лоренц [200] показали это опытным путем. Если фибриноген-протромбиновый комплекс Смита и Хейла содержал протромбин в низкой концентрации, то он свертывался комплексом тромбопластина высокой концентрации; но при действии препарата, содержащего относительно низкую концентрацию стафилокоагулязы, свертывание происходило не во всех случаях, хотя такой препарат мог вызвать свертывание в присутствии протромбина в больших концентрациях. Аналогично, если одни штаммы стафилококков продуцируют меньше коагулязы, чем другие, то их фильтраты могут свертывать кровь, относительно богатую коагулязным фактором, но не свертывают кровь, содержащую мало этого фактора.

Протромбин и коагулязный фактор ведут себя одинаково во всех отношениях, но механизм образования коагулянта комплексом тромбопластина отличается от механизма его образования стафило-

коагулязой; при действии последней не требуется участие факторов V и VII [199]. Плазма, профильтрованная по Зейтцу 3—4 раза, теряет полностью свою протромбиновую активность и только 60% коагулязного фактора [201]. Полная потеря протромбиновой активности, возможно, объясняется потерей фактора VII [202]. Образующиеся коагулянты также отличаются друг от друга. Тромбин, образовавшийся в нормально свертывающейся крови, быстро исчезает, отчасти вследствие адсорбции фибрином, отчасти в результате ингибирования гепарин-альбуминовым комплексом. «Тромбин», образовавшийся под влиянием стафилокоагулязы, только частично ингибируется этим комплексом (Дьюси, частное сообщение).

2) КОАГУЛЯНТЫ ЗМЕИНЫХ ЯДОВ

Яды гадюковых, гремучниковых и австралийских аспидовых содержат очень сильные коагулянты. Игл [203] показал, что протеолитические ферменты могут свертывать кровь и что причиной коагулирующего действия многих ядов является их протеолитическая активность. Трипсин превращает протромбин в тромбин в отсутствие ионов кальция, а папаин действует непосредственно на фибриноген, превращая его в волокнистый гель также в отсутствие ионов кальция. Яды некоторых гремучих змей действуют подобно папаину непосредственно на фибриноген, а яды других могут действовать одновременно и на протромбин и на фибриноген. Яды некоторых аспидовых действуют только подобно трипсину и не свертывают кровь без протромбина [203—206]. За последнее время химия свертывания крови усложнилась несколькими новыми факторами [195], и, вероятно, есть необходимость пересмотреть роль протеолитических ферментов. Харгривс обнаружил, что ионы кальция ускоряют свертывание под влиянием яда *Bothrops jararaca*, но не потому, что они влияют непосредственно на превращение фибриногена в фибрин (Ca^{2+} не влияет на свертывание очищенного фибриногена), и не потому, что они влияют на превращение протромбина (Ca^{2+} ускоряет свертывание депротромбинизированной плазмы), а, вероятно, вследствие нейтрализации антитромбинового вещества [207].

Причиной коагулирующего действия змеиных ядов не всегда являются протеолитические ферменты. Игл обнаружил, что некоторые яды гадюковых, гремучниковых и аспидовых не свертывают декальцинированную плазму. Мак-Ферлан и Барнет [208] указывали, что сильная коагулирующая способность яда *Vipera russellii* часто маскируется при использовании оксалатной или цитратной плазмы. Этот яд свертывает плазму, превращая протромбин в тромбин, но только в присутствии ионов кальция и определенных липидов. Он широко используется как кровоостанавливающий агент, особенно при лечении гемофилии [209—211]. Некоторые коагулянты змеиных ядов были получены в частично очищенном виде [5, 212, 212а, 213].

Е. Антикоагулянты

1) БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФИБРИНОЛИЗИНЫ

Некоторые грамположительные бактерии, включая стрептококки, стафилококки и *Cl. welchii*, продуцируют вещества, которые растворяют кровяные сгустки или делают кровь несвертывающейся. Из них наиболее известен стрептококковый фибринолизин, или стрептокиназа. Он катализирует превращение неактивного компонента сыворотки (плазминогена) в активный протеолитический фермент (плазмин), расщепляющий фибриноген или фибрин. Альбуминовая фракция плазмы содержит антиплазмин. Плазмин плазмы обычно находится в форме плазминогена и комплекса плазмин-антиплазмин [214, 215]. Плазмин можно выделить из этого комплекса, встряхивая плазму с хлороформом, который разрушает антиплазмин [216], или разводя плазму, что вызывает диссоциацию комплекса [217]. Плазминоген может также превращаться автокаталитически в плазмин. Стрептокиназа была получена в частично очищенном виде [218]. Она является антигеном [219]. Стафилококки продуцируют подобную ей «стафилокиназу» [220, 221]. Природа фибринолизина *Cl. welchii* не известна, но, по-видимому, он действует непосредственно и является протеолитическим ферментом [222].

2) АНТИКОАГУЛЯНТЫ ЗМЕИНЫХ ЯДОВ

Антикоагулирующее действие ядов, возможно, объясняется чрезмерным влиянием факторов, вызывающих коагуляцию: а) длительное воздействие протеолитических ферментов может разрушать протромбин, тромбин и фибриноген [203, 204]; б) при коагуляции фибриногена *in vivo* фибрин может откладываться на стенках кровеносных сосудов и кровь может дефибринироваться в такой степени, что делается неспособной к свертыванию [223].

Точно не известно, всегда ли протеолитические ферменты являются причиной антикоагулирующего действия змеиных ядов. Хотя антикоагулянтные яды обнаружены главным образом у африканских, азиатских и некоторых австралийских аспидовых змей [54], их яды вообще менее протеолитичны, чем яды змей других семейств [204].

Ж. Цитолизины и геморрагины

1) БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЦИТОЛИЗИНЫ

Наиболее сильнодействующие бактериальные цитолизины—это коллагеназы *Cl. welchii* (α-токсин) и *Cl. histolyticum* [224—227]. Эти бактерии являются высокоинвазионными микроорганизмами, и их коллагеназы не ингибируются нормальной сывороткой в отли-

чие от протеаз неинвазионных представителей рода Clostridium (*Cl. botulinum, Cl. oedematiens, Cl. sporogenes, Cl. tetani*) [224, 228]. У людей, страдающих газовой гангреной (заражение *Cl. welchii*), или у кроликов, которым введена коллагеназа, разрушается трипсиноустойчивый коллагеновый остов мышцы, тогда как сами мышечные волокна остаются незатронутыми [227, 229]. Если газовая гангрена вызвана *Cl. histolyticum*, то мышца может быть разрушена до кости. Коллагеназа *Clostridium welchii* была выделена в виде почти чистого препарата, LD которого для мыши равнялась 100 *мг/кг*. Вероятно, этот фермент не действует на другие белки, кроме коллагена и желатины [226].

2) ЦИТОЛИЗИНЫ И ГЕМОРРАГИНЫ ЗМЕИНЫХ ЯДОВ

Считают, что цитологическое и геморрагическое действие змеиных ядов вызывается главным образом протеолитическими ферментами [168], но имеются и другие факторы, способствующие проявлению этого действия. Оксидаза офио-*l*-аминокислоты Целлера играет важную роль в протеолизе, вызываемом змеиными ядами. Она ускоряет распад белков тем, что, разрушая аминокислоты, сдвигает вправо равновесие каталитической реакции

$$\text{Белок} + \text{Вода} \rightleftarrows \text{Аминокислоты}$$

Если яды содержат оксидазу *l*-аминокислот, но не содержат протеолитических ферментов, они все же могут вызывать цитолиз, ускоряя действие внутриклеточных протеолитических ферментов укушенного животного [69]. Оксидаза *l*-аминокислот встречается во всех змеиных ядах, причем наиболее богаты ею яды гадюковых и меньше всего ее содержится в ядах аспидовых, хотя имеются и исключения из этого правила. Флавинадениндинуклеотидная простетическая группа этого фермента придает змеиным ядам желтый цвет. Чисто белые яды *Bothrops itapetiningae, Demansia textilis* и одной разновидности *Vipera aspis*, встречающейся в Южной Франции, не содержат оксидазы *l*-аминокислот. Фермент был выделен в чистом виде из яда водяного щитомордника [230], он примерно в 500 раз активнее оксидазы *l*-аминокислот млекопитающих [33].

Другой геморрагический агент, который не содержится в змеином яде, но образуется при его действии,—это лизолецитин (см. стр. 658 и сл.). Он может вызывать кровоизлияние, отек и некроз [168].

Рибонуклеаза ядов гремучих змей, вероятно, способствует их цитолитическому действию [231].

3. Вещества, вызывающие шок

Падение кровяного давления, являющееся результатом кровоизлияния и отека, а также освобождение гистамина под действием лизолецитина, отчасти может быть причиной шока, вызываемого

укусами гремучниковых змей и гадюк; однако имеются еще и другие факторы. Роха-и-Сильва с сотрудниками показали, что псевдоглобулиновая фракция нормальной плазмы содержит брадикиноген, который является предшественником гипотензивного и раздражающего гладкие мышцы фактора (брадикинина), освобождаемого трипсином и протеолитическими змеиными ядами. Брадикинин термостабилен и проходит через полупроницаемые мембраны, но разрушается при дальнейшем действии яда. Это вещество может вызывать тяжелый, иногда оканчивающийся смертью шок [232, 233].

Целлер [69] считает, что офиоаденозинтрифосфатаза, которую он обнаружил в ядах аспидовых, гремучниковых и гадюковых змей, может также вызывать шок, истощая источники легкодоступной энергии в форме аденозинтрифосфата и креатинфосфорной кислоты. Возможно, что и другие ферменты ядов способствуют деструкции аденозинтрифосфата. Глюкозо-1- и глюкозо-6-фосфаты, а также кофермент I, которые принимают участие в метаболическом цикле, ведущем к ресинтезу аденозинтрифосфата, расщепляются: глюкозомонофосфаты—фосфомоноэстеразами [234, 235], а дифосфопиридиннуклеотид—пирофосфатазой, рассматривавшейся в разделе 3, Г. Аденозин-5-фосфат дефосфорилируется дальше 5-нуклеотидазой [236].

И. Фактор распространения

В 1928 г. Дюран-Рейнолс [237] заметил, что экспериментальное заражение кролика коровьей оспой заметно усиливается при внутрикожном введении вируса с водным тестикулярным экстрактом. Он полагал, что изменялась сама вакцина, но Мак-Клин [238] первый показал, что тестикулярный экстракт содержит фактор распространения, увеличивающий проницаемость тканей. С тех пор фактор распространения был обнаружен в яде пчел, скорпионов, ядовитых рыб и всех ядовитых змей [239], а также в культуральной жидкости многих инвазионных бактерий, например стрептококков, стафилококков, пневмококков, *Cl. welchii* и *Cl. septicum* [240—242]. В большинстве случаев, а может быть, и во всех случаях факторы распространения являются гиалуронидазами [243]. Они дают возможность токсическим веществам ядов и бактериальных культур быстро диффундировать, так как уменьшают вязкость гиалуроновой кислоты—полимера глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина,—которая входит в состав студнеподобного склеивающего вещества кожи. Гиалуроновая кислота содержится также в капсулах стрептококков групп А и С. Вирулентные капсулированные стрептококки не продуцируют гиалуронидазу и могут быть декапсулированы ферментом, который выделяется только некапсулированными штаммами [242]. Бактериальные гиалуронидазы (исключая гиалуронидазы стафилококков и *Cl. septicum*) являются адаптивными веществами, причем их образование стимулируется не только гиалуроновой

кислотой, но и некоторыми продуктами ее гидролиза [244]. Вещества, которые стимулируют продуцирование гиалуронидазы одним микроорганизмом, не обязательно влияют также и на другой микроорганизм [245].

К. Полимолекулярные токсины [86, 246]

Отмытые клетки S-форм грамотрицательных бактерий кишечной группы одинаково токсичны для животных независимо от того, живы микробы или убиты; все микроорганизмы этой группы вызывают одинаковое патологическое (главным образом энтеротоксическое) действие. R-формы (за исключением бактерии *Shigella shigae*, см. стр. 667) значительно менее токсичны. Причиной токсичности S-форм являются эндотоксины, которые идентичны их доминантным соматическим О-антигенам. Эти вещества представляют собой токсичные (Токс.) полимолекулярные комплексы фосфолипида (Фл.), полисахарида (Пс.) и белков (Бл.).

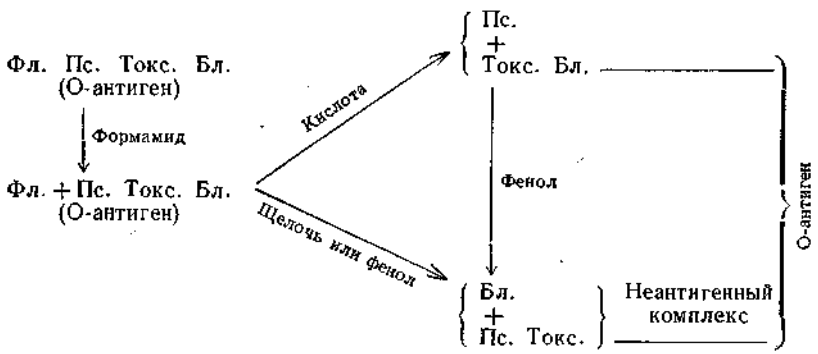
Буавэн и Месробеню [247] обнаружили новый тип соединения — токсичного фосфолипид-полисахаридного комплекса (Фл. Пс. Токс.) в трихлоруксуснокислых экстрактах отмытых клеток S-форм некоторых грамотрицательных бактерий. Этот комплекс не был обнаружен ни у R-форм этих бактерий, ни у грамположительных бактерий. Его LD для мыши равна 5—10 *мг/кг*, а именно он определяет токсичность этих микроорганизмов. Считают, что этот комплекс идентичен О-антигену, так как он вызывает образование антител, которые агглютинируют исходный микроорганизм, и сам осаждается антибактериальными сыворотками.

Морган показал, что этот комплекс содержит также и белок [248—251]. Токсичный О-антигенный комплекс Фл. Пс. Токс. Бл., составляющий 5—7% общего сухого веса бактерий S-форм *Sh. shigae* и *Salm. typhi*, был экстрагирован диэтиленгликолем. При обработке этого комплекса формамидом отщеплялся фосфолипид и получался комплекс Пс. Токс. Бл., сохранявший все антигенные свойства, иммунологическую специфичность и токсичность первоначального комплекса. При обработке кислотой комплекса Пс. Токс. Бл. он распадался на деградированный низковязкий полисахарид и сопряженный с кислотой белок. Если же обработку проводили щелочью или фенолом, то он распадался на недеградированный вязкий полисахарид и простой амфотерный белок. Обработка конъюгированного белка фенолом превращала его в простой амфотерный белок.

Конъюгированные белки *Sh. shigae* и *Salm. typhi* могли легко рекомбинироваться с любым из недеградированных полисахаридов обоих микроорганизмов, образуя О-антигены, специфичность которых определялась полисахаридным гаптеном. Но они не соединялись с деградированным полисахаридом. Амфотерный белок и неде-

градированный полисахарид рекомбинировались, образуя неантигенный комплекс.

Работа Моргана касалась главным образом иммунологических свойств комплекса, токсичность отдельных фракций он не определял. Когда Гебель с сотрудниками [252—255] обработали аналогичным образом подобный комплекс бактерии *Shigella flexneri*, они обнаружили, что токсичность была связана или с недеградированным полисахаридом, или с конъюгированным белком в зависимости от метода гидролиза. Данные этих двух исследовательских школ можно подытожить при помощи следующей схемы:



Работы Майлса и Пири [256, 257] показывают, что структура токсичных соматических О-антигенов грамотрицательных бактерий, по крайней мере в случае *Brucella melitensis*, может быть и более сложной. Полный антиген этого микроорганизма имеет формулу [Л. Фл. (Фл. Пс. Токс. Бл.)]. Круглые скобки означают, что смесь липида (Л.) и фосфолипида (Фл.) свободно связана с ядром, соответствующим антигену Моргана. Квадратные скобки означают, что комплекс может агрегироваться и образовывать частицы с очень высоким молекулярным весом, обнаруживающие в растворе двулучепреломление в потоке.

Мичил [258] приготовил искусственные токсичные комплексы полисахарида и белка. Пектин-тирозил-глобулин и пектин-тирозил-желатина имели летальные дозы (для кролика) около 1 *мг/кг* [LD антигенов бактерий *Sh. shigae* и *Salm. typhi* равнялись 5 *мг/кг* (для мыши)]. Комплекс полисахарид-белок без тирозинового остатка оказывался нетоксичным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Landsteiner K., The Specificity of Serological Reactions, Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1946.
2. Van Heyningen W. E., Ann. Repts. Progr. Chem. (Chem. Soc. London), 47, 303, 1950.

2a. Putnam F. W., Lamanna C., Sharp D. G., J. Biol. Chem., **176**, 401, 1948.
2b. Van Heyningen W. E., Gladstone G. P., Brit. J. Exptl. Path., **34**, 202, 1953.
2c. Baldwin R. L., Brit. J. Exptl. Path., **34**, 217, 1953.
3. Kabat E. A., Heidelberger M., Bezer A. E., J. Biol. Chem., **168**, 629, 1947.
4. Field C. W., J. Exptl. Med., **12**, 551, 1910.
5. Slotta K. H., Fraenkel-Conrat H. L., Ber., **71**, 1076, 1938.
6. De S. S., Ann. Biochem. Exptl. Med. (India), **4**, 45, 1944.
7. Li C. H., Fraenkel-Conrat H. L., J. Am. Chem. Soc., **64**, 1586, 1942.
8. De S. S., J. Indian Chem. Soc., **21**, 290, 292, 307, 1944.
9. Gralén N., Svedberg T., Biochem. J., **32**, 1375, 1938.
10. De S. S., J. Indian Chem. Soc., **22**, 10, 1945.
11. Cushney A. R., Handbuch der Experimentelle Pharmakologie, Bd. 2, H. 2, Julius Springer, Berlin, 1920, S. 599.
12. Boehm R., Handbuch der Experimentelle Pharmakologie, Bd. 2, H. 1, Julius Springer, Berlin, 1920, S. 283.
13. Chenowith M. B., J. Pharmacol. Exptl. Therap., **97**, No. 4, part 2, Pharmacol. Revs., 383, 1949.
14. Pirie N. W., Nature, **168**, 1008, 1951.
15. Herriot R. M., J. Gen. Physiol., **19**, 283, 1935.
16. Herriot R. M., J. Gen. Physiol., **20**, 335, 1937.
17. Philpot J. St. L., Small P. A., Biochem. J., **32**, 542, 1938.
18. Woiwood A. J., Linggood F. V., Nature, **163**, 218, 1949.
19. Yoneda M., Nature, **168**, 879, 1951.
19a. Drew R. M., J. Bact., **66**, 244, 1953.
20. Pillemer L., Moore D. H., J. Biol., **173**, 427, 1948.
20a. Agner K., J. Exptl. Med., **92**, 337, 1950.
20b. Pappenheimer A. M., Advances in Protein Chem., **4**, 123, 1948.
21. Dubos R., Geiger J. W., J. Exptl. Med., **84**, 143, 1946.
22. Clarke E. G. C., Thesis, Univ. London, 1946.
23. Calmette A., Les Venins, Masson et Cie, Paris, 1907.
24. Stevenson J. W., Helson V. A., Reed G. B., Can. J. Res., **E25**, 14, 1947.
25. Lamanna C., Glassman H. N., J. Bact., **54**, 575, 1947.
26. Llewellyn Smith M., League Nations, Bull. Health Organisation, **10**, 104, 1942/1943.
27. Oakley C. L., Warrack G. H., Clarke P. H., J. Gen. Microbiol., **1**, 91, 1947.
28. Macfarlane M. G., Biochem. J., **47**, 270, 1950.
29. Miles E. M., Miles A. A., J. Gen. Microbiol., **4**, 22, 1950.
30. Chu H. P., J. Gen. Microbiol., **3**, 255, 1949.
31. Sumner J. B., in Sumner, Myrbäck, eds., The Enzymes, vol. 1, part 2, Academic Press, New York, 1951, p. 873.
32. Traub F. B., Hollander A., Friedemann U., J. Bact., **52**, 169, 1946.
33. Krebs H. A., in Sumner, Myrbäck, eds., The Enzymes, vol. 2, part 1, Academic Press, New York, 1951, p. 499.
33a. Van Heyningen W. E., in Williams, ed., Biochemical Society Symposia, No. 10, Immunochemistry, Cambridge University Press, Cambridge, 1953, p. 37.
34. Barr M., Glenny A. J., J. Hyg., **44**, 135, 1946.
35. Seibert F. B., Bact. Revs., **5**, 69, 1941.
36. Long E. R., Seibert F. B., The Heart and the Chest, sec. 1, chap. 41, Charles C. Thomas, Springfield, Ill, 1948.

37. Seibert F. B., Munday B., Am. Rev. Tuberc., 23, 23, 1931.
38. Seibert F. B., Glenn J. T., Am. Rev. Tuberc., 44, 1, 1941.
39. Seibert F. B., Am. Rev. Tuberc., 59, 86, 1949.
40. Seibert F. B., Chem. Rev., 34, 107, 1944.
41. Seibert F. B., Stacey M., Kent P. W., Biochim. Biophys. Acta, 3, 632, 1949.
42. Seibert F. B., Ann. Rev. Microbiol., 4, 35, 1950.
43. Seibert F. B., Crumb C., Seibert M. V., J. Am. Chem. Soc., 72, 2678, 1950.
44. Seibert F. B., Kent P. W., Brit. J. Exptl. Path., 31, 691, 1950.
45. Hanby W. E., Rydon H. N., Biochem. J., 40, 297, 1946.
46. Phisalix M., Animaux venimeux et Venins, Masson et Cie, Paris, 1922.
47. Kellaway C. H., Le Messurier D. H., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 13, 205, 1935.
48. Phisalix M., Compt. rend., 154, 1434, 1912.
49. Briot M. A., Compt. rend. soc. biol., 54, 1172, 1902.
50. Richet M. C., Compt. rend. soc. biol., 55, 246, 1903.
51. Portier P., Richet C., Compt. rend., 134, 247, 1902.
52. Sonderhoff R., Ann., 525, 138, 1936.
53. Henri M. V., Kayaloff, Compt. rend. soc. biol., 60, 884, 1906.
54. Boquet P, Venins de Serpents et Antivenins, Editions Medicales Flammarion, Paris, 1948.
55. Phisalix M., Bull. soc. path. exotique, 6, 190, 1913.
56. Mohammed A. H., Biochem. J., 38, 284, 1944.
57. Tetsch C., Wolff K., Biochem. Z., 290, 394, 1937.
58. Ditmars R. L., Snakes of the World, The Macmillan Company, New York, 1937.
59. Arthus M., Arch. intern. physiol., 12, 271, 1912.
60. Ray P., J. Indian Chem. Soc., 17, 681, 1940.
61. St. Faust E., Arch. exptl. Path. Pharmacol., 64, 244, 1911.
62. Klobusitzky D., Arch. exptl. Path. Pharmacol., 179, 204, 1935.
63. Micheel F., Jung F., Z. physiol. Chem., 239, 217, 1936.
64. Wieland H., Konz W., Sitzber. bayer. Akad. Wiss. Math.-physikal. Kl., 11, 2, 177, 1936.
65. Kellaway C. H., Bull. Johns Hopkins Hosp., 60, 1, 18, 159, 1937.
66. Hahn G., Fernholz M. E., Ber., 72, 1281, 1939.
67. Reinert M., Schweiz. med. Wochschr., 67, 515, 1937.
68. Fassbender W., Biochem. Z., 317, 246, 1944.
69. Zeller E. A., in Sumner, Myrbäck, eds., The Enzymes, vol. 1, part 2, Academic Press, New York, 1951, p. 986.
70. Anton H., Z. Immunitätsforsch., 105, 241, 1946.
71. Feldberg W., Kellaway C. H., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 15, 461, 1937.
72. Lynen F., Wieland U., Ann., 533, 93, 1938.
73. Painter E. P., Frank K. W., J. Biol. Chem., 111, 643, 1935.
74. Ehrlich P., Deut. med. Wochschr., 17, 976, 1891.
75. Osborne T. B., Mendel L. B., Harris I. F., Am. J. Physiol., 14, 259, 1905.
76. Kunitz M., McDonald M. R., J. Gen. Physiol., 32, 25, 1949.
77. Le Breton E., Moulé Y., Compt. rend., 255, 152, 1947.
78. Karel L., Crandell D. D., J. Cell. Comp. Physiol., 28, 339, 1936.
79. Lamanna C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 69, 332, 1948.
80. Lamanna C., Lowenthal J. P. J. Bact., 61, 751, 1951.
81. Tachibana T., Japan. J. Microbiol. Path., 36, 362, 1942.
82. Clark C. L., Clarke E. G. C., Pharm. J., 104, 71, 1947.
83. Moriyama L., Japan. J. Exptl. Med., 12, 591, 1934.

84. Inoue S., J. Soc. Chem. Ind., Japan, **40**, 215, 1937.
85. Le Breton E., Moulé Y., Bull. soc. chim. biol., **31**, 94, 1949.
85a. Levy M., Benaglia A. E., J. Biol. Chem., **186**, 829, 1950.
86. Van Heyningen W. E., Bacterial Toxins, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1950.
87. Turner A. W., Rodwell A. W., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., **21**, 17, 27, 1943.
88. Ross H. E., Warren M. E., Barnes J. M., J. Gen Microbiol., **3**, 148, 1949.
88a. Stock A. H., Verney E., J. Immunol., **69**, 373, 1952.
89. Eaton M. D., J. Bact., **31**, 347, 367, 1936.
90. Pappenheimer A. M., Jr., J. Biol. Chem., **120**, 543, 1937.
90a. Pope C. G., Stevens M. F., Caspary E. A., Fenton E. T., Brit. J. Exptl. Path., **32**, 246, 1951.
90b. Bowen H. E., J. Immunol., **68**, 429, 1952.
90c. Lepow I. H., Pillemer L., J. Immunol., **69**, 1, 1952.
90d. Oudin J., Compt. rend., **222**, 115, 1947; **228**, 1890, 1949.
91. Pappenheimer A. M., Jr, J. Biol. Chem., **167**, 251, 1947.
92. Pappenheimer A. M., Jr., Hendee E. D., J. Biol. Chem., **171**, 701, 1947.
93. Pappenheimer A. M., Jr., Hendee E. D., J. Biol. Chem., **180**, 597, 1949.
94. Wadsworth A. B., Crowe M. O'L., Smith L. A., Brit. J. Exptl. Path., **16**, 201, 1935.
95. Gray C. H., Holt L. B., Biochem. J., **43**, 191, 1948.
96. Tasman A., van Ramshorst J. D., Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., **17**, 153, 1951.
97. Rawlinson W. A., Hale J. H., Biochem. J., **45**, 247, 1949.
98. Hale J. H., Rawlinson W. A., Holt L. B., Rimington C., Smith W., Brit. J. Exptl. Path., **31**, 96, 1950.
99. Pappenheimer A. M., Jr, Williams C. W., J. Gen. Physiol., **35**, 727, 1952.
100. Delezenne M. C., Ledebt S., Compt rend., **155**, 1101, 1912.
101. Hughes A., Biochem. J., **29**, 437, 1935.
102. Slotta K. H., Forster W., Ber., **71**, 1082, 1938.
103. Fraenkel-Conrat H. L., Fraenkel-Conrat J., Biochim. Biophys. Acta, **5**, 98, 1950.
104. Ghosh B. N., De S. S., Nature, **143**, 380, 1938.
105. Holden H. F., Austral. J., Exptl. Biol. Med. Sci., **13**, 103, 1935.
106. Macfarlane M. G., Knight B. C. J. G., Biochem. J., **35**, 884, 1941.
107. Macfarlane M. G., Biochem. J., **47**, 267, 1950.
108. Crook E. M., Brit. J. Exptl. Path., **23**, 37, 1942.
109. Van Heyningen W. E., Bidwell E., Biochem. J., **42**, 130, 1948.
110. Macfarlane M. G., Biochem. J., **42**, 587, 1948.
111. Van Heyningen W. E., Biochem. J., **35**, 1257, 1941.
112. Nagler F. P. O., Brit. J. Exptl. Path., **20**, 473, 1939.
113. Macfarlane R. G., Oakley C. L., Anderson C. G., J. Path Bact., **52**, 99, 1941.
114. Van Heyningen W. E., Biochem. J., **35**, 1246, 1941.
115. Kielley W. W., Meyerhof O., J. Biol. Chem., **183**, 391, 1950.
116. Llewellyn Smith M., Price S. A., J. Path. Bact., **47**, 379, 1938.
117. Morgan F. G., Graydon J. J., J. Path. Bact., **43**, 385, 1936.
118. Williams R. E. O., Harper G. J., J. Path. Bact., **59**, 69, 1947.
119. Elek S. D., Levy E., J. Path. Bact., **62**, 541, 1950.
120. Wittler R. G., Pillemer L., J. Biol. Chem., **174**, 23, 1948.

121. Llewellyn Smith M., Price S. A., J. Path. Bact., **47**, 361, 1938.
122. Christie R., Graydon J. J., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci. **19**, 9, 1941.
123. Munch-Peterson E., Christie R., J. Path. Bact., **59**, 367, 1947
124. Marks J., Vaughan A. C. T., J. Path. Bact., **62**, 597, 1950.
125. Bernheimer A. W., J. Exptl. Med., **80**, 309, 321, 333, 1944.
126. Bernheimer A. W., J. Gen. Physiol., **30**, 337, 1947.
127. Weld J. T., J. Exptl. Med., **61**, 473, 1935.
128. Todd E. W., J. Path. Bact., **47**, 423, 1938.
129. Herbert D., Todd E. W., Brit. J. Exptl. Path., **25**, 242, 1944.
130. Bernheimer A. W., Rodbart M., J. Exptl. Med., **88**, 149, 1948.
131. Bernheimer A. W., J. Exptl. Med., **90**, 373, 1949.
132. Humphrey J. H., Brit. J. Exptl. Path. **30**, 345, 365, 1949.
133. Robinson J. R., J. Immunol., **66**, 653, 1951.
134. Stollerman G. H., Bernheimer A. W., MacLeod C. M., J. Clin., Invest., **29**, 1636, 1950.
134a. Rosendal K., Bernheimer A. W., J. Immunol., **68**, 53, 1952.
135. Slade H. D., Knox G. A., J. Bact., **60**, 301, 1950.
136. Herbert D., Todd E. W., Biochem. J., **35**, 1124, 1941.
137. Cohen B., Perkins M. E., Putterman S., J. Bact., **39**, 59, 1940.
137a. Howard J. G., Wallace K. R., Payling Wright G., Brit. J. Exptl. Path., **34**, 174, 1953.
137b. Howard J. G., Wallace K. R., Brit. J. Exptl. Path., **34**, 181, 1953.
137c. Howard J. G., Wallace K. R., Brit. J. Exptl. Path., **34**, 185, 1953.
138. Bernheimer A. W., Cantoni G. L., J. Exptl. Med., **81**, 295, 1945.
139. Cantoni G. L., Bernheimer A. W., J. Exptl. Med., **81**, 307, 1945.
140. Bernheimer A. W., Cantoni G. L., J. Exptl. Med., **86**, 193, 1947.
141. Hewitt L. F., Todd E. W., J. Path. Bact., **49**, 45, 1939.
142. De S. S., Indian J. Med. Res., **27**, 793, 1940.
143. De S. S., Science and Culture (India), **6**, 675, 1941.
144. De S. S., Ann. Biochem. Exptl. Med. (India), **2**, 237, 1942.
145. Lamanna C., Eklund H. W., McElroy O. E., J. Bact., **52**, 1, 1946.
146. Abrams A., Kegeles G., Hottle G. A., J. Biol. Chem., **164**, 63, 1946.
147. Buehler H. J., Schantz E. J., Lamanna C., J. Biol. Chem., **169**, 295, 1947.
148. Ambache N., J. Physiol, **108**, 127, 1949.
149. Burgen A. S. V., Dickens F., Zatman L. J., J. Physiol., **109**, 10, 1949.
150. Denz F. A., J. Path. Bact., **63**, 235, 1951.
151. Wentzel L. M., Sterne M., Polson A., Nature, **166**, 739, 1950.
151a. Boroff D. A., Raynaud M., Prévot A. R., J. Immunol., **68**, 503, 1952.
152. Pillemer L., Wittler R. G., Grossberg D. B., Science, **103**, 615, 1946.
153. Pillemer L., J. Immunol., **53**, 237, 1946.
154. Dunn M. S., Camien M. N., Pillemer L., Arch. Biochem., **22**, 374, 1949.

155. Ambache N., Morgan R. S., Payling Wright G., J. Physiol., **107**, 45, 1948.
156. Ambache N., Morgan R. S., Payling Wright G., Brit. J. Exptl. Path., **29**, 408, 1948.
157. Wright E. A., Morgan R. S., Payling Wright G., J. Path. Bact., **62**, 569, 1950.
157a. Bayliss J. H., Mackintosh J., Morgan R. S., Payling Wright G., J. Path. Bact., **64**, 33, 1952.
157b. Bayliss J. H., Joseph J., Mackintosh J., Morgan R. S., Payling Wright G., J. Path. Bact., **64**, 47, 1952.
158. Wensinck F., Thesis, Utrecht, Holland, 1951.
159. Wensinck F., Chem. Weekblad, **48**, 118, 1952.
160. Wensinck F., Biochem. Biophys. Acta, **10**, 184, 1953.
160a. Engley F. B., Jr. Bact. Revs., **16**, 153, 1952.
161. Boivin A., Mesrobeanu L., Compt. rend. soc. biol., **124**, 442, 1937.
162. Boivin A., Mesrobeanu L., Compt. rend. soc. biol., **126**, 222, 323, 1937.
163. Olitzki L., Bendersky J., Koch P. K., J. Immunol., **45**, 237, 1942.
164. Van Heyningen W. E., Gladstone G. P., Brit. J. Exptl. Path., **34**, 221, 1953.
165. Slotta K. H., Szyszka G., Ber., **71**, 258, 1938
166. Vellard J., Ann. inst. Pasteur, **60**, 511, 1938.
167. Houssay B. A., Hug E., Compt. rend. soc. biol., **99**, 1509, 1928.
168. Houssay B. A., Compt. rend. soc. biol., **105**, 308, 1930.
169. Belfanti S., Z. Immunitätsforsch, **44**, 347, 1925.
170. Feldberg W., Holden H. F., Kellaway C. H., J. Physiol., **94**, 232, 1938.
171. Trethewie E. R., Day A. J., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., **26**, 153, 1948.
171a. Braganca B. M., Quastel J. H., Biochem. J., **53**, 88, 1953.
171b. Nygaard A. P., Sumner J. B., J. Biol. Bhem., **200**, 723, 1953.
172. Ghosh B. N., De S. S., Bhattacharya D. B., Indian J. Med. Res., **26**, 753, 1939.
173. Ghosh B. N., De S. S., Chaudhuri D. K., Indian J. Med. Res., **29**, 367, 1941.
174. Micheel F., Dietrich H., Bischoff G., Z. physiol. Chem., **249**, 157, 1937.
175. Micheel F., Schmitz H., Ber., **71**, 703, 1446, 1938.
176. Micheel F., Bode G., Ber., **71**, 1302, 2653, 1938.
177. Micheel F., Bode G., Naturwiss, **26**, 298, 1938.
178. Micheel F., Emde H., Z. physiol. Chem., **265**, 266, 1940
179. Micheel F., Emde H., Ber., **72**, 1724, 1939.
180. Iyengar N. K., Sehra K. B., Mukerji B., Indian J. Med. Res., **26**, 487, 1938.
181. Bovet F., Bovet D., Ann. inst. Pasteur, **69**, 309, 1943.
182. Sarkar B. B., Maitra S. R., Ghosh B. N., Indian J. Med. Res., **30**, 543, 1942.
183. Feldberg W., Brit. Med. J., **1**, 967, 1951.
184. Ghosh B. N., De S. S., Sarkar N. K., J. Indian Chem. Soc., **21**, 93, 1944.
185. Ghosh B. N., Chatterjee A. K., Sinha A. C., J. Indian Chem. Soc., **25**, 384, 1948.
186. Sarkar N. K., J. Indian Chem. Soc., **24**, 61, 227, 1947.
187. Chain E., Biochem. J., **33**, 407, 1939.

188. Fleckenstein A., Tippelt H., Kroner H., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 210, 380, 1950.
189. Fleckenstein A., Berg G., Gayer J., Schönig S., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 213, 265, 1951.
190. Fleckenstein A., Schneiter W, Arch. exptl. Path. Pharmakol., 213, 537, 1951.
191. Fleckenstein A., Gerkhardt H., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 214, 135, 1951.
192. Fleckenstein A., Jaeger W., Arch. exptl. Path. Pharmakol., 215, 163, 1952.
193. Fleckenstein A., Fettig B., Zeit. Naturforsch., 6b, 213, 1951.
194. Boquet P., Dworetzky M., Essex H. E., Am. J. Physiol., 161, 561, 1950.
195. Bailey K., Bettelheim F. R., Lorand L., Middlebrook W. R., Nature, 167, 233, 1951.
195a. Lorand L., Biochem. J., 52, 200, 1952.
196. Smith W., Hale J. H., Smith M. M., Brit. J. Exptl. Path., 28, 57, 1947.
197. Smith W., Hale J. H., Brit. J. Exptl. Path., 25, 101, 1944.
198. Smith W., Hale J. H., Brit. J. Exptl. Path., 26, 209, 1945.
199. Duthie E. S., Lorenz L. L., Nature, 165, 729, 1950.
200. Duthie E. S., Lorenz L. L., J. Gen. Microbiol., 6, 95, 1952.
201. Tager H., Lodge A. L., J. Exptl. Med., 94, 73, 1951.
202. Koller F., Loeliger A., Duckert F., Acta Haematol., 6, 1, 1951.
203. Eagle H., Harris T. N., J. Gen. Physiol., 20, 543, 1937.
204. Eagle H., J. Exptl. Med., 65, 613, 1937.
205. Hanut C. J., Arch. intern. physiol., 47, 345, 1938.
206. Rosenfeld S., Rubinstein J., J. Lab., Clin. Med., 27, 45, 1941.
207. Hargreaves A. B., Rev. brasil. biol., 7, 311, 1947.
208. Macfarlane R. G., Barnett B., Lancet, 2, 985, 1934.
209. Macfarlane R. G., Trevan J. W., Attwood A. M. P., J Physiol., 99, 7p., 1941.
210. Fantl P., Everard B. A., Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 27, 197, 1949.
211. Edsall G., Am. J. Physiol., 134, 609, 1941.
212. Ghosh B. N., De S. S., Ray R. C., Science and Culture (India), 4, 738, 1939.
212a. Iyengar N. K., Sehra K. B., Mukerji B., Chopra R. N., Current Sci. (India), 1, 51, 1938.
213. Dunn E. E., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 50, 393, 1934.
214. Christensen L. R., J. Gen. Physiol., 28, 363, 1945.
215. Christensen L. R., MacLeod C. M., J. Gen. Physiol., 28, 559, 1945.
216. Christensen L. R., J. Gen. Physiol., 30, 149, 1947.
217. Macfarlane R. G., Pilling J., Lancet, 2, 562, 1946.
218. Christensen L. R., J. Clin. Invest., 28, 163, 1949.
219. Tillett W. S., Sherry S., J. Clin. Invest., 28, 173, 1949.
220. Lack C. H., Nature, 161, 559, 1948.
221. Gerheim E. B., Ferguson J. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 71, 261, 1949.
222. Reed G. B., Orr J. H., Brown H. J., J. Bact., 46, 475, 1943.
223. Dunn E. E., J. Pharmacol. Exptl. Therap., 50, 386, 1934.
224. Maschmann E., Biochem. Z., 297, 284, 1938.
225. Macfarlane R. G., Maclennan J. D., Lancet, 2, 328, 1945.

226. Bidwell E., van Heyningen W. E., Biochem. J., **42**, 140, 1948.
227. Oakley C. L., Warrack G. H., van Heyningen W. E., J. Path. Bact., **58**, 229, 1946.
228. De S. Smith L., Lindsley C. H., J. Bact., **38**, 221, 1939.
229. Robb-Smith A. H. T., Lancet, **2**, 362, 1945.
230. Singer T. B., Kearney E. B., Arch. Biochem., **29**, 190, 1950.
231. Taborda A. R., Taborda L. C., Williams J. N., Elvehjem C. A., J. Biol., Chem., **194**, 227, 1952.
232. Rocha e Silva, Beralds W. T., Rosenfeld G., Am. J Physiol., **156**, 261, 1949.
233. Feldberg W., Kellaway C. H., J. Physiol., **94**, 187, 1938.
234. Gulland J. M., Jackson E. M., Biochem. J., **32**, 590, 1938.
235. Zeller E. A., Helv. Chim. Acta, **33**, 821, 1950.
236. Gulland J. M., Jackson E. M., Biochem. J., **32**, 597, 1938.
237. Duran-Reynals F., Compt. rend. soc. biol., **99**, 6, 1928.
238. McClean D., J. Path. Bact., **33**, 1045, 1930.
239. Duran-Reynals F., Bact. Revs., **6**, 197, 1942.
240. Duran-Reynals F., J. Exptl. Med., **58**, 161, 1933.
241. McClean D., J. Path. Bact., **42**, 477, 1936.
242. McClean D., J. Path. Bact., **53**, 13, 156, 1941.
243. Chain E., Duthie E. S., Brit. J. Exptl. Path., **21**, 324, 1940.
244. McClean D., Hale C. W., Biochem. J., **35**, 159, 1941.
245. Rogers H. J., Biochem. J., **40**, 583, 782, 1946.
246. Burrows W., Ann. Rev., Microbiol., **5**, 181, 1951.
247. Boivin A., Mesrobeanu L., Rev. immunol., **1**, 353, 1935; **2**, 113, 1936; **3**, 319, 1937; **4**, 40, 197, 1938.
248. Morgan W. T. J., Biochem. J., **30**, 909, 1936; **31**, 2003, 1937.
249. Morgan W. T. J., Partridge S. M., Biochem. J., **34**, 169, 1940; **35**, 1140, 1941.
250. Morgan W. T. J., Partridge S. M., Brit. J. Exptl. Path., **23**, 151, 1942.
251. Morgan W. T. J., Partridge S. M., Brit. J. Exptl. Path., **21**, 180, 1940.
252. Goebel W. F., Binkley F., Perlman E., J. Exptl. Med., **81**, 315, 1945.
253. Goebel W. F., Binkley F., Perlman E., J. Exptl Med. **81**, 331, 1945.
254. Goebel W. F., Perlman E., Binkley F., J. Exptl. Med., **81**, 349, 1945.
255. Goebel W. F., Perlman E., J. Exptl. Med., **84**, 223, 235, 1946.
256. Miles A. A., Pirie N. W., Brit. J. Exptl. Path., **20**, 83, 109, 278, 1939.
257. Miles A. A., Pirie N. W., Biochem. J., **33**, 1709, 1716, 1939.
258. Micheel F., Doerner H., Z. physiol. Chem., **280**, 92, 1944.

X

БЕЛКИ МОЛОКА

Т. Мак-Микин

T. L. McMeekin, «Milk Proteins» (vol. II, part A, p. 389—434)

1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Значение молока как пищи для новорожденных едва ли можно переоценить. Оно является последней связью организма новорожденного с материнским. Взаимосвязь между составом молока и различными стадиями развития новорожденного, а также внешними влияниями представляет значительный интерес для изучения адаптации. Например, котята, щенки и крольчата, которые сразу после рождения обладают ограниченной способностью двигаться, нуждаются в молоке, содержащем большие количества белка, необходимого для быстрого развития мышц. И, наоборот, телятам, жеребятам и родственным им животным, имеющим хорошо развитые мышцы и способным двигаться сразу же после рождения, требуется молоко с большим содержанием сахара, являющегося источником энергии. Молоко северного оленя содержит много богатых энергией жиров и белков, необходимых для адаптации к низким температурам. Связь между составом женского молока и развитием ребенка не находится в соответствии с этими видами адаптации. Медленное развитие ребенка в условиях защиты его от вредных внешних влияний, возможно, является причиной более сложных зависимостей между характером принятой пищи и развитием ребенка. Практика применения разбавленного коровьего молока в качестве пищи для младенцев оправдывается получаемыми при этом удовлетворительными результатами, хотя некоторые исследования показывают, что женское молоко имеет бóльшую пищевую ценность для детей, чем коровье молоко [1].

Иллюстрацией взаимосвязи между составом молока и его влиянием на кровь потомства является наличие зависимости концентрации холинэстеразы в крови молодых щенят от содержания холинэстеразы в молоке, которым они питаются [2]. Так, при кормлении щенят молозивом суки, содержащим большие количества холинэстеразы, содержание последней в сыворотке крови щенят значительно возрастает. Если тех же щенят кормить коровьим молоком, не содержащим холинэстеразы, содержание последней в сыворотке крови щенят не будет увеличиваться.

Состав молока данного вида постоянен в определенных пределах, как указано в табл. 68 [3], но он может значительно изменяться под влиянием различных факторов. Одним из наиболее важных факторов является период лактации. Изменения в составе особенно заметны в молоке, полученном при родах и вскоре после них [4]. Это первое молоко, или молозиво, например коровы, содержит большие количества антител, которые выполняют специальную функцию увеличения сопротивляемости организма новорожденного к инфекционным заболеваниям.

Таблица 68

СРЕДНИЙ СОСТАВ МОЛОКА РАЗЛИЧНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (в %)

Вид	Казеин	Белок сыворотки	Сахар	Жир	Зола
Человек . . .	0,9	1,2	6,3	3,7	0,21
Лошадь . . .	1,3	0,7	6,0	1,3	0,51
Корова	3,0	0,6	4,7	3,7	0,72
Северный олень	8,4	1,5	2,8	17,1	1,20
Кошка	3,8	3,2	4,8	4,8	0,58
Собака	4,8	2,6	3,2	11,6	—
Морская свинка	4,7	0,6	2,3	7,0	—

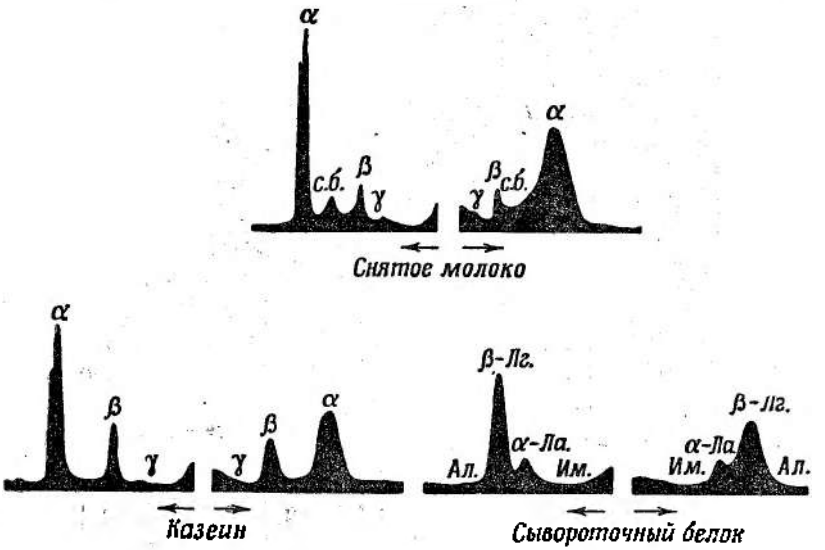
2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В МОЛОКЕ

А. Распределение белков в среднем смешанном молоке

Белки молока, как и белки других тканей, можно исследовать при помощи разнообразных методов, хотя для точной их характеристики важно выделить отдельные компоненты. Методы определения распределения белков в молоке [5—7], основанные на осаждении нитробелков в изоэлектрическом состоянии, фракционировании солью или спиртом и коагуляции нагреванием, относительно просты и дают полезные сравнительные данные. При помощи этих методов было найдено [4], что в коровьем молоке в среднем содержатся следующие белки: 2,8% казеина, 0,2% глобулина и 0,4% альбумина, тогда как в женском молоке содержание этих белков иное, а именно: 0,4% казеина, 0,2% глобулина и 0,3% альбумина. Коровье молоко вследствие его доступности исследовалось чаще, чем молоко других млекопитающих. В данном обзоре, если не сделано соответствующих оговорок, рассматриваются именно белки коровьего молока.

Наилучшим методом определения распределения белков в молоке является электрофоретический метод. В связи с тем, что казеин составляет приблизительно 80% белков молока, при электрофоре-

тическом определении распределения белков его целесообразно выделить из сыворотки. На рис. 61 [9] представлены электрофореграммы белковых компонентов снятого молока, казеина и сыворотки.



Р и с. 61. Электрофореграммы белков снятого молока в вероналовом буфере; (pH 8,35, ионная сила 0,1).

с.б.—сывороточный белок; *β-Лг.*—β-лактоглобулин; *α-Ла.*—α-лактоальбумин; *Ал.*—сывороточный альбумин; *Им.*—иммунный глобулин; α, β и γ—компоненты казеина (по Мак-Микину [9]).

Из электрофореграмм следует, что казеин состоит по крайней мере из трех компонентов [10] (см. рис. 61) и что в молочной сыворотке содержится не менее шести белков [11], четыре из которых идентифицированы (рис. 61). В табл. 69 указаны относительные количества и подвижности белковых компонентов молока, полученные на основании определения площадей пиков, соответствующих этим компонентам на электрофореграммах, и расстояний, на которые компоненты перемещаются при стандартных условиях.

Данные по распределению белков, полученные методом ультрацентрифугирования, также ценны для идентификации белков молока. Педерсен [13] определил скорость седиментации белков в снятом молоке после его диализа против фосфатного буфера; в результате диализа нерастворимые казеинаты кальция переходят в растворимые соли. На диаграмме седиментации декальцифицированного снятого молока (рис. 62) пики и соответствующие им белковые компоненты обозначены одинаковыми греческими буквами. Один из них с наименьшим значением константы седиментации был

Таблица 69

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ ПО ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИМ ДАННЫМ[a]

Белок	Содержание, % от общего белка	Подвижность $\times 10^{-5}$
Казеин [12]	80	—
α-	60	−6,7
β-	17,6	−3,1
γ-	2,4	−2,0
Белки сыворотки [11]	20	—
эуглобулин	1,2	−1,7
псевдоглобулин	0,8	−2,5
компонент III	3,6	−3,6
α-лактоальбумин	2,4	−4,2
β-лактоглобулин	11,0	−5,1
Альбумин сыворотки крови	1,0	−6,4

[a] Электрофорез проводился в вероналовом буфере при pH 8,4, ионной силе 0,1 и концентрации белка 1%.

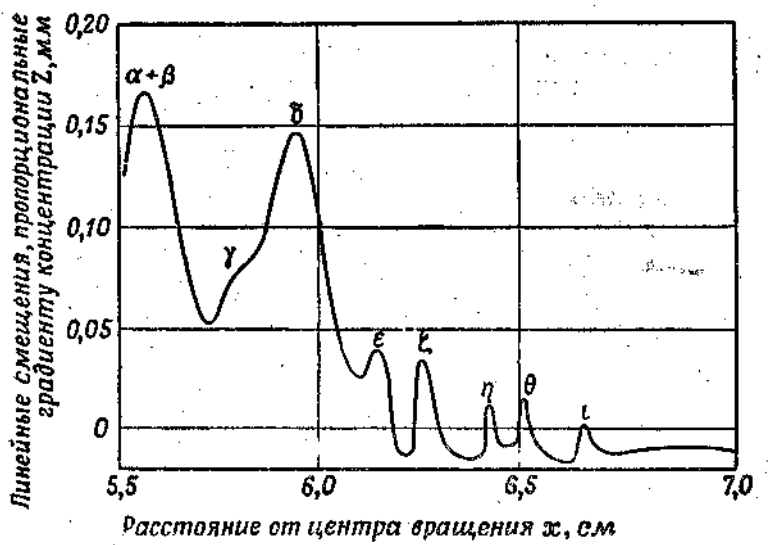


Рис. 62. Диаграмма седиментации для декальцифицированного снятого молока, полученная методом рефракции в ультрацентрифуге.

Каждый пик на диаграмме соответствует седиментации молекул определенной величины; время ультрацентрифугирования 9 час. 28 мин.; толщина сосудика 2 *см* (по Педерсену [13]).

назван α-компонентом, следующий—β-компонентом и т. д. α-Компонент был идентифицирован с кристаллическим белком, изолированным из сыворотки Кеквиком (неопубликованная работа), который недавно был описан Гордоном [14]. β-Компонент, как было установлено, идентичен с лактоглобулином, полученным Пальмером [15] и называемым теперь β-лактоглобулином. γ-Компонент идентифицирован с белком молочной сыворотки, обычно называемым лактоглобулином или иммунным глобулином (см. рис. 61). Остальные пики на кривой седиментации, как было установлено, относятся к казеину. Эти данные показывают, что казеин является гетерогенным в отношении размеров его частиц. Однако наибольшая часть казеина имеет константу седиментации $s_{20} = 10{,}4$. Поскольку казеин является также электрофоретически гетерогенным [1] и соответствующие компоненты его были выделены [10, 12, 16], возможно, что очищенные электрофоретические компоненты гомогенны в отношении размеров частиц; однако данных, подтверждающих это предположение, не имеется.

Б. Изменения в распределении белков молока в течение цикла лактации

Циклическая природа секреции молока связана с заметными изменениями белкового состава. Эти изменения наиболее значительны для первого секретируемого молока, или молозива, и для молока, секретируемого в конце лактационного периода, когда, как например у коров, период беременности накладывается на лактационный цикл. Белки молока, по-видимому, качественно не меняются в течение всего цикла лактации, хотя при этом содержание общего белка и относительные количества отдельных белков могут значительно варьировать. Так, например, Смит [17] нашел, что глобулин молозива, по существу, идентичен с иммунным глобулином нормального молока. Изменения в распределении белков коровьего молока в течение цикла лактации определяли электрофоретически [9, 18]. Установлено, что электрофоретические компоненты казеина, полученного из смешанного молока свертыванием кислотой, как и компоненты молока большинства коров, отличаются замечательным постоянством; однако казеин, полученный из молока некоторых коров, отличался тем, что его α-компонент расщеплялся на два компонента, как это показано на рис. 61. Относительные количества α- и β-казеинов оставались постоянными в течение всего цикла лактации. Однако казеин из «регрессивного» молока, т. е. жидкости, которая может быть получена из молочной железы в конце периода беременности, и казеин молозива содержат меньше β-казеина по сравнению с казеином нормального молока. Это различие в составе казеина из нормального молока и молозива можно обнаружить путем сравнения относительных площадей электрофоретических

пиков α- и β-казеинов нормального молока (рис. 61) с соответствующими пиками казеина молозива (рис. 69). Белковые компоненты молочной сыворотки изменяются в течение лактационного цикла значительнее, чем компоненты казеина. Электрофореграмма на рис. 61 была получена для нормального молока, выдоенного по истечении 14 дней после отела, и оставалась неизменной до приближения времени нового отела (70 дней до отела или 30 дней до перерыва

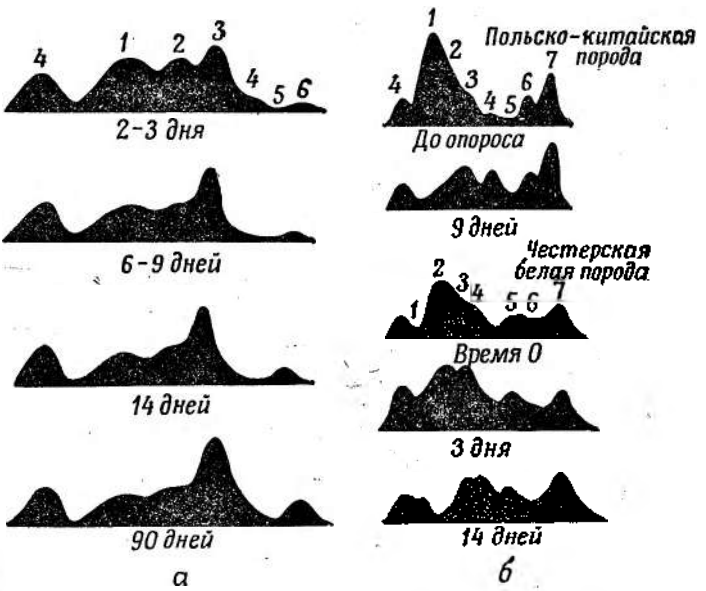


Рис. 63.

а—электрофореграммы (нисходящие границы) сыворотки женского молока для различных промежутков времени после родов; *б*—электрофореграммы (нисходящие границы) сыворотки молока свиней честерской белой и польско-китайской пород для различных промежутков времени после опороса (по Дейчу [19]).

в доении). В это время количества иммунного глобулина или глобулина молозива и компонентов альбумина начинают прогрессивно увеличиваться. При отеле глобулин молозива значительно превышает по содержанию все другие белки молозива, и соответствующий ему пик является доминирующим на электрофореграмме.

Дейч [19] произвел сравнительное изучение белков сыворотки молока женщины, коровы, лошади, козы, свиньи и овцы методами электрофореза и ультрацентрифугирования. Были обнаружены значительные различия в составе сывороточных белков у этих видов. Однако для каждого данного вида белковый состав сыворотки, соответствующей одному и тому же периоду лактации, в основном постоянен. Большие различия в электрофоретическом составе сывороточных белков были найдены для молока, полученного тотчас

после родов; это показано на рис. 63, на котором представлены электрофореграммы сывороток женского молока и молока свиней. Отмечена незначительная связь между электрофоретическими составами данной молочной сыворотки и соответствующей сыворотки крови, за исключением сходства глобулина молозива с α-глобулином сыворотки крови.

3. РАЗДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА БЕЛКОВ МОЛОКА

Аналитическими методами определяют приблизительный тип белка в молоке. Для идентификации и характеристики белков молока важное значение имеет их выделение. Вследствие доступности молока и важности его как продукта питания разделение и характеристика белков молока были предметом многих исследований.

А. Казеин

Казеин был одним из первых белков, полученных в относительно чистом состоянии. В 1838 г. Малдер [20] разработал метод выделения казеина из молока подкислением последнего. В течение длительного времени широкое применение имел казеин, получаемый по методу Хаммарстена [21]. По этому методу казеин получают следующим образом: снятое молоко разбавляют 4 объемами воды и смесь обрабатывают уксусной кислотой (0,75—1 ч. кислоты на 10^6 ч. смеси). Казеин после отделения его фильтрованием очищают повторным растворением в воде, к которой добавляют возможно меньшее количество щелочи, и вновь осаждают уксусной кислотой. После повторения этих операций казеин несколько раз тщательно промывают водой. Известны многочисленные модификации этого метода получения казеина; обычно вместо уксусной кислоты в качестве осадителя применяют соляную кислоту. Казеин вследствие его доступности и относительной чистоты оказался полезным белком как для промышленных, так и для научных целей. Казеин имеет многочисленные области практического применения; ежегодное мировое потребление казеина в промышленности составляет около 33 тыс. *т*. Практические применения казеина подробно описаны в работе Сутермейстера и Брауна [22]. В табл. 70, взятой из работы Миллендера [1], представлены результаты элементарного анализа казеина коровьего молока, полученного подкислением и переосаждением после растворения в щелочи. Данные, полученные многими исследователями, довольно близки. Тот факт, что состав и свойства препаратов казеина не изменяются при повторном растворении, позволил определить, что казеин, полученный осаждением кислотой, является типическим чистым белком. В казеине женского молока содержится меньше азота и фосфора, чем в казеине коровьего или

Таблица 70

ЭЛЕМЕНТАРНЫЙ СОСТАВ КАЗЕИНА (в %)

Автор	Год	C	H	N	P	S	O
Казеин коровьего молока							
Хаммарстен [23]	1883	52,96	7,05	15,65	0,85	0,72	(22,78)[а]
Читтенден, Пейнтер [24]	1888	53,30	7,07	15,91	0,87	0,82	(22,03)
Лимен, Хемпел [25] . .	1894	54	7,04	15,6	0,85	0,77	(21,74)
Буров [26]	1905	52,83	7,10	15,64	0,81	0,73	(22,91)
Тенгл [27]	1908	52,69	6,76	15,65	0,88	0,83	(23,14)
Ван-Слайк, Босворте [28]	1913	53,50	7,13	15,80	0,71	0,72	(22,08)
Рэмсделл, Уайттир [29]	1944	52,88	7,00	15,51	0,79	0,77	(23,05)
Миллендер [1]	1947	53,57	7,13	15,66	0,81	0,64	23,24
		53,08	6,95	15,65	0,85	0,81	22,59
Казеин женского молока							
Вроблевский [30] . . .	1894	52,24	7,32	14,97	0,68	1,12	(23,66)
Миллендер [1][б]	1947	53,78	7,12	15,14	0,47	0,65	22,63
Миллендер [1][в]	1947	53,06	6,97	15,16	0,47	1,13	22,01

[а] Данные в скобках вычислены по разности.

[б] Казеин, приготовленный по методу Энгеля [31].

[в] Казеин, приготовленный по методу Сенделина [32].

козьего молока [4]. В женском молоке содержится только 0,3—0,9% казеина, тогда как в коровьем молоке этот белок находится в количестве 2,8—3,5%. Как установил Миллендер [1], трудность отделения казеина женского молока от белков сыворотки молока может быть причиной значительных колебаний в содержании серы в казеине, полученном из женского молока.

1) ГЕТЕРОГЕННОСТЬ КАЗЕИНА

Представление о том, что казеин является чистым белком, преобладало в течение долгого времени. Однако большое число исследований указывает на то, что казеин является смесью белков. В частности исследования растворимости казеина в растворах кислот, которые проводили Линдерштрём-Ланг и Кодама [33], показали, что этот белок является смесью. Результаты этих исследований вызвали многочисленные попытки выделить компоненты казеина [34—36]. Были получены различные фракции казеина, отличающиеся одна от другой, особенно по содержанию фосфора. Миллендер

[10] показал, что казеин состоит из трех электрофоретических компонентов, обозначаемых через α, β и γ в порядке уменьшения их подвижности. Он выделил α- и γ-казеины электрофоретическим путем и установил, что они значительно различаются по содержанию фосфора.

2) МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ КАЗЕИНА

В результате применения электрофоретического анализа для разработки способов химического фракционирования казеина предложено несколько методов разделения его компонентов. Казеин, полученный из коровьего молока осаждением кислотой, обладает исключительно постоянным составом; он содержит приблизительно 75% α-казеина, 22% β-казеина и 3% γ-казеина [12]. Уорнер [16] разработал метод отделения α-казеина от β-казеина, основанный на более высокой растворимости β-казеина при pH 4,4 и температуре 2°. Гипп с сотрудниками [12] предложил два метода разделения компонентов казеина. По первому методу разделение производят осаждением отдельных компонентов из 50-процентных спиртовых растворов казеина посредством изменения pH, ионной силы и температуры. Второй метод основан на осаждении водой компонентов казеина из 6,0 *М* растворе мочевины. В обоих этих методах α-казеин оказывается наименее растворимым и отделяется первым.

а) Метод, основанный на растворимости в воде. По методу Уорнера [16] α-казеин получают растворением невысушенного очищенного казеина, осажденного кислотой, в едком натре с образованием 1-процентного раствора с pH 6,5. Затем доводят pH раствора до 3,5 добавлением разбавленной соляной кислоты. После его охлаждения до 2° разбавляют так, чтобы концентрация белка была равна 0,2—0,3%, и прибавляют 0,01 н. раствор едкого натра до тех пор, пока pH не станет равным 4,2. При этом происходит образование осадка. Раствор едкого натра добавляют до тех пор, пока надосадочная жидкость, получаемая при центрифугировании, не станет прозрачной; это обычно достигается при pH 4,4. Осадок растворяют, и всю процедуру повторяют не менее 6 раз. Изолированный таким образом белок дает электрофореграмму, характерную для α-казеина, не содержащего β-компонента. При помощи этого метода Миллендер [1] выделил α-казеин из казеина коровьего молока, однако ему не удалось получить α-компонент казеина женского молока.

б) Спиртовый метод. Для разделения компонентов казеина фракционированием спиртом очищенный осажденный кислотой казеин растворяют в разбавленной щелочи. К полученному раствору добавляют спирт и ацетат аммония в таких количествах, чтобы концентрация их в растворе составляла 50% и 0,2 *М* соответственно. При доведении pH спиртового раствора казеина до 6,5 добавлением

1 н. уксусной кислоты в 50-процентном спиртовом растворе осаждается приблизительно $^1/_3$ казеина (фракция А). Эта фракция содержит 92% α-казеина и 8% β-казеина, а также протеолитический фермент молока [37]. pH фильтрата, полученного после отделения фракции А, доводят до значения 5,7 добавлением раствора уксусной кислоты в 50-процентном спирте. Образующийся при этом осадок (фракция В) составляет $^2/_5$ всего казеина и содержит 80% α-казеина и 20% β-казеина. Белок в фильтрате, полученном при отделении фракции В, осаждают охлаждением фильтрата до 2° или разбавлением его равным объемом воды при комнатной температуре (фракция С). Эта фракция состоит из равных количеств α- и β-казеинов и содержит приблизительно 10% γ-казеина.

α-Казеин можно получить из фракции А или В. Из первой его получают повторным осаждением при pH 7,2 в присутствии ацетата аммония в 50-процентном спирте. Для получения α-казеина из фракции В последнюю растворяют в растворе буры, и α-казеин осаждают из 50-процентного спирта в присутствии 0,15 *M* NaCl раствором соляной кислоты, который добавляют в таком количестве, чтобы pH раствора стал равным 5,7. Для получения электрофоретически чистого α-казеина эту операцию необходимо повторить дважды. При обработке фракций А и В выход α-казеина составляет приблизительно $^1/_3$ от всего находящегося в молоке казеина.

β-Казеин получают из фракции С, которая содержит около 45% этого белка. Для его отделения от других компонентов используется различие в растворимости трех компонентов в воде при 2 и 32° [16]. Из водного раствора фракции С α-казеин осаждается при 2° и pH 4,5. Загрязненный β-казеин осаждается при нагревании фильтрата до 32°; при этом основная масса γ-казеина остается в растворе. После двух экстракций при 2° и pH 4,5 нерастворимая фракция представляет собою свободный γ-казеин; β-казеин получают дальнейшим экстрагированием и осаждением при указанных условиях. Выход β-казеина составляет приблизительно 15%.

γ-Казеин можно приготовить из водных фильтратов, получаемых при выделении β-казеина; γ-компонент можно также получить из нефракционированного казеина экстрагированием 50-процентным спиртом [38] по способу, аналогичному применявшемуся Осборном и Уокменом [39] для получения спирторастворимых белков. При использовании обоих методов необходимо концентрировать γ-казеин, удаляя α-казеин при 2° и pH 4,4, а основную массу β-казеина—нагреванием до 32° фильтратов, полученных при отделении этих осадков. После удаления белка, нерастворимого при 32°, и доведения концентрации NaCl в фильтрате до 0,5 *M* из последнего осаждается фракция, содержащая 44% γ-казеина. Осадок растворяют в щелочи и NaCl удаляют диализом при 2°. К раствору загрязненного γ-казеина добавляют разбавленный раствор соляной кислоты при комнатной температуре, доводя pH раствора до 6,4. Белок

осаждается в виде сиропа, который трижды экстрагируют 50-процентным спиртом при 35° и затем охлаждают до комнатной температуры. При охлаждении до 2° фракции, растворимой в 50-процентном спирте, осаждается γ-казеин, выход которого составляет 20% от общего количества γ-компонента.

в) Метод, основанный на применении растворов мочевины. Свежеполученный влажный казеин или сухой казеин легко растворяется в 6,6 *М* растворе мочевины. Электрофоретические компоненты из этого раствора выделяют простым добавлением воды [12]. При добавлении такого количества воды к раствору казеина в 6,6 *М* растворе мочевины, что ее концентрация снижается до 4,6 *М*, осаждается основная масса α-казеина. Загрязненный β-казеин осаждают из фильтрата, полученного при отделении α-казеина, таким количеством воды, которое необходимо для снижения концентрации мочевины до 1,7 *М*. γ-Казеин, находящийся в фильтрате при отделении β-казеина, осаждается сульфатом аммония при доведении концентрации последнего до 1,6 *М*. Относительно чистые α- и β-казеины получают при повторном осаждении сырых продуктов при той же концентрации мочевины, при которой производилось первоначальное осаждение. Окончательную очистку γ-казеиновой фракции производят осаждением ее из водного раствора при изменении pH и температуры, как описано в разделе, относящемся к γ-казеину.

Принципы этих методов разделения компонентов казеина использовались и прежде, однако без электрофоретического анализа фракций невозможно было определить полноту разделения казеина на составляющие его компоненты. Линдерштрём-Ланг [34] разработал метод разделения казеина в кислотно-спиртовых растворах при относительно высоких температурах и обнаружил различия в содержании фосфора в разных фракциях. Вероятно, полученная им фракция K_1, содержащая 0,1% фосфора и составляющая до 3% исходного казеина, содержала большое количество γ-казеина. Растворимый в спирте казеин, описанный Осборном и Уокменом [39], по составу и свойствам также сходен с γ-казеином. Фракции казеина, полученные Гро с сотрудниками [36] осаждением из растворов фенола, из смесей мочевины и спирта и из 70-процентного спирта, сходны по своим свойствам с чистыми электрофоретическими компонентами казеина.

Препараты α-, β- и γ-казеинов представляют собой электрофоретические компоненты, находящиеся в нефракционированном казеине при pH 7,0. Эти фракции обладают постоянным составом и свойствами, но они, как и другие белки, не являются электрофоретически гомогенными при всех условиях.

3) СВОЙСТВА И СОСТАВ КАЗЕИНОВ

а) Образование комплексов. Замечательно, что состав казеина, осажденного кислотой, всегда постоянен, несмотря на различный состав его электрофоретических компонентов (см. т. I, гл. III). Этот факт свидетельствует о том, что количественное соотношение компонентов казеина в молоке не изменяется и что компоненты разделяются с трудом. Можно предположить, что компоненты казеина каким-то образом взаимодействуют или соединяются друг с другом. Выделение компонентов казеина из раствора, содержащего мочевину, является наиболее эффективным методом их разделения. Молекулы мочевины легко образуют комплексы и, возможно, разрывают соединения казеиновых компонентов. Барк и Гринберг [40] осмометрическим методом установили, что молекулярный вес нефракционированного казеина в 6,66 *М* растворе мочевины равен 33 000. Поскольку эта величина значительно меньше значения 75 000—100 000, найденного Сведбергом с сотрудниками [41], был сделан вывод, что мочевина расщепляет молекулу казеина [42]. Однако компоненты казеина, выделенные при помощи мочевины, имеют те же состав и свойства, что и компоненты, полученные при более мягких условиях, например при небольшом изменении pH при низких температурах [16].

Уорнер [16] установил, что подвижность α-казеина уменьшается в присутствии β-казеина; он объяснял это уменьшение образованием комплекса. Недавно Перлмен [43] показала, что образование белковых комплексов, возможно, имеет важное биологическое значение. Она нашла, что α-казеин легко дефосфорилируется фосфатазой из предстательной железы при pH 5,6—6,6, причем выделяется около 42% фосфора. Фермент не действует на β-казеин, но при длительном воздействии фермента из нефракционированного казеина освобождается около 12% фосфора. В опытах со смесями α- и β-казеинов переменного состава наблюдалось частичное ингибирование действия фосфорилирующего фермента, когда относительное содержание β-казеина превышало 30%, причем степень ингибирования была пропорциональна концентрации β-казеина. Результаты этих опытов также показывают, что β-казеин соединяется с α-казеином таким образом, что фосфатные группы α-казеина становятся недоступными для действия фосфатазы. Взаимодействие α- и β-казеинов не отражается на кривой титрования их смесей, так как количество связываемой кислоты или щелочи при любом значении pH равно сумме количеств кислоты или щелочи, которые соединяются с компонентами смеси при отдельном их титровании [44].

Казеин широко использовался как субстрат для исследования кинетики действия протеолитических ферментов [45, 46]. Установление того факта, что казеин является смесью и что компоненты этой смеси, вероятно, существуют в форме комплексов и неодина-

ково гидролизуются ферментами, побуждает заново исследовать ферментативный гидролиз казеина, употребляя в качестве субстратов его отдельные компоненты.

б) Физические свойства. Поскольку обычный казеин электрофоретически неоднороден, его свойства можно рассматривать как свойства комплекса, содержащего 75% α-, 22% β- и 3% γ-казеина. Возможно, однако, что эти цифры представляют собой средние величины, отражающие количественные соотношения большого числа комплексов различного состава и молекулярного веса. Фрезер и Поуэл [46] недавно рассмотрели аномалии, обнаруженные при изучении кинетики переваривания казеина трипсином с точки зрения неоднородности казеина. Допуская, что казеин содержит 15% быстрее перевариваемого компонента, они нашли, что опытные данные, полученные при изучении гидролиза казеина, находятся в очень хорошем соответствии с теоретической кривой. Произведенные Педерсеном [13] измерения констант седиментации белков, находящихся в декальцифицированном снятом молоке и в казеине, изолированном посредством центрифугирования и осаждения кислотой, показали, что казеин является весьма гетерогенным и состоит по крайней мере из шести компонентов. Установлено, что его константа седиментации значительно изменяется с концентрацией; в 0,9-процентном растворе $s_{20}=12$, а в 2,6-процентном растворе $s_{20}=23$. Сведберг, Карпентер Л. и Карпентер Д. [41] установили, что препараты казеина являются гетерогенными и что константы седиментации компонентов изменяются в зависимости от метода получения последних. Основной компонент казеина, полученный по методам Ван-Слайка и Бекера, имеет молекулярный вес 75 000—100 000. Явное несоответствие констант седиментации казеина, полученных Педерсеном, и констант, найденных Сведбергом, Карпентером Л. и Карпентером Д., объясняется способностью казеина к диссоциации, а также тем, что авторы применяли различные буферные растворы [13]. Филпот (неопубликованные данные, цитированные Сведбергом и Педерсеном [47]) обнаружил, что добавление к растворам казеина небольших количеств кальция вызывает увеличение константы седиментации s_{20} от 6 до 10; это наблюдение, возможно, также имеет значение для объяснения расхождений между константами седиментации казеина, измеренными в различных условиях. Работ по определению молекулярных весов отдельных электрофоретических компонентов казеина не имеется.

Способность казеина соединяться с кислотами и щелочами использовали для определения в нем диссоциирующих групп [48]. Установлено, что соединительная емкость компонентов казеина по отношению к кислотам и щелочам различна [44], и это находится в соответствии с их аминокислотным составом. Заметные различия в форме кривых титрования α-, β- и γ-казеинов (рис. 64) находятся

в соответствии с аналитическими данными для ионных групп, полученными Гордоном с сотрудниками [49].

Компоненты казеина, кроме обычных ионизирующих групп, находимых в белках и связанных с аминокислотными остатками, содержат различные количества фосфорной кислоты, что следует учитывать при определении ионных групп. Подбирая такие значения pH, при которых ионные группы аминокислотных остатков должны быть диссоциированы, можно определить по кривой титрования количество ионизирующих групп, находящихся в исследуемом объекте. Так, например, предполагают, что при pH 6,35 карбоксильные группы и один эквивалент фосфорной кислоты должны находиться в диссоциированном состоянии. Вычисления, основанные на данных титрования, показывают, что при этом значении pH на 10^5 *г* α-казеина приходятся 144 моля карбоксильных групп и один эквивалент фосфорной кислоты, а на 10^5 *г* α-казеина—108 молей карбоксильных групп и один эквивалент фосфорной кислоты. Результаты этих вычислений находятся в соответствии с данными, вычисленными для этих групп на основании аминокислотного состава α- и β-компонентов. При аналогичных сопоставлениях, произведенных при других значениях pH, также установлено удовлетворительное соответствие между данными, вычисленными на основании кривой титрования и по аминокислотному составу. В табл. 71 приведены максимальные соединительные емкости компонентов казеина по отношению к кислоте и щелочи и количество (в *г*) казеина, соединяющегося с одним эквивалентом кислоты или щелочи [44]. Значения соединительной емкости по отношению к щелочи, приведенные в табл. 71, больше аналитических данных (176 и 128 эквивалентов на 10^5 *г* α- и β-казеина соответственно),

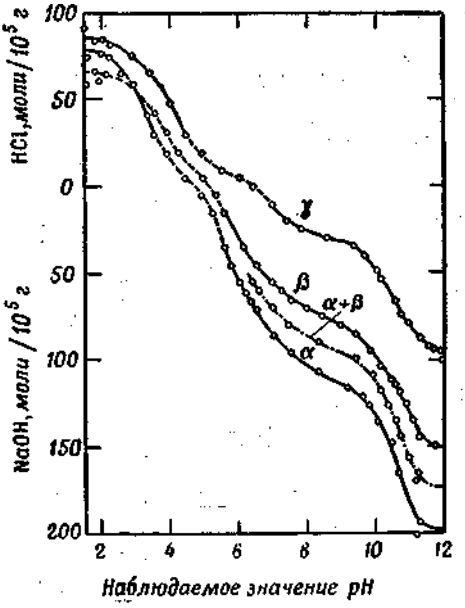


Рис. 64. Кривые титрования для α-, β- и γ-казеинов и для эквивалентной смеси α- и β-казеинов (концентрация белка 1%, ионная сила 0,05, температура 25°).

На ординате отложено количество молей кислоты или щелочи, связанное 10^5 *г* белка. Прерывистая линия отвечает области pH, в которой при условиях опыта весь белок находился в нерастворимом состоянии. Для ясности дана только часть кривой для смеси α- и β-казеинов (по Гиппу [14]).

Таблица 71

МАКСИМАЛЬНАЯ СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ЕМКОСТЬ α-, β- и γ-КАЗЕИНОВ

Количество	α-	β-	γ-
Кислоты на 10^5 *г* казеина, моли	78	66	85
Щелочи на 10^5 *г* казеина, моли	198	150	96
Казеина на эквивалент кислоты, *г*	1282	1500	1176
Казеина на эквивалент щелочи, *г*	505	666	1042

вычисленных по аминокислотному составу. Однако величина соединительной емкости по отношению к щелочи, вычисленная для нефракционированного казеина, состоящего из 16 ч. α-, 4 ч. β- и 1 ч. γ-казеина, находится в соответствии со значением 183 моля на 10^5 *г*, полученным Коном и Берггреном [48] для некоторых препаратов казеина.

Форму молекул казеина в растворе определяли посредством измерения двойного лучепреломления и вязкости растворов казеината натрия. Нитшманн и Гуггисберг [50] пришли к выводу, что частицы казеина имеют палочкообразную форму с отношением осей $b/a=8{,}7$ и длиной 290 Å, несколько зависящей от метода вычисления. Пломлей с сотрудниками [51] по данным измерения вязкости нашли для отношения осей молекулы казеина величину 9,6, допуская, что при гидратации казеина 1 *г* белка связывает 0,4 *г* воды. Поскольку эти измерения проводились с нефракционированным казеином, можно предполагать, что полученные при этом результаты относятся к средневесовой форме компонентов. Данные, полученные Гиппом с сотрудниками [44] для вязкости компонентов казеина, представленные на рис. 65, показывают, что значения вязкости для нефракционированного казеина только приблизительно совпадают со значениями, которые могут быть получены для смеси компонентов соответствующего состава. Значения истинной вязкости, полученные экстраполяцией приведенной вязкости до нулевой концентрации, для α-, β-, γ-казеинов и нефракционированного казеина, равны 0,105; 0,144; 0,095 и 0,125 (100 *мл/г*) соответственно (см. рис. 65).

Если эти значения истинной вязкости компонентов казеина использовать для вычисления отношения осей молекул компонентов (представляемых в виде вытянутых эллипсоидов) без учета гидратации, то получаются следующие цифры: для α-казеина 10,2, для β-казеина 13,2, для γ-казеина 9,3 и для нефракционированного казеина 12,0. Величина b/a для нефракционированного казеина

находится в хорошем соответствии с величиной, найденной Пломлеем с сотрудниками [51], если при расчетах принимать те же допущения.

Меллон с сотрудниками [52] изучил влияние полярных групп в молекуле казеина на величину абсорбции водяного пара. При определении величины абсорбции водяного пара в различной степени бензоилированными казеинами стало возможно отличать водяные пары, абсорбированные аминогруппами, от водяных паров, абсорбированных другими полярными группами. Абсорбцию водя-

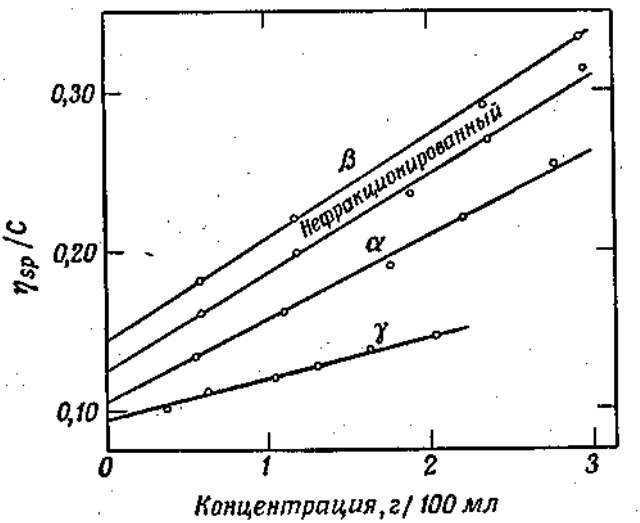


Рис. 65. Вязкость α-, β- и γ-казеинов и нефракционированного казеина.

Ионная сила 0,05; pH растворов колебался в пределах 6,4—6,9, за исключением раствора γ-казеина, pH которого был равен 7,5 (по Гиппу [44]).

ного пара пептидными группами исследовали на ряде пептидов глицина и полиглициновых эфиров. Абсорбцию водяного пара пептидными группами казеина вычисляли на основании данных, полученных для абсорбции водяного пара пептидными группами в полиглицине. Влияние гуанидиновых групп, находящихся в казеине, на абсорбцию водяного пара определяли на основании измеренных величин абсорбции водяного пара рядом производных казеина, содержащих различные количества гуанидиновых групп. Результаты этих исследований позволили установить, что приблизительно 25% водяного пара, поглощаемого казеином, абсорбируется аминогруппами, 45%—пептидными связями и 10%—гуанидиновыми группами. Влияние гидроксильных и карбоксильных групп на абсорбцию водяного пара пока не установлено.

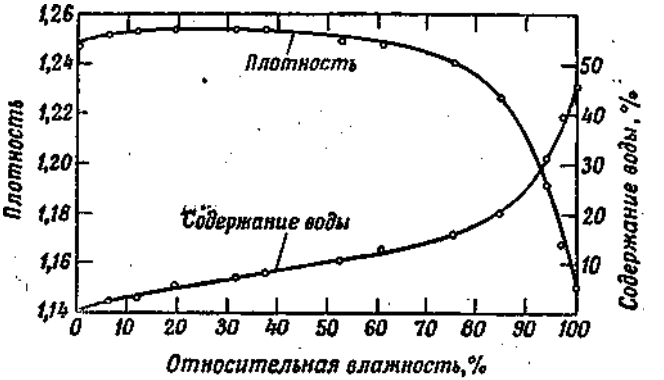
в) Плотность и уменьшение объема при растворении. Чик и Мартин [53] установили, что при растворении казеина и других белков наблюдается уменьшение объема на 5—8%. Уменьшение объема происходит также при растворении аминокислот; при растворении органических соединений, не несущих заряда, наблюдаются лишь незначительные изменения объема. В табл. 72 приведены значения плотностей в твердом состоянии и в растворе для компонентов казеина и β-лактоглобулина. Значения объемов белков в растворе (табл. 72), вычисленные из их аминокислотного состава по методу Кона и Эдсалла [54], находятся в хорошем соответствии с определениями удельных объемов растворов [55]. Это означает, что объем белка в растворе можно рассматривать как сумму объемов составляющих его групп или атомов. Величины объемов в растворе, вычисленные для многих белков по их аминокислотному составу, находятся в хорошем соответствии с наблюдаемыми величинами, хотя и имеются некоторые исключения [56].

Таблица 72

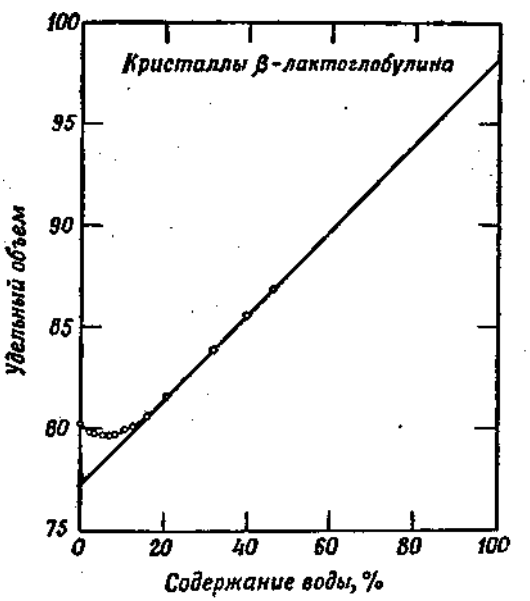
УДЕЛЬНЫЕ ОБЪЕМЫ БЕЛКОВ МОЛОКА В ТВЕРДОМ СОСТОЯНИИ И В РАСТВОРЕ

Белок	В твердом состоянии		В растворе		
	плотность, *г/мл*	удельный объем, *мл/г*	определено, *мл/г*	вычислено из аминокислотного состава, *мл/г*	изменение объема, *мл/г*
Казеин нефракционированный . .	1,292	0,774	0,731	0,731	—0,043
α-Казеин	1,293	0,773	0,728	0,725	—0,045
β-Казеин	1,271	0,787	0,741	0,743	—0,046
γ-Казеин	1,250	0,800	0,750	0,756	—0,050
β-Лактоглобулин	1,247	0,802	0,751	0,746	—0,051

Уменьшение объема белков при переходе их в раствор является весьма постоянной величиной, равной в среднем 0,046 *мл/г*, или приблизительно 6% (табл. 72). Тщательные измерения плотности и содержания воды в больших кристаллах β-лактоглобулина в зависимости от относительной влажности (рис. 66), показали, что объем белка в кристалле, найденный экстраполяцией кривой содержание воды—удельный объем (рис. 67), равен 0,772 *мл/г*, если содержание воды составляет 14—46% по сравнению с 0,751 *мл* в разбавленном растворе и 0,802 *мл* в безводном состоянии (табл. 72) [57]. Если принять, что 0,030 *мл* (0,802—0,772) общего уменьшения объема белка, составляющего 0,051 *мл/г*, представляет собой кажущееся уменьшение, то для электрострикции воды получим величину 0,021 *мл* (0,772—0,751), приблизительно совпадающую с электро-



Р и с. 66. Влияние относительной влажности на содержание воды и плотность кристаллов β-лактоглобулина (по Мак-Микину [57]).



Р и с. 67. Соотношение между удельным объемом и содержанием воды для кристаллов β-лактоглобулина (по Мак-Микину [57]).

стрикцией на 1 *г* белка, которую следует ожидать, исходя из содержания в белке ионных групп. Кажущееся уменьшение объема белка объясняется наличием молекулярных пустот в белке, в которые не проникает органический растворитель, применяемый для

измерения плотности, или упаковочным эффектом, обусловленным электрострикцией воды, когда небольшие ее количества добавляются к безводному белку. β-Лактоглобулин содержит 104 ионные группы на моль белка (40 000 *г*) [58]; вычислено, что каждая пара ионных групп вызывает уменьшение объема, равное 20 *мл* [54]. Следовательно, величина 0,026 *мл/г* белка, найденная для электрострикции на основе этих расчетов, сравнима с величиной 0,021 *мл*, полученной из экспериментальных измерений.

г) Коагуляция казеина нагреванием. При обычных условиях казеин в растворе не коагулирует при нагревании; однако, когда молоко или растворы казеина нагреваются под давлением при температуре выше 100°, происходит коагуляция казеина, сопровождающаяся его распадом. Этот вид коагуляции казеина особенно важен в производстве сгущенного молока. Холм с сотрудниками [59] показали, что продолжительность нагревания, температура, кислотность и концентрация солей являются важными факторами, определяющими коагуляцию в сгущенном молоке. Растворы казеина, приготовленные при добавлении гидроокиси натрия или кальция, коагулируют при нагревании под давлением при 124°. При этом казеин теряет фосфор и частично деградирует. Скоагулированный при нагревании казеин сходен с казеином, из которого обработкой щелочью удален фосфор [61].

4) ФОСФОПЕПТОНЫ ИЗ КАЗЕИНА

Из казеина были получены фосфопептоны, не подвергающиеся действию ферментов. Эти фосфопептоны представляют интерес не только потому, что они составляют небольшую часть молекулы казеина и указывают на характер связи фосфора, но также и потому, что они, как предполагают, играют исключительную роль в питании потомства [1]. Из продуктов переваривания казеина коровьего молока трипсином Постернак [62] впервые изолировал фосфопептон, содержащий 5,9% фосфора, 11,9% азота, глутаминовую и аспарагиновую кислоты, серин и изолейцин. Он рассматривал его как продукт соединения фосфорной кислоты с гидроксильной группой серина. Возможность соединения фосфорной кислоты с серином установил Липманн [63], который изолировал фосфосерин из казеина. Левен и Хилл [64] получили фосфосерилглутаминовую кислоту из фосфопептона. Раймингтон и Кей [65] независимо от указанных выше исследователей изолировали фосфопептон из продуктов переваривания казеина трипсином и нашли, что он содержит 7,05% фосфора и 10,13% азота. Наиболее простой фосфопептон получили Дамодаран и Рамахандран [66] при переваривании казеина пепсином и затем трипсином. Бариевая соль этого фосфопептона содержала 4,34% фосфора и 6,46% азота. Этот фосфопептон содержал три остатка глутамина, три—изолейцина и четыре—серина.

Миллендер [1] получил фосфопептон из продуктов переваривания пепсином и трипсином казеина женского и коровьего молока. Он выделил 50% фосфора, содержащегося в казеине в виде фосфопептона. Бариевая соль фосфопептона, полученного Миллендером из казеина женского молока, содержала 6,3% азота и 4,9% фосфора, тогда как фосфопептон из казеина коровьего молока содержал 7,0% азота и 5,3% фосфора. Николет и Шинн [67] изолировали из казеина фосфопептон, в молекуле которого содержалась одна молекула серина, две—фосфосерина, две—изолейцина и две—глутаминовой кислоты.

Фосфопептоны, полученные из казеина, вероятно, являются смесями. Применение в качестве субстратов α- и β-казеинов упростило бы проблему получения чистого фосфопептона, так как эти компоненты казеина, по-видимому, давали бы различные фосфопептоны; об этом свидетельствуют данные, полученные Перлмен [43], которая показала, что легкость удаления фосфора из этих двух казеинов кислой фосфатазой различна.

5) СВЕРТЫВАНИЕ МОЛОКА И КАЗЕИНА СЫЧУЖНЫМ ФЕРМЕНТОМ

Свертывание молока является одной из наиболее давно известных ферментативных реакций, однако природа изменений, происходящих в казеине при его свертывании сычужным ферментом, все еще неизвестна. Различие между не содержащими кальция препаратами казеина, полученными под действием сычужного фермента и кислоты [28], не установлено, хотя при свертывании казеина всегда получаются небольшие количества небелкового азота. Зависимость между небелковым азотом и свертыванием трудно установить. Согласно Холтеру [68], протеолитическое действие сычужного фермента не имеет большого значения в процессе коагуляции казеина. Давно возникшую проблему отличия протеолитического свойства сычужного фермента от его свертывающего действия, по-видимому, разрешил Берридж [69], который получил сычужный фермент в кристаллическом состоянии и установил, что чистый фермент обладает протеолитическим действием, но оптимум pH для его активности лежит в более щелочной области по сравнению с оптимумом для пепсина.

Для получения кристаллического сычужного фермента [69] в качестве исходного материала применяют свежеприготовленный продажный сычужный препарат. Его очищают осаждением из раствора при насыщении последнего хлористым натрием. После этого производят фракционное осаждение хлористым натрием, наиболее и наименее растворимые фракции отбрасывают. Активность получаемого в результате такой обработки продукта в 8 раз больше активности исходного материала. Продукт обесцвечивают добавлением к раствору 0,1% калиевых квасцов и осаждением гидроокиси

алюминия эквивалентным количеством едкого натра. Черный осадок отбрасывают и сычужный фермент осаждают при 2° из фильтрата добавлением по каплям насыщенного раствора сульфата аммония в течение 3 дней. Полученный при этом раствор осветляют добавлением такого количества хлористого натрия, которое вызывает образование небольшого осадка. Сычужный фермент кристаллизуют из фильтрата при 2° медленным добавлением при помешивании насыщенного раствора сульфата магния в течение 18 час. Последняя порция кристаллов получается при постепенном приливании насыщенного раствора сульфата аммония. Активность полученного таким образом кристаллического сычужного фермента* в 10 раз больше активности исходного материала. Его растворимость в воде крайне мала, а в разбавленных растворах соли не превышает 0,06%. Исследования его растворимости при переменных количественных отношениях белка к растворителю привели к выводу, что кристаллический сычужный фермент гомогенен. Необычным свойством кристаллического сычужного фермента по сравнению с другими ферментами является его устойчивость при сушке, при которой происходит лишь незначительное уменьшение активности фермента.

Нитшманн и Леманн [70] установили, что при действии сычужного фермента на казеин происходит изменение электрофореграммы последнего. Они нагревали казеинат натрия в течение 30 мин. при 35° и pH 6,6 в присутствии сычужного фермента. Электрофореграмма казеина, обработанного этим ферментом, отличалась от электрофореграммы, полученной для раствора того же казеина, обработанного прокипяченным сычужным ферментом, тем, что восходящая граница α-казеина образовывала два пика. При употреблении относительно больших количеств кристаллического сычужного фермента [71] казеин подвергался сильному гидролизу. Время, необходимое для этих гидролитических изменений казеина, значительно превышает время, требуемое для коагуляции, следовательно вопрос о первичном действии сычужного фермента остается нерешенным. Поскольку α- и β-казеин свертываются сычужным ферментом [38], а γ-казеин не образует устойчивых суспензий казеината кальция, любая теория свертывания, основанная на изучении действия сычужного фермента на один из компонентов казеина [34, 70], очевидно, не может быть точной.

Установлено, что для коагуляции молока необходимо наличие в нем ионов кальция или родственных ему ионов. Согласно Хаммарстену ионы кальция коагулируют казеин после действия на него сычужного фермента. Однако Ландстин [72] наблюдал свертывание не содержащего кальция казеина, растворенного в цитратном буфере при pH 5,4. Установлено, что при этом значении pH параказеин менее растворим, чем казеин; по мере образования параказеина

* Этот фермент называют также реннином или химозином.—*Прим. ред.*

происходит его коагуляция. Для проведения этих исследований по свертыванию применялся препарат казеина K_0, полученный по методу Линдерштрём-Ланга [34].

6) КАЗЕИН ИЗ МОЛОКА РАЗЛИЧНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В более ранних исследованиях указывалось, что состав казеина, полученного из молока различных млекопитающих, одинаков или различается незначительно. Иммунологически доказано, что казеины, имеющие различное видовое происхождение, весьма сходны между собой [73]. Однако по мере совершенствования методов определения аминокислотного состава были обнаружены различия для казеинов, полученных из молока животных разных видов. Неидентичность казеинов различного происхождения была также установлена электрофоретическими методами анализа. Казеин женского молока, как и казеин коровьего молока, содержит α- и β-компоненты. Однако изучение влияния изменения pH на подвижность и распределение компонентов этих казеинов различного происхождения указывает на различие их химического состава. Довей и Кэмпбелл [74] нашли, что казеин из козьего молока состоит из равных количеств α- и β-компонентов, в казеине кроличьего молока содержится 11% β-компонента, в казеине коровьего молока—84% α-компонента и 16% β-компонента. Каждый из этих казеинов содержит небольшое количество γ-казеина. Подвижности компонентов казеина также различаются в зависимости от вида животного.

Б. Белки молочной сыворотки

Молочную сыворотку получают, осаждая казеин кислотой или свертывая его сычужным ферментом. Концентрация белков в сыворотке значительно изменяется в зависимости от вида животного; в сыворотке коровьего молока она равна 0,6% (см. табл. 68). В табл. 69 указаны главные компоненты и их относительные количества, найденные при помощи электрофоретического анализа. Однако в сыворотке содержатся в незначительных количествах многочисленные белки, например ферменты, которые не обнаруживаются на электрофореграммах сыворотки. Белки сыворотки по растворимости их в насыщенном растворе сульфата аммония делятся на глобулиновую и альбуминовую фракции.

1) ГЛОБУЛИНОВАЯ ФРАКЦИЯ

После опубликования работы Себелье [75] получение глобулина молока насыщением последнего сульфатом магния стало классическим методом. Установлено, что глобулин молока, подобно

глобулину крови, можно разделить диализом на эуглобулин и псевдоглобулин [76]. Как показал Смит [11, 77], глобулин сыворотки, осажденный сульфатом магния, представляет собой сложную смесь. Смит разработал метод получения электрофоретически гомогенного глобулина посредством фракционирования сульфатом аммония. По этому методу сырую глобулиновую фракцию осаждают добавлением сульфата аммония до 50% насыщения. Осадок растворяют и переосаждают при pH 4,6 добавлением сульфата аммония до 25% насыщения. Этот осадок, содержащий некоторое количество казеина, отбрасывают, и глобулиновую фракцию осаждают из фильтрата при pH 6,0 добавлением сульфата аммония до 40% насыщения. Для удаления нерастворимого остатка материал, осажденный при 40% насыщения, растворяют в воде при 1° и pH раствора доводят до 4,5. Белок в надосадочной жидкости подвергается фракционному осаждению при 30 и 40% насыщения сульфатом аммония. Обе эти фракции, по-видимому, электрофоретически гомогенны и имеют подвижность от —1,7 до —2,5 *u* при pH 8,4. Этот глобулин Смит [77] назвал иммунным лактоглобулином, так как он содержит антитела. Глобулин с подвижностью $u=-3{,}6$, составляющий 18% белков сыворотки, в чистом состоянии не получен.

а) Глобулин молозива. Молоко в первые дни после родов заметно отличается от нормального молока и называется молозивом. Концентрация в нем белков и витаминов особенно высока, и оно имеет важное значение для нормального развития потомства, как это установлено многими исследованиями [78]. При отеле общая концентрация белка в коровьем молозиве достигает 16,3 *г* на 100 *г* секрета [4], из них 5 *г* составляет казеин и 11,3 *г*—альбумин и глобулин. Эта высокая концентрация белка быстро снижается в первые 24 часа, и обычно молоко приобретает нормальный состав спустя 10 дней после отела. Наиболее отличительным свойством молозива является высокое содержание в нем иммунного глобулина (глобулин молозива).

Хоув [79], применяя метод солевого фракционирования, показал, что сыворотка крови новорожденного теленка, взятая до сосания, бедна глобулином; последний появляется в сыворотке теленка после кормления его молозивом. Это наблюдение было подтверждено многими исследователями на других видах животных [77, 80—84]. Электрофореграммы сыворотки крови новорожденного теленка при кормлении молозивом показаны на рис. 68. Появление компонента с малой подвижностью, или γ-глобулина, в сыворотке крови новорожденного теленка наблюдается только после кормления его молозивом. Однако спустя более 24 час. после рождения теленка при кормлении его молозивом в сыворотке крови не происходит заметного увеличения γ-глобулина. Это может быть связано с секрецией протеолитических ферментов в пищеварительном тракте теленка в течение этого периода или с изменением проницаемости кишечника.

На важное значение молозива в питании теленка указали Смит и Литтл [78], установившие, что процент выживающих телят при кормлении молозивом больше, чем в том случае, когда они лишены молозива и кормятся молоком. Отсюда они сделали вывод, что молозиво защищает молодых животных от микроорганизмов, безопасных только в более позднем периоде жизни. Приблизительно в то же время Оркэт и Хоув [85] показали, что естественные агглютатины против *Brucella abortus* переходят от коровы к ее теленку с глобулинами молозива.

Каттнер и Ретнер [86] установили, что для человека молозиво не имеет такого важного значения, как для животных. Они нашли, что кровь младенцев, которые не были иммунизированы к дифтерии, не содержит антитоксина. Кровь детей от иммунизированных матерей даже до того, как их стали кормить молозивом, содержит столько же антитоксина, сколько его содержит материнская кровь. Эти авторы полагают, что женская плацента играет важную роль в переносе антител от матери к ребенку.

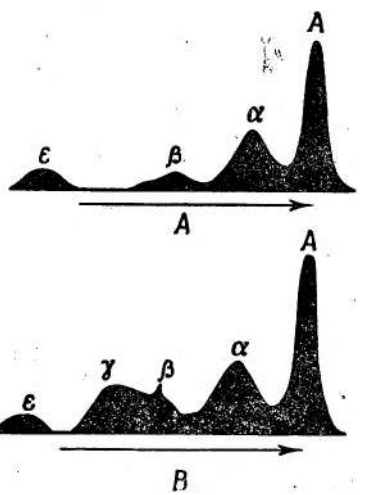


Рис. 68. Электрофореграммы сыворотки крови новорожденного теленка.

A—до кормления молозивом; *B*—после 24 час. кормления молозивом. Опыты проводились в течение 120 мин. в цитратно-барбитуратном буфере при pH 8,6 (по Гансену и Филлипсу [82]).

В более ранних исследованиях было показано, что молозиво содержит три главных белковых компонента. Кроузер и Райстрик [76] установили, что казеин, лактоглобулин и лактоальбумин являются характерными белками и обладают одинаковым составом независимо от того, получены они из молозива или из нормального молока. Эти авторы также показали, что глобулин молозива в небольших количествах встречается и в нормальном молоке.

Выдающиеся исследования белков молозива принадлежат Смиту [11, 17, 77, 87]. На рис. 69 представлены результаты электрофоретического изучения цельного молозива и отдельных фракций, полученных методом осаждения. Смит получил из молозива электрофоретически чистый глобулин с большим выходом путем осаждения сульфатом аммония по способу, аналогичному применяемому для выделения глобулина из нормальной сыворотки (см. подпись под рис. 69). Тщательным диализом глобулин молозива можно разделить на две фракции: нерастворимый в воде эуглобулин и растворимый в воде псевдоглобулин. Подвижность эуглобулина в вероналовом

буфере при pH 8,5 и ионной силе 0,1 равна —1,9 *u*, тогда как подвижность псевдоглобулина при тех же условиях равна —2,2 *u*. Обе фракции обладают иммунной активностью. Молекулярный вес глобулина молозива, определенный при помощи ультрацентрифуги, оказался равным ~160 000—190 000.

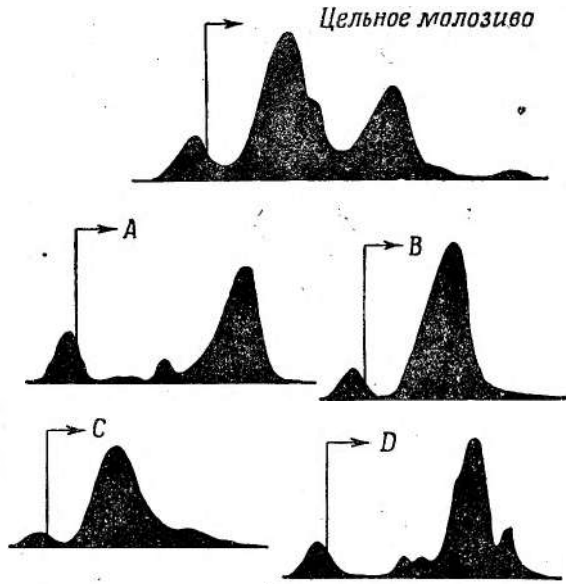


Рис. 69. Нисходящие границы электрофореграмм цельного молозива и полученных из него фракций.

A—казеин; *B*, *C*, *D*—фракции, полученные при добавлении сульфата аммония] при насыщении 0—0,3 (*B*), 0,3—0,5 (*C*) и 0,5—0,9 (*D*). Фракция *B* состоит полностью из иммунного глобулина: фракция *C*—в основном из этого белка. Главным компонентом фракции *D* является β-лактоглобулин, который может быть получен в кристаллической форме. Электрофорез проводился в течение 200 мин. в вероналовом буфере при pH 8,3—8,4 и ионной силе 0,1 (по Смиту [17]).

Лясковский и Лясковский мл. [88] обнаружили в молозиве относительно большие количества ингибитора трипсина. Следы последнего содержатся также в сливках, но его концентрация в молозиве во много раз больше. Ингибитор трипсина из молозива был очищен и получен в кристаллическом состоянии методом, аналогичным разработанному для очистки ингибитора трипсина из сока поджелудочной железы.

После разбавления молозива равным объемом воды основные белки удаляли трихлоруксусной кислотой, взятой в таком количестве, чтобы ее концентрация в растворе составляла 2,5%, с после-

дующим нагреванием до 80° в течение 5 мин. Образующийся при этом плотный осадок удаляли фильтрованием, и ингибитор трипсина осаждали при 80% насыщения фильтрата твердым сульфатом аммония. Осадок отфильтровывали и фильтрат отбрасывали. Осадок растворяли в воде, а инертный материал удаляли повторным осаждением в 2,5-процентной трихлоруксусной кислоте при 80°, после чего ингибитор трипсина вновь осаждали при 80% насыщения фильтрата сульфатом аммония. Осадок растворяли в воде, и к раствору добавляли сульфат аммония до 30% насыщения. Вещество, нерастворимое в 30-процентном растворе сульфата аммония, отбрасывали, а ингибитор трипсина вновь осаждали из фильтрата при 80% насыщения последнего сульфатом аммония. Осадок растворяли в воде, к раствору добавляли трихлоруксусную кислоту в таком количестве, чтобы ее концентрация составляла 2,5%, после чего раствор экстрагировали эфиром в делительной воронке. К водному слою добавляли сульфат аммония до 30% насыщения, при этом ингибитор трипсина переходил в осадок. Дальнейшую очистку материала производили добавлением к раствору, не содержащему соли, равного объема метилового спирта при pH 5,5 и —18°. Образующийся при этом нерастворимый материал отделяли центрифугированием и отбрасывали. К надосадочной жидкости добавляли четырехкратный по сравнению с прежним объем метилового спирта. Полученный при этом осадок применяли для получения соединения трипсин—ингибитор трипсина. Для этого к растворенному в воде осадку добавляли вычисленное количество кристаллического трипсина, растворенного в небольшом объеме 0,0025 н. соляной кислоты. При помощи боратного буфера pH раствора доводили до 8,0. После охлаждения раствора до 2° его pH доводили до 5,5; образующийся при этом осадок отбрасывали. К раствору добавляли сульфат аммония до 50% насыщения и несколько кристалликов соединения трипсина с ингибитором трипсина в качестве затравки. Кристаллизация происходила при комнатной температуре. Свободный ингибитор трипсина получали из его комплексного соединения с трипсином путем осаждения последнего из раствора, содержащего 5% трихлоруксусной кислоты. Ингибитор осаждали из фильтрата добавлением к последнему сульфата аммония до 80% насыщения. В кристаллической форме ингибитор получали из раствора при 50% насыщения сульфатом аммония при pH 5,5.

Ингибитор трипсина, полученный из молозива, отличается от ингибитора, выделенного из сока поджелудочной железы, электрофоретической подвижностью, изоэлектрической точкой [89] (рис. 70), а также активностью на единицу веса и аминокислотным составом. Молекулярный вес комплекса трипсин-ингибитор из молозива, найденный по измерениям светорассеяния, оказался равным 89 000, тогда как молекулярный вес комплекса трипсин-ингибитор из сока поджелудочной железы равен 36 000.

Предполагают, что функция ингибитора трипсина в молозиве заключается в предотвращении гидролиза иммунных белков, находящихся в пищеварительном тракте [88]. Известно, что иммунный глобулин не поступает в кровоток теленка, если кормление молозивом начато спустя 24 часа с момента его рождения [82]. Это показывает, что наличие ингибитора трипсина в молозиве не является существенно важным для поступления иммунного глобулина в кровоток теленка.

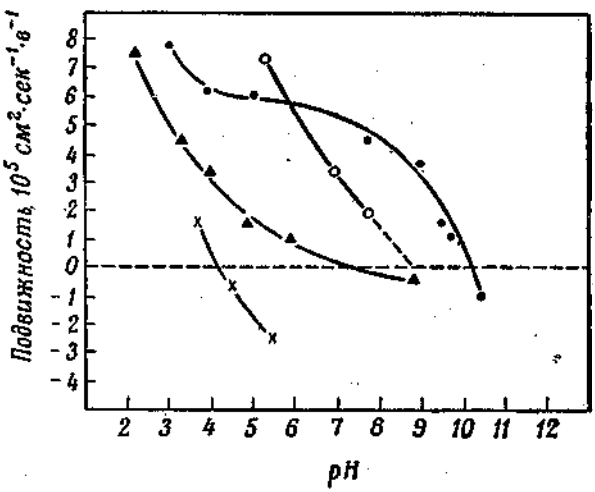


Рис 70. Кривые зависимости подвижности от pH ингибитора трипсина и его комплексов, полученных из молозива и сока поджелудочной железы.

● комплекс из сока поджелудочной железы; ▲ комплекс из молозива; ○ ингибитор из сока поджелудочной железы; × ингибитор из молозива (по Лясковскому [89]).

Имеются важные доводы в пользу происхождения иммунного глобулина молозива из кровотока [11]. Однако было показано, что молозиво содержит много плазменных клеток и что между их числом и концентрацией иммунных тел существует определенная связь [90]. Было также обнаружено, что плазмоцитоз и увеличение иммунных тел можно вызвать прекращением доения. Комлин с сотрудниками [91] установил, что глобулин молозива поступает в общий кровоток из лимфатической системы, но не из системы воротной вены.

2) «АЛЬБУМИНОВАЯ» ФРАКЦИЯ

При изучении распределения белков молока белки молочной сыворотки, растворимые в насыщенном растворе сульфата магния или полунасыщенном растворе сульфата аммония, обычно называют

альбуминовой фракцией. Из этой фракции Вихманн [92] получил в 1899 г. кристаллический лактальбумин. Позже лактальбумин по методу Вихманна был получен Сьёгреном и Сведбергом [93]. Полученный препарат был гетерогенным в отношении размеров молекул; величины молекулярных весов распределялись в области значений 12 000—25 000. Педерсен [13] нашел, что сыворотка молока содержит три компонента, которые он обозначил как α, β и γ; соответствующие им константы седиментации s_{20} равны 1,9; 3,1 и 7,1. α-Компонент был идентифицирован с кристаллической фракцией, полученной Кеквиком (неопубликованная работа). На основе этих данных Сведберг [94] рассчитал молекулярный вес α-компонента, который оказался равным 17 600, и назвал этот белок α-лактальбумином.

В 1939 г. Зёренсен М. и Зёренсен С. [95] изолировали из альбуминовой фракции сыворотки молока кристаллический белок, который они назвали «кристаллическим нерастворимым веществом». Нерастворимое вещество в кристаллической форме, получаемое из растворов сульфата аммония, по-видимому, идентично с кристаллическим β-лактоглобулином, но отличается от последнего нерастворимостью в разбавленных растворах соли и содержанием триптофана. Этот, очевидно, новый белок молока в дальнейшем не изучался, и его наличие в сыворотке молока не является общепризнанным. Такой белок отличается от белка, изолированного Вихманном [92], тем, что он нерастворим в воде при pH 4,6.

Недавно Гордон и Симметт [96] методом, аналогичным методу Зёренсена, получили из сыворотки молока нерастворимое в воде кристаллическое вещество, которое подтвердило многие наблюдения Зёренсена. Кристаллический белок, изолированный Гордоном и Симметом, имел подвижность —4,2 *и* в вероналовом буфере с pH 8,5 и ионной силой 0,1 [14]. Миллер [14] определил молекулярный вес этого белка и нашел, что он гомогенен при ультрацентрифугировании. Миллер установил также, что молекулярные константы этого белка аналогичны константам, найденным Педерсеном [13] для лактальбумина, изолированного Кеквиком. Изучение седиментации и диффузии производилось при концентрации белка, равной 1%, в буферном растворе с pH 7,5, в котором ионная сила NaCl равнялась 0,18, а фосфата — 0,02. При этом было установлено, что константа седиментации и константа диффузии равны: $s_{20}=1{,}75$, $D_{20}=10{,}6\cdot10^{-7}$. На основании этих данных были вычислены молекулярный вес и парциальный удельный объем сывороточного белка, изолированного Гордоном и Симметом; они оказались равными 15 000 и 0,735. Несомненно, белок, полученный Гордоном и Симметом, является главным компонентом сыворотки молока, как это показано в табл. 69, и представляет собой белок, описанный Педерсеном [13] как α-компонент сыворотки молока с константой седи-

ментации $s_{20}=1{,}9$. Этот белок нерастворим в воде и, по-видимому, имеет такой же молекулярный вес, как α-компонент сыворотки молока по Педерсену; поэтому его следует рассматривать как глобулин, а не как альбумин, который должен был бы растворяться в воде при изоэлектрической точке. Однако этот белок нерастворим в растворе соли, что отличает его от глобулина. Белок сыворотки молока, растворимый в насыщенном растворе сульфата магния и коагулируемый при нагревании, описанный почти во всех работах как лактальбумин, не имеет отношения к белку с молекулярным весом 15 000; это дает повод дать другое название кристаллическому белку. Компонент сыворотки молока, имеющий константу седиментации $s_{20}=1{,}75$, по предложению Сведберга [94], назвали α-лактальбумином.

а) Получение α-лактальбумина. После усовершенствования Гордоном и Симметтом их метода выделения α-лактальбумина получение чистого белка не вызывает особых трудностей. По их методу казеин осаждают из снятого молока подкислением обычным способом. Фракцию сыворотки молока, нерастворимую в 2,3 *М* сульфате аммония при pH 6, удаляют фильтрованием. Остаток общего белка сыворотки осаждают из фильтрата добавлением такого количества твердого сульфата аммония, чтобы его концентрация в растворе составляла 3,3 *М*. После фильтрования осадок белка растворяют в воде и подвергают диализу для удаления соли при pH 5,2. При этих условиях β-лактоглобулин кристаллизуется и его отделяют центрифугированием. Белок в надосадочной жидкости осаждается при добавлении твердого сульфата аммония до достижения 3,3 *М* концентрации. Осажденный белок отделяют фильтрованием, растворяют в воде и снова подвергают диализу при pH 5,2. Осадок, появляющийся после продолжительного диализа, состоит из загрязненного α-лактальбумина и небольшой примеси β-лактоглобулина; его экстрагируют небольшими количествами 0,1 *М* раствора хлористого натрия; при этом β-лактоглобулин растворяется, а α-лактальбумин остается в осадке. Полученный осадок отделяют центрифугированием, растворяют в 0,03 н. растворе гидроокиси аммония, и раствор фильтруют. Фильтрат подкисляют 0,1 н. раствором серной кислоты до pH 4,0. Осаждающийся при этом α-лактальбумин отделяют центрифугированием и вновь растворяют в гидроокиси аммония; pH раствора доводят до 6,6, и к прозрачному раствору по каплям, при помешивании добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, pH которого доведен до значения 6,6. Аморфный осадок, образующийся в полунасыщенном растворе сульфата аммония, отделяют центрифугированием. В надосадочную жидкость, как и прежде, добавляют насыщенный раствор сульфата аммония; когда концентрация соли достигает 60% насыщения, начинается кристаллизация α-лактальбумина, которая заканчивается при $^2/_3$ насыщения.

α-Лактальбумин, кристаллизующийся при pH 6,6, легко растворяется в воде, но когда pH раствора достигает значения 4,6, белок осаждается в аморфном состоянии. Однако его можно перекристаллизовать из разбавленного раствора аммиака высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония при pH 6,6. Приготовленный этим методом α-лактальбумин содержит 15,86% азота, 1,91% серы и следы фосфора. Содержание в нем триптофана, равное 7,2%, необычно высоко для белков молока. При pH 6,8 оптическое вращение его $[\alpha]_D^{25} = -61°$. Метод для кристаллизации α-лактальбумина из воды при pH 4,6 пока не разработан.

3) ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СВОЙСТВА β-ЛАКТОГЛОБУЛИНА

Пальмер [15], пытаясь получить кристаллический лактальбумин рассмотренными выше методами, подверг диализу водный солевой раствор; при этом он изолировал главный белок молочной сыворотки в виде больших кристаллов. Метод выделения β-лактоглобулина из молока рассмотрен в разделе, относящемся к получению α-лактальбумина. Константа седиментации β-лактоглобулина s_{20}, равная 3,1, идентична с константой седиментации β-компонента молочной сыворотки, который описал Педерсен; он же определил изоэлектрическую точку этого компонента, которая оказалась равной 5,2 [97].

Пальмер [15] определил растворимость β-лактоглобулина в воде, разбавленном растворе NaCl и в концентрированном растворе сульфата аммония. Он установил, что увеличение количества твердой фазы в 4 раза не изменяет растворимости, что указывает на чистоту этого белка. При дальнейшем изучении растворимости β-лактоглобулина Зёренсен и Пальмер [98] нашли, что изменение количества твердой фазы в 3 раза изменяет растворимость не более чем на 1%. Эти результаты по растворимости, а также легкость получения больших кристаллов и другие специфические свойства β-лактоглобулина явились поводом для широкого использования его в различных исследованиях. Кроуфут [99] рентгенографически определила структуру его кристаллов и элементарную ячейку. Допуская, что в элементарной ячейке находятся 8 молекул, она рассчитала молекулярный вес воздушно-сухого β-лактоглобулина, который оказался равным 40 000; это значение хорошо совпадает с величиной 39 000, найденной Педерсеном [97] для молекулярного веса этого белка. По данным Кроуфут был вычислен молекулярный вес безводного белка, который оказался равным 35 800; при этом было принято, что воздушно-сухие кристаллы содержат 9,78% воды [101]. Сенти и Уорнер [102] на основании рентгенографических данных получили для молекулярного веса β-лактоглобулина значение 35 400, которое находится в соответствии со значением, найденным осмометрическим методом Буллом и Кюри [103], и значением

35 700, найденным из измерений светорассеяния Халвером, Наттингом и Брайсом [104]. Сесил и Огстон [105], а также Миллер и Гольдер [106] по величине константы седементации определили молекулярный вес β-лактоглобулина равным 35 400. Приведенные данные позволяют сделать вполне достоверный вывод, что молекулярный вес β-лактоглобулина составляет приблизительно 35 000.

Мак-Микин и Уорнер [101] определили плотность и содержание воды для отдельных больших (5—15 *мг*) кристаллов β-лактоглобулина. Плотность они определяли методом флотации в органических жидкостях, имеющих подходящие для этой цели удельные веса, в которых кристаллы белка не растворялись. Значения плотности 1,114—1,115, полученные этим методом для кристаллов β-лактоглобулина белка, значительно расходятся с принятыми ранее значениями 1,26—1,27 [54]. Более высокое значение для плотности — 1,26 было найдено из измерений, при которых кристалл находился в равновесии с растворами соли и сахарозы. Было установлено, что более высокое значение для плотности кристаллов β-лактоглобулина, суспендированных в этих растворах, правильно, так как соль или сахароза, проникая в белковый кристалл, делают его более плотным. Вычисления, проведенные на основе данных о содержании воды в белковом кристалле, показали, что концентрация соли в кристалле составляет приблизительно $^2/_3$ концентрации ее в среде, в которой суспендирован белок. Точные, более низкие значения плотности для кристаллов β-лактоглобулина, полученные из измерений в органических жидкостях, использовались для определения молекулярного веса β-лактоглобулина по данным рентгенографического анализа [100].

Содержание воды в белковом кристалле также является существенным для определения молекулярного веса по рентгенографическим данным. Содержание воды в кристаллах β-лактоглобулина определяли по потере веса. Отдельные кристаллы выделяли из надосадочной жидкости, и жидкость, находящуюся на их поверхности, удаляли фильтровальной бумагой. Определяли потери веса кристалла как функцию времени; вес кристалла в момент его извлечения из жидкости, в которой он был суспендирован, находили экстраполяцией, как показано на рис. 71. Содержание воды в кристалле определяли вычитанием веса кристалла, высушенного при 70° в вакууме, из веса кристалла в момент удаления его из жидкости. Таким образом было найдено, что кристаллы β-лактоглобулина содержат 46% воды. Установлено, что скорость потери воды кристаллом на воздухе следует уравнению первого порядка (до тех пор пока потеря воды не достигнет 70%), будучи пропорциональна логарифму веса воды, остающейся в кристалле (см. рис. 71). Это указывает на то, что давление паров воды кристалла не изменяется, пока не будет потеряна основная масса воды. Эти данные находятся в соответствии с результатами, представленными на рис. 67, из которых

следует, что удельный объем кристалла пропорционален содержанию воды, если последнее находится в пределах 14—46%. Содержанию воды в кристаллах β-лактоглобулина, найденному непосредственным измерением и равному 46%, соответствует значение, равное 20%, вычисленное непрямым методом по Зёренсену и Хёйрупу [107], основанным на сопоставлении концентрации соли и воды в кристалле с их содержанием в среде, в которой взвешен кристалл.

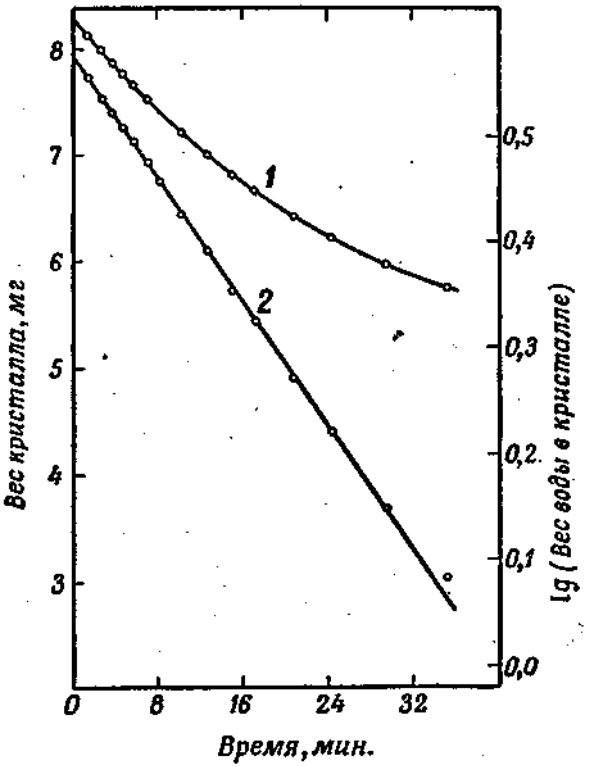
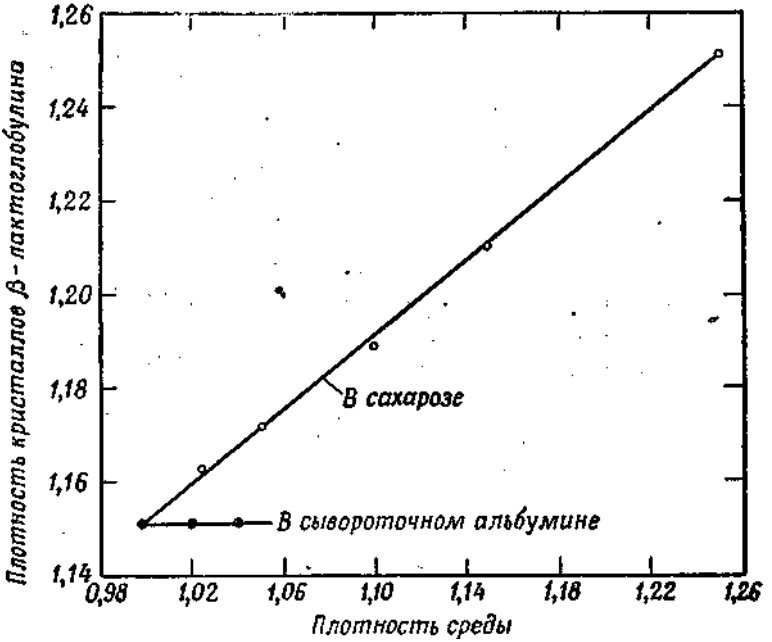


Рис. 71. Скорость потери воды кристаллами β-лактоглобулина при комнатной температуре (по Мак-Микину и Уорнеру [101]).
1—потери веса кристалла как функция времени; 2—логарифм веса воды в том же кристалле.

Перутц [108], определяя содержание соли в кристаллах белка, взвешенных в солевых растворах, пришел к выводу, что в кристалле белка находится вода двух видов. Однако имеются данные, указывающие на то, что часть соли, содержащаяся в кристалле белка, соединена с белком [109].

Была установлена связь между составом и плотностью кристаллов β-лактоглобулина и аналогичными свойствами растворов сахарозы, применявшимися в качестве флотирующей среды [110]. Растворимость β-лактоглобулина в растворах сахарозы невелика и не оказывает влияния на эти измерения. Для сравнения определяли также плотность кристаллов β-лактоглобулина, находящихся в равновесии с растворами сывороточного альбумина. Плотность определяли в смесях бромбензол—ксилол после установления равновесия между кристаллами белка и флотирующей средой.



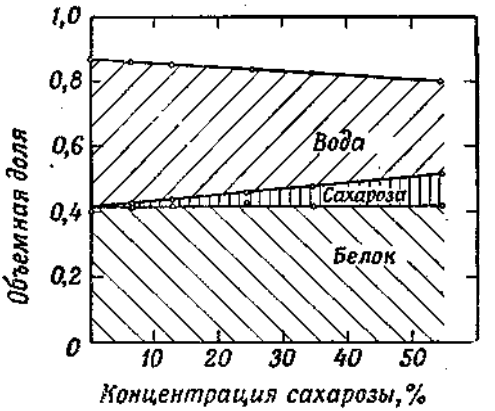
Р и с. 72. Плотность кристаллов β-лактоглобулина, находящихся в равновесии с растворами сахарозы и сывороточного альбумина (по Мак-Микину [110]).

Найдено, что плотность кристалла белка пропорциональна плотности флотирующего раствора сахарозы; для растворов сывороточного альбумина такого эффекта не обнаружено (рис. 72). На рис. 73 представлена зависимость между составом кристалла белка, суспендированного в растворе сахарозы, и концентрацией сахарозы. Из рис. 73 видно, что между количеством сахарозы и воды в кристалле белка имеется обратная зависимость. Однако общий объем кристалла уменьшается с увеличением концентрации сахарозы вследствие потери воды, объем которой не возмещается объемом сахарозы.

Шахманн и Лауффер [111] установили аналогию между плот-

ностью кристаллов β-лактоглобулина и скоростью седиментации вируса мозаики табака в растворах сахарозы, на основании чего был сделан вывод, что окружающая среда воздействует на белки, находящиеся в растворе, так же как и на кристаллы белка [110].

Соединение β-лактоглобулина с кислотами и основаниями, как и кривая его диссоциации, в литературе рассмотрены очень подробно [58, 112]. Кривая диссоциации выражает связь между pH раствора белка и количеством кислоты или щелочи, связанной с белком (рис. 74). Важными факторами, определяющими диссоциацию белка, являются температура и концентрации белка и соли. Анализ кривой диссоциации β-лактоглобулина показал, что в молекуле (молекулярный вес 40 000) этого белка содержится 58 карбоксильных, 34 амино-, 6 имидозольных и 6 гуанидиновых групп. На основании аминокислотного состава [113] было установлено, что в молекуле β-лактоглобулина содержится 48 катионных и 64 анионных групп, что находится в хорошем соответствии с данными титрования.



Р и с. 73. Объемные доли сахарозы, белка и воды в кристаллах β-лактоглобулина, находящихся в растворах сахарозы различной концентрации (по Мак-Микину [110]).

Грёнвал [114] установил, что растворимость β-лактоглобулина в разбавленном растворе соли изменяется в зависимости от метода его приготовления. В соответствии с данными Пальмера, растворимость увеличивается не более чем на 1% при увеличении количества твердой фазы в несколько раз. Недостатком этих измерений растворимости как критерия чистоты белка является применение большого избытка твердой фазы и отсутствие указаний на то, что полученные значения растворимости являются равновесными величинами. Тот факт, что разные препараты β-лактоглобулина имеют неодинаковые растворимости, указывает на неидентичность этих препаратов. Ли [115], проводивший электрофорез в ацетатном буфере при значениях pH 4,8 и 6,5 и ионной силе 0,1, показал, что β-лактоглобулин состоит из трех компонентов. При фракционировании β-лактоглобулина посредством диализа его растворов в ацетатных буферах при различных значениях pH получаются кристаллические препараты, имеющие неодинаковый электрофоретический состав, определяемый при pH 4,7 [116]. Растворимость этих фракций в воде и разбавлен-

ном растворе соли изменяется в соответствии с электрофоретическим составом. В результате дальнейшего фракционирования β-лактоглобулина спиртом при низких температурах был получен кристаллический препарат, который состоял только из одного электрофоретического компонента при всех изученных условиях [117]. Электрофоретически гомогенный β-лактоглобулин отличается от обычного

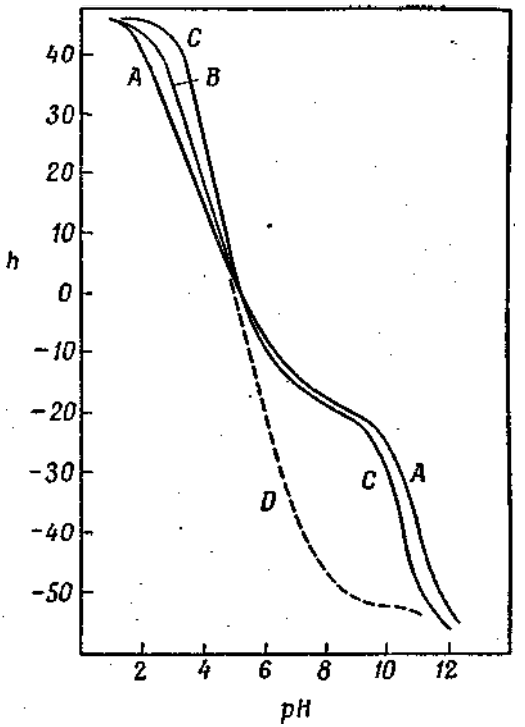


Рис. 74. Кривые диссоциации β-лактоглобулина.

A—хлористый калий 0,019 *M*, белок 0,5%; *B*—хлористый калий 0,135 *M*, белок 0,5%; *C*—хлористый калий 0,67 *M*, белок 0,5%; *D*—формальдегид 1 *M*, белок 2% (по Кеннену [112]).

β-лактоглобулина только растворимостью и электрофоретической подвижностью; различия в аминокислотном составе, молекулярном весе и оптическом вращении не обнаружены. В литературе [118] имеются исчерпывающие сравнительные данные об амидном азоте различных образцов β-лактоглобулина. На молекулу белка (молекулярный вес 42 000) приходится 32,5 амидной группы, как это было найдено для двух препаратов β-лактоглобулина, полученных разными методами. Это число находится в соответствии с общепри-

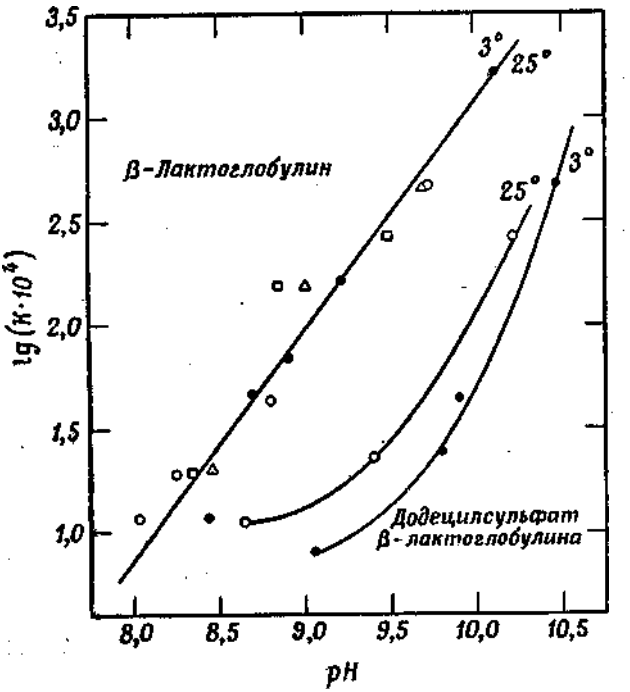
нятым значением, хотя оно значительно ниже величины 34,6, полученной ранее в той же лаборатории [119].

β-Лактоглобулин, как и сывороточный альбумин, обладает способностью связывать в растворах жирные кислоты и другие небольшие молекулы [120]. Было изолировано кристаллическое соединение β-лактоглобулина с двумя эквивалентами додецилсульфата [121]. Это производное, по-видимому, находится в растворе в недиссоциированном состоянии, так как ионы бария не осаждают додецилсульфат. Растворимость этого производного в воде и разбавленном растворе приблизительно в 2 раза меньше растворимости β-лактоглобулина.

Скорость денатурации β-лактоглобулина определяли при различных условиях. Как показали определения электрофоретических подвижностей, тепловая денатурация β-лактоглобулина в буферном растворе при pH 7,0 и ионной силе 0,1 слагается по меньшей мере из двух процессов [122]. Первый процесс, начинающийся только при температуре выше 65°, сопровождается увеличением частичного веса в 4 раза, как было установлено определением констант диффузии и седиментации. Второй процесс, происходящий только после окончания первого процесса, сопровождается заметным увеличением электрофоретической подвижности и протекает в соответствии с уравнением реакции второго порядка. Второй процесс подавляется при 75° и не происходит при 99°.

Найдено, что денатурация β-лактоглобулина в 38-процентном растворе мочевины, измеренная по степени нерастворимости белка в растворе соли в изоэлектрической точке, имеет высокий отрицательный температурный коэффициент; скорость такой денатурации при 0° больше, чем при 37° [123]. Обращение денатурации, происходящей в растворе мочевины при 0°, протекает быстрее, если температура повышается до 37°. Линдерштрём-Ланг [124] показал, что при гидролизе β-лактоглобулина трипсином процессу гидролиза предшествует денатурация. При гидролитическом расщеплении трипсином первых пептидных связей β-лактоглобулина наблюдалось очень значительное уменьшение объема раствора. Предполагалось, что это изменение связано с разрушением белковой структуры. При дальнейшем гидролизе уменьшение объема составляет 20 $см^3$ на расщепленную пептидную связь; такое же уменьшение объема установлено и для синтетических пептидов. Влияние температуры на денатурацию β-лактоглобулина в растворах мочевины изучали также по изменению оптического вращения, происходящему при этом [125]. При изучении денатурации в растворах мочевины было установлено различие между обратимой денатурацией с отрицательным температурным коэффициентом и необратимой денатурацией, температурный коэффициент которой положителен. Необратимая стадия процесса связана с окислением сульфгидрильных групп, открывающихся на обратимой стадии денатурации [125]. Было

показано также, что трипсин производит быструю денатурацию β-лактоглобулина при pH 9,3 в отсутствие мочевины. Скорость денатурации β-лактоглобулина была одинаковой при 3 и 25° в пределах pH от 8,0 до 10,0, как это видно из рис. 75 [126]. При этих



Р и с. 75. Сравнение влияния pH и температуры на константу скорости денатурации β-лактоглобулина и додецилсульфата β-лактоглобулина.

□ борат при 25°; △ борат при 3°; ○ веронал при 25°; ● веронал при 3° (по Гровсу [126]).

условиях скорость денатурации обратно пропорциональна 1,1-й степени концентрации водородных ионов. Однако денатурация β-лактоглобулина, содержащего 2 молекулы додецилсульфата, при тех же значениях pH происходила значительно медленнее, чем денатурация β-лактоглобулина. При этом скорость денатурации при 25° была больше, чем при 3°.

4. АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ МОЛОКА

В табл. 73 представлены современные данные по аминокислотному составу белков молока. Данные аминокислотного анализа общей

Таблица 73

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ МОЛОКА

(в *г* на 100 *г* белка)

Компонент	Казеин женского молока [4]	Казеин[а] коровьего молока [49]	β-Лактоглобулин коровьего молока	Глобулин коровьего молозива	Иммунный глобулин коровьего молока
Общий N	14,89	15,63	15,60[б]	15,63 [17]	15,67[в] [11]
Общая S	0,88	0,76 [1]	1,60[б]	1,1 [128]	1,00[в,г]
Общий P	0,57	0,86			
Аминный N	—	0,93	1,24[б]	—	—
Амидный N	—	1,6	1,07[б]	—	—
Глицин	0,0	2,0	1,4[б]	—	—
Аланин	2,0	3,2	7,4 [127]	—	—
Валин	5,0	7,2	5,8[б]	10,2 [17]	9,6[г]
Лейцин	12,2	9,2	15,6[б]	8,9 [17]	9,6[г]
Изолейцин	6,3	6,1	6,1 [87]	2,77[в]	3,03[в,г]
Пролин	8,9	10,6	4,1[б]	10,0 [128]	
Фенилаланин	5,8	5,0	3,5[б]	3,6 [17]	3,88[г]
Цистеин			1,11[б]		
Цистин	0,64	0,34	2,29[б]	3,26[г]	3,15[в,г]
Метионин	2,4	2,8	3,22[б]	0,89[г]	0,90[в,г]
Триптофан	1,4	1,7[д]	1,94[б]	2,74 [17]	2,70[г]
Аргинин	3,4	4,1	2,88[б]	4,36[г]	4,05[в,г]
Гистидин	1,8	3,1	1,58[б]	1,99[г]	2,05[в,г]
Лизин	5,4	8,2	11,4[б]	6,3[г]	6,8[в,г]
Аспарагиновая кислота	4,6	7,1	11,4[б]	9,4 [128]	—
Глутаминовая кислота	20,9	22,4	19,5[б]	12,3 [128]	—
Серин	5,4	6,3	5,0[б]	—	—
Треонин	4,5	4,9	5,85[б]	9,4[г]	10,5[в,г]
Тирозин	5,7	6,3	3,78[б]	6,7 [128]	—
Сумма	96,3	110,5	113,85	92,81	56,26

[а] Исключая серу.

[б] По данным Брэнда с сотрудниками [113].

[в] Среднее для эуглобулина и псевдоглобулина молока.

[г] По данным Смита с сотрудниками [87].

[д] По методу Спикса.

казеиновой фракции являются не менее важными, чем данные для отдельных электрофоретических компонентов (см. т. I, гл. III), так как состав казеина коровьего молока, по-видимому, постоянен.

Аминокислотный состав казеинов женского и коровьего молока довольно сходен, но не идентичен. Содержание фосфора в казеине женского молока значительно ниже, чем в казеине коровьего молока. Содержание серы в казеине женского молока, по-видимому, изменяется в широких пределах, в зависимости от метода получения казеина [1]. В белках молока распределение аминокислот хорошо сбалансировано; эти белки являются прекрасным источником восьми незаменимых аминокислот, необходимых для питания человека.

Азот концевых групп в β-лактоглобулине, а также в α- и β-казеинах определяли динитрофторбензольным методом Сангера [129]. Найдено, что в β-лактоглобулине имеются три концевых лейцильных остатка [130]. Установлено также, что из общего числа ε-аминогрупп лизина, равного 31, только 19 доступны для взаимодействия с динитрофторбензолом, однако после денатурации белка все аминокислоты взаимодействуют с этим реагентом. При помощи этого метода было найдено, что из четырех гистидильных групп в нативном β-лактоглобулине реакционноспособными являются только две, однако в денатурированном белке все гистидильные группы становятся реакционноспособными [131]. В α-казеине по методу Сангера найдено 10,7 концевой аргинильной группы и 1,5 концевой лизильной группы; в β-казеине—5,3 концевой аргинильной группы и 2,4 концевой лизильной группы [132].

5. ФЕРМЕНТЫ, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В МОЛОКЕ

История открытия ферментов в молоке изложена в обзорной статье Мак-Микина и Полиса [133]. Происхождение и функция ферментов молока установлены недостаточно, так как ферменты могут появляться в молоке из бактерий или в результате лейкоцитоза. Количества ферментов, содержащихся в молоке, относительно малы. Только один фермент молока был получен в кристаллическом состоянии [134]. Распад фермента фосфатазы используется в качестве теста для определения полноты пастеризации, так как патогенные организмы разрушаются в тех же условиях, при которых происходит распад фосфатазы. В молоке были обнаружены следующие ферменты: протеаза, амилаза, лактаза, липаза, ксантиноксидаза, фосфатаза, альдолаза, каталаза и лактопероксидаза.

Протеаза. Наличие в молоке протеолитического фермента было установлено Бебкоком и Расселом [135]. Уорнер и Полис [37] показали, что этот фермент осаждается с казеиновой фракцией молока и содержится в продажном казеине. В боратном буфере фермент проявляет оптимальную активность при pH 9,2 и действует как трипсин, вызывающий гидролиз казеина до более низкой стадии, чем образование пептонов. Посредством осаждения при pH 4,5 диализированного продукта ферментативного переваривания казеина и фракционирования фильтрата сульфатом аммония было достиг-

нуто 150-кратное увеличение активности фермента. Эта протеаза довольно устойчива по отношению к нагреванию, хотя и может быть разрушена при нагревании в течение 10 мин. в растворе буры при температуре 80°. При фракционировании казеина спиртом и мочевиной [12] протеаза концентрируется в α-казеиновой фракции. Однако фермент можно удалить из α-казеина фракционным осаждением спиртом при pH 6,0.

Лактопероксидаза. Теорелл и Окесон [134] получили этот фермент в кристаллическом состоянии. Он является единственным ферментом молока, полученным в кристаллическом состоянии. Выход фермента составлял 0,2 *г* на 100 *л* молока, или 2% от общего количества фермента, находящегося в молоке. Отсюда следует, что лактопероксидаза составляет 0,2% от общего количества белка в молоке. Фермент представляет собой гем-протеин, содержащий 0,07% железа, что соответствует содержанию приблизительно 1 *г-атома* железа в 1 моле фермента [136]. Установлено, что фермент представляет собой гомогенный белок с молекулярным весом 93 000, который был определен из данных измерений седиментации и диффузии [136]. Получение чистого фермента слагается из следующих операций: удаление казеина сульфатом аммония, удаление инертного белка нагреванием при 70° в течение 15 мин., осаждение других примесей основным ацетатом свинца, удаление ацетоном примесей, окрашенных в красный цвет, окончательная очистка электрофорезом.

Один из вариантов метода очистки лактопероксидазы предложили Полис и Шмуклер [137]. Казеин удаляли коагуляцией сычужным ферментом. Фермент осаждали при pH 6,0 и концентрации сульфата аммония в растворе 2,8 *М*. Эту фракцию очищали растворением в растворе буры с последующим фракционным осаждением сульфатом аммония. Дальнейшую очистку производили методом вытеснительной хроматографии на колонках из фосфата кальция и двуокиси кремния (целит). Кристаллическую лактопероксидазу получали кристаллизацией из 2,2 *М* раствора кислого фосфата калия (K_2HPO_4). Изолированная по этому методу лактопероксиза качественно по многим свойствам близка к лактопероксидазе, полученной Теореллом и Окесоном [134]. Молекулярный вес лактопероксидазы, определенный методом светорассеяния, равен 82 000. Содержание в ней железа составляет 0,069%. Этот фермент состоит из двух электрофоретических компонентов, на которые он был разделен. Имеются некоторые данные о том, что эти две формы лактопероксидазы находятся в равновесии друг с другом.

Амилаза. Концентрация в молоке этого фермента, расщепляющего крахмал, постоянна. Он, по-видимому, находится главным образом в сливках, хотя снятое молоко также обладает амилазной активностью [138].

Лактаза. Этот фермент, являющийся, по литературным данным, составной частью нормального молока [139], действует на лактозу, расщепляя ее молекулу на глюкозу и галактозу.

Липаза. Истинная липаза, сходная с липазой сока поджелудочной железы, была найдена в коровьем молоке [140]. Количество этого фермента в молоке обычно увеличивается с развитием лактации.

Ксантиноксидаза. Морган, Стьюарт и Гопкинс [141] показали, что молоко является хорошим исходным материалом для получения фермента, под действием которого ксантин превращается в мочевую кислоту. Белл [142] установил, что ксантиноксидаза молока в основном находится в сливках. При помощи метода, разработанного для ее очистки, были получены препараты в 500 раз более активные (на единицу сухого веса), чем цельное молоко. Сливки экстрагировали при 38° равным объемом 0,2 *М* раствора кислого фосфата натрия, и после центрифугирования при низкой температуре водный слой удаляли. Раствор инкубировали с липазой сока поджелудочной железы в течение 3,5 часа при 38°, после чего к нему добавляли раствор хлорида кальция, который давал осадок фосфата кальция. Желтый раствор, полученный после отделения фосфата кальция, доводили до 60% насыщения сульфатом аммония и оставляли стоять при 0°. Осадок отделяли при 0° и растворяли в воде. Раствор доводили до 33% насыщения сульфатом аммония; получаемый при этом осадок отделяли при 0° и выбрасывали. Ксантиноксидазу в надосадочной жидкости осаждали при 42% насыщении сульфатом аммония, после чего отделяли центрифугированием при 0°. Изоэлектрическая точка ксантиноксидазы по электрофоретическим измерениям равна 6,2. Поскольку препарат чист и известно, что в ферменте каждая молекула белка соединена с одной молекулой флавина, можно определить молекулярный вес ксантиноксидазы, максимальное значение которого оказалось равным 74 000. При продолжительном диализе против воды происходит обратимое отщепление группы флавина от белка. Коррен с сотрудниками [143, 144] получил препарат ксантиноксидазы, в 1000 раз более активный, чем молоко. Их метод заключался в фракционировании молока сульфатом аммония, осаждении активной фракции спиртом, адсорбции фермента гелем окиси алюминия с последующей его элюцией и в дальнейшем фракционировании сульфатом аммония. Группа флавина ксантиноксидазы, полученной по этому методу, не отщеплялась при диализе. Ультрацентрифугированием было установлено, что этот препарат ксантиноксидазы содержал три компонента. Константа седиментации s_{20} основной массы вещества с максимумом поглощения при 475 *мμ* равна 12,6 [145].

Фосфатаза. В сыром молоке содержится фосфатаза, которая сходна с фосфатазой млекопитающих по ее способности активи-

роваться ионами магния и по зависимости ее активности от pH [146]. Циттл и Делла Моника [147], пользуясь результатами сравнительных опытов с ингибиторами, пришли к заключению, что фосфатаза молока имеет большее сходство с фосфатазой костей и почек, чем с кишечной фосфатазой. Эти исследователи изучили действие анионов, катионов и аминокислот на молочную фосфатазу и разработали метод ее очистки. Значительная термостабильность бактериальной фосфатазы служила средством для ее отличия от молочной фосфатазы [148]. Последняя при нагревании разрушается медленнее, чем многие бактерии, так что проба на фосфатазу широко применяется как критерий пастеризации. Установлено, что молоко содержит небольшие количества кислой фосфатазы, более термоустойчивой, чем щелочная фосфатаза [149]. В результате изучения фосфатазной активности сырого молока и ее распределения в различных фракциях было установлено, что фосфатаза в большом избытке (но не полностью) концентрируется на границе раздела фаз жир—сыворотка [150]. Найдено, что содержание фосфатазы в сливках в 8 раз больше, чем в снятом молоке, и что пахта, получающаяся при производстве масла, особенно богата фосфатазой.

Альдолаза. Наличие в молоке мышечного фермента альдолазы, обратимо расщепляющего фруктозо-1,6-дифосфат на диоксиацетонфосфат и фосфоглицероальдегид, было установлено Полисом и Шмуклером [151].

Каталаза. Наличие каталазы в молоке было обнаружено Гриммером [152], а также Харденом и Лейн-Клейпоном [153]. Увеличение в молоке количества бактерий или лейкоцитов неизменно сопровождается повышением содержания каталазы. Каталазная активность концентрируется в осажденном казеине.

Молоко содержит и другие белки в небольших количествах, которые были обнаружены по некоторым специфическим химическим, физическим или биологическим свойствам. Зёренсен М. и Зёренсен С. описали красный белок, содержащийся в молочной сыворотке, и разработали метод для его частичной очистки [95]. Медь, находящаяся в молоке, почти полностью связана с белком. Диллс и Нельсон [154] изолировали из молочной сыворотки белок, содержащий 0,19% меди. Медь в молоке не находится в состоянии ионов и не удаляется диализом при pH 6,5, однако ее можно удалить посредством диализа при pH 3,5. Реакции, которая бы катализировалась белком, содержащим медь, не обнаружено. Этот белок не обладает оксидазной активностью по отношению к аскорбиновой кислоте; наличие такой активности представляет интерес, так как при стоянии молока содержание в нем аскорбиновой кислоты уменьшается.

Ашафенбург и Огстон [155] изолировали из молока белковую фракцию, обладающую заметно выраженной поверхностной активностью [155]. Этот белок получен из фильтрата сыворотки после

осаждения из нее белков, коагулирующих при нагревании. Ультрацентрифугированием было обнаружено, что он содержит два компонента с молекулярными весами 49 000 и 23 900. В литературе имеются данные [156] о выделении из молочной сыворотки фракции, которая, будучи фотосенсибилизирована, могла давать под действием солнечного света «горелый» привкус гомогенизированного молока.

6. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ФАКТОР МОЛОКА

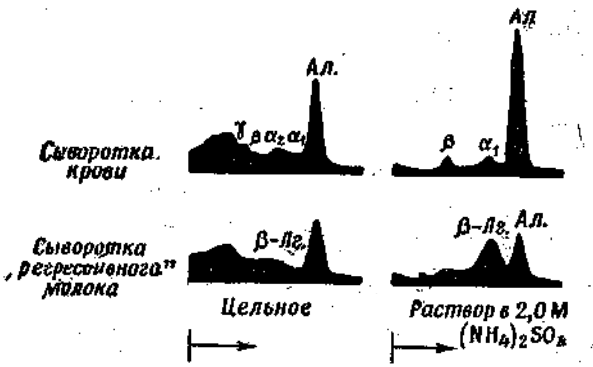
Давно известна способность молока подавлять рост некоторых видов бактерий. Вызывающий это действие фактор представляет собою термолабильный недиализируемый компонент молочной сыворотки, который Джонс и Симмс [157] назвали «лактенином». Исследования Вильсона и Розенблюма [158] показали, что для антибактериальной активности лактенина необходим кислород и что активность лактенина подавляется такими восстановителями, как глутатион или тиогликолевая кислота. Было установлено, что антибактериальная активность молока не связана с пероксидазами, ксантином, лизоцимом или с каким-либо антибиотиком, находящимся в молоке.

7. ВЗАИМОСВЯЗЬ БЕЛКОВ МОЛОКА С БЕЛКАМИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Белки молока часто сравнивали с белками сыворотки крови [73, 76, 77, 82]. В сыворотке не было найдено белка, химически или биологически сходного с казеином [73, 95]. Недавно Берри [160] показал, что казеин в молочных железах, вероятнее всего, синтезируется из аминокислот, а не из гликопротеина. Он установил, что меченые тирозин, лизин и неорганический фосфор удалялись из кровотока молочной железой и использовались для синтеза казеина. У козы аминокислоты проходят путь от кровотока до казеина молока приблизительно за 2 часа. Кроузер и Райстрик [76] получили данные, свидетельствующие о том, что глобулин молозива находится в нормальной молочной сыворотке и сходен с глобулином бычьей сыворотки крови. Это предположение о родстве иммунного глобулина с сывороточным глобулином подтвердилось результатами исчерпывающих сравнительных исследований свойств очищенных препаратов иммунного лактоглобулина из молочной сыворотки, молозива и сыворотки крови, проведенных Смитом с сотрудниками [17, 87], с применением электрофоретического, седиментационного и химического методов анализа. Они нашли, что иммунный белок молочной сыворотки является преобладающим белком молозива и что этот глобулин сходен с γ-глобулином сыворотки крови. Кэмпбелл с сотрудниками [90] наблюдал совпадение во времени плазмоцитоза с периодами повышенного

иммунитета, что указывает на клеточное происхождение иммунного глобулина молозива.

Мак-Кенс и Уиддоусон [161] обратили внимание на сходство состава молозива и «регрессивного» молока, т. е. жидкости, которая может быть выдавлена из молочной железы в течение сухого периода. Концентрация холинэстеразы и фосфатазы в молозиве и в «регрессивном» молоке женщины и собаки во много раз превышает концентрацию этих ферментов в нормальном молоке. На рис. 76 видно заметное сходство электрофореграмм «регрессивного»



Р и с. 76. Электрофореграммы сыворотки «регрессивного» молока (27 дней до отела) и сыворотки крови.

Вероналовый буфер, pH 8,35; ионная сила 0,1; *Ал.*—альбумин; *β-Лг.*—β-лактоглобулин (по Мак-Микину [9]).

коровьего молока, полученного за 27 дней до отела [9], с электрофореграммами сыворотки крови, взятой в то же самое время. Сходство между «регрессивным» молоком и сывороткой крови состоит также в том, что обе эти системы имеют одинаковое значение pH, равное 7,4. Однако pH «регрессивного» молока довольно быстро изменяется и в день освобождения от плода имеет значение 6,5, совпадающее с pH нормального молока.

Компонент молочной сыворотки (см. табл. 69) с подвижностью —6,4 *и*, составляющий 5% белков сыворотки молока, близок к сывороточному альбумину крови по электрофоретической подвижности. В результате иммунологических исследований Пескетт [162] установил, что нормальное молоко содержит небольшие количества сывороточного альбумина и что его содержание повышается в период секреции молозива и «регрессивного» молока. Электрофоретические исследования показали, что в молоке количество компонента с подвижностью —6,2 *и* начинает возрастать приблизительно за 70 дней до отела. Этот компонент был изолирован из нормальной молочной сыворотки [163] фракционированием

сульфатом аммония и спиртом. По своим свойствам и составу этот компонент оказался идентичным с бычьим сывороточным альбумином. Как показали Коулсон и Стивенс, этот кристаллический альбумин, полученный из молока, равноценен сывороточному альбумину крови и иммунологически [164].

ЛИТЕРАТУРА

1. Mellander O., Upsala Läkarefören. Förh., **52**, 107, 1947.
2. McCance R. A., Hutchinson A. O., Dean R. F. A., Jones P. E. H., Biochem. J., **45**, 493, 1949.
3. Davies W. L., The Chemistry of Milk, Chapman and Hill Ltd., London, 1939, p. 7.
4. Macy I. G., Kelley H., Sloan R., Bull. Natl. Res. Council, No. 119, Jan. 1950.
5. Beach E. F., Bernstein S. S., Hoffman O. D., Teague D. M., Macy I. G., J. Biol. Chem., **139**, 57, 1941.
6. Menefee S. G., Overman O. R., Tracy P. H., J. Dairy Sci., **24**, 953, 1941.
7. Rowland S. J., J. Dairy Res., **8**, 1, 6, 1937.
8. Shahani K. M., Sommer H. H., J. Dairy Sci., **34**, 1003, 1951
9. McMeekin T. L., J. Milk Food Technol., **15**, 57, 1952.
10. Mellander O., Biochem. Z., **300**, 240, 1939.
11. Smith E. L., J. biol. Chem., **165**, 665, 1946.
12. Hipp N. J., Groves M. L., Custer J. H., McMeekin T. L., J. Dairy Sci., **35**, 272, 1952.
13. Pedersen K. O., Biochem. J., **30**, 948, 1936.
14. Gordon W. G., Semmett W. F., J. Am. Chem. Soc., **75**, 328, 1953.
15. Palmer A. H., J. Biol. Chem., **104**, 359, 1934.
16. Warner R. C., J. Am. Chem. Soc., **66**, 1725, 1944.
17. Smith E. L., J. Biol. Chem., **164**, 345, 1946.
18. Grönwall A., Nature, **159**, 376, 1947.
19. Deutsch H. F., J. Biol. Chem., **169**, 437, 1947.
20. Mulder G. J., Ann. der Pharm., **28**, 73, 1838.
21. Hammarsten O., Textbook of Physiological Chemistry (translated by J. A. Mandel), John Wiley and Sons, New York, 1900.
22. Sutermeister E., Browne F. L., Casein and Its Industrial Applications, Reinhold Publ. Corp., New York, 1939.
23. Hammarsten O., Z. physiol. Chem., 7, 227, 1883.
24. Chittenden R. H., Painter H. M., Trans. Conn. Acad. Arts Sci., 7, 362, 1885—1888.
25. Lehmann J., Hempel W., Arch. ges. Physiol. (Pflügers), **56**, 558, 1894 (Mellander O., Upsala Läkarefören, Förh., **52**, 107, 1947).
26. Burow R., Beiträge zur Entscheidung der Frage ob die Kaseine verschiedener Tierarten identisch sind. Inaug.-diss., Basel, 1905 (Mellander O., Upsala Läkarefören. Förh., **52**, 107, 1947).
27. Tangl F., Arch. ges. Physiol. (Pflügers), **121**, 534, 1908.
28. Van Slyke L. L., Bosworth A. W., J. Biol. Chem., **14**, 203, 227, 1913.
29. Ramsdell G. A., Whittier E. O., J. Biol. Chem., **154**, 413, 1944.
30. Wróblewski A., Ann. suisses sci. médicales, Ser. II, 291, 1894 (Mellander O., Upsala Läkarefören. Förh., **52**, 107, 1947).
31. Engel F., Biochem. Z., **14**, 234, 1908.
32. Sandelin A. E., Meijeritieteellinen Aikakauskirja Nos. 1—2, 1943 (Mellander O., Upsala Läkarefören. Förh., **52**, 107, 1947).

33. Linderstrøm-Lang K., Kodama S., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **16**, № 1, 1925.
34. Linderstrøm-Lang K., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **17**, No. 9, 1929.
35. Cherbuliez E., Meyer F., Helv. Chim. Acta, **16**, 600, 1933.
36. Groh J., Kardos E., Denes K., Serenyi V., Z. physiol. Chem., **226**, 32, 1934.
37. Warner R. C., Polis E., J. Am. Chem. Soc., **67**, 529, 1945.
38. Hipp N. J., Groves M. L., Custer J. H., McMeekin T. L., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4928, 1950.
39. Osborne T. B., Wakeman A. J., J. Biol. Chem., **33**, 243, 1918.
40. Burk N. F., Greenberg D. M., J. Biol. Chem., **87**, 197, 1930.
41. Svedberg T., Carpenter L. M., Carpenter D. C., J. Am. Chem. Soc., **52**, 241, 1930.
42. Neurath H., Greenstein J. P., Putnam F. W., Erickson J. O., Chem. Revs., **34**, 157, 1944.
43. Perlmann G. E., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3191, 1952.
44. Hipp N. J., Groves M. L., McMeekin T. L., J. Am. Chem. Soc., **74**, 4822, 1952.
45. Northrop J. H., J. gen. Physiol., **16**, 339, 1932.
46. Fraser D., Powell R. E., J. biol Chem., **187**, 803, 1950.
47. Svedberg T., Pedersen K. O., The Ultracentrifuge, Oxford Univ. Press, London, 1940, p. 408.
48. Cohn E. J., Berggren R. E. L., J. gen. Physiol., **7**, 45, 1924.
49. Gordon W. G., Semmett W. F., Cable R. S., Morris M., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3293, 1949; Gordon W. G., Semmett W. F., Bender M., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4282, 1950; Gordon W. G., Semmett W. F., Bender M., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1678, 1953.
50. Nitschmann H., Helv. Chim. Acta, **21**, 315, 1938; Nitschmann H., Guggisberg H., Helv. Chim. Acta, **24**, 434, 574, 1941.
51. Plomley K. F., Higgins H. G., Hayes J. F., Nature, **167**, 224, 1951.
52. Mellon E. F., Korn A. H., Hoover S. R., J. Am. Chem. Soc., **69**, 827, 1947; **70**, 3040, 1948; **73**, 1870, 1951.
53. Chick H., Martin C. J., Biochem. J., **7**, 92, 1913.
54 Cohn E. J., Edsall J. T., Proteins, Amino Acids and Peptides, Reinhold Publ. Corp., New York, 1943, pp. 370—378.
55. McMeekin T. L., Groves M. L., Hipp N. J., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3298, 1949.
56. McMeekin T. L., Marshall K., Science, **116**, 142, 1952.
57. McMeekin T. L., Groves M., Hipp N. J., J. Polym. Sci., Jan. 1954.
58. Cannan R. K., Palmer A. H., Kibrick A. C., J. Biol. Chem., **142**, 803, 1942.
59. Holm G. E., Deysher E. F., Evans F. R., J. Dairy Sci., **6**, 556, 1923; Webb B. H., Holm G. E., J. Dairy Sci., **15**, 345, 1932; Holm G. E., Webb B. H., Deysher E. F., J. Dairy Sci., **15**, 331, 1932.
60. Howat G. R., Wright N. C., Biochem. J., **28**, 1336, 1934.
61. Rimington C., Biochem. J., **21**, 204, 1927.
62. Posternak S., Biochem. J., **21**, 289, 1927.
63. Lipmann F., Biochem. Z., **262**, 3, 1933.
64. Levene P. A., Hill D. W., J. Biol. Chem., **101**, 711, 1933.
65. Rimington C., Kay H. D., Biochem. J., **20**, 777, 1926.
66. Damodaran M., Ramachandran B. V., Biochem. J., **35**, 122, 1941.

67. Nicolet B. H., Shinn L. A., Abstracts of Papers, 110th Meeting Am. Chem. Soc., Chicago, 1946, p. 20B.
68. Holter H., Biochem. Z., **255**, 160, 1932.
69. Berridge N. J., Biochem. J., **39**, 179, 1945.
70. Nitschmann H., Lehmann W., Experientia, **3**, 153, 1947.
71. Nitschmann H., Varin R., Helv. Chim. Acta, **34**, 1421, 1951.
72. Lundsteen E., Biochem. Z., **271**, 259, 1934; Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **22**, 338, 1938.
73. Wells H. G., Osborne T. B., J. Infekct. Diseases, **29**, 200, 1921.
74. Dovey A., Campbell P. N., Nature, **169**, 1014, 1952.
75. Sebelien J., Z. physiol. Chem., **9**, 445, 1885.
76. Crowther C., Raistrick H., Biochem. J., **10**, 434, 1916.
77. Smith E. L., J. Dairy Sci., **31**, 127, 1948.
78. Smith T., Little R. B., J. Exptl. Med., **36**, 181, 453, 1922; J. Exptl. Med., **37**, 671, 1923.
79. Howe P. E., J. Biol. Chem., **49**, 93, 1921; **49**, 115, 1921; **52**, 51, 1922; **53**, 479, 1922; J. Exptl. Med., **39**, 313, 1924.
80. Polson A., Nature, **152**, 413, 1943.
81. Jameson E., Alvarez-Tostado C., Sortor H. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **51**, 163, 1942.
82. Hansen R. G., Phillips P. H., J. Biol. Chem., **171**, 223, 1947.
83. Foster J. F., Friedell R. W., Catron D., Dieckmann M. R., Arch. Biochem. Biophys., **31**, 104, 1951.
84. Earle I. P., J. Arg. Res., **51**, 479, 1935.
85. Orcutt M. L., Howe P. E., J. Exptl. Med., **36**, 291, 1922.
86. Kuttner A., Ratner B., Am. J. Diseases Children, **25**, 413, 1923.
87. Smith E. L., Coy N. H., J. Biol. Chem., **164**, 367, 1946; Smith E. L., Greene R. D., J. Biol. Chem., **171**, 355, 1947; Smith E. L., Greene R. D., J. Biol. Chem., **172**, 111, 1948; Smith E. L., Greene R. D., Bartner E., J. Biol. Chem., **164**, 359, 1946.
88. Laskowski M., Jr., Laskowski M., Jr. J. Biol. Chem., **190**, 563, 1951.
89. Laskowski M., Jr., Mars P. H., Laskowski M., J. Biol. Chem., **198**, 745, 1952.
90. Campbell B., Porter R. M., Petersen W. E., Nature, **166**, 913, 1950.
91. Comline R. S., Roberts H. E., Titchen D. A., Nature, **167**, 561, 1951.
92. Wichmann A., Z. physiol. Chem., **27**, 575, 1899.
93. Sjögren B., Svedberg T., J. Am. Chem. Soc., **52**, 3650, 1930.
94. Svedberg T., Nature, **139**, 1051, 1937.
95. Sørensen M., Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **23**, № 7, 1939.
96. Gordon W. G., Semmett W. F., Federation Proc., **11**, № 1, 220, 1952.
97. Pedersen K. O., Biochem. J., **30**, 961, 1936.
98. Sørensen M., Palmer A. H., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., **21**, № 21, 1938.
99. Crowfoot D., Chem. Revs., **28**, 215, 1941.
100. Fankuchen I., in Cohn E. J., Edsall J. T., eds., Proteins, Amino-acids and Peptides, Reinhold Pub. Corp., New York, 1943, p. 328.
101. McMeekin T. L., Warner R. C., J. Am. Chem. Soc., **64**, 2393, 1942.
102. Senti F. R., Warner R. C., J. Am. Chem. Soc., **70**, 3318, 1948.
103. Bull H. B., Currie B. T., J. Am. Chem. Soc., **68**, 742, 1946.
104. Halwer M., Nutting G. C., Brice B. A., J. Am. Chem Soc., **73**, 2786, 1951.
105. Cecil R., Ogston A. G., Biochem. J., **44**, 33, 1949.

106. Miller G. L., Golder R. H., Arch. Biochem. Biophys., 36, 249, 1952.
107. Sørensen S. P. L., Høyrup M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 12, 164, 1917.
108. Perutz M. F., Trans. Faraday Soc., 42B, 187, 1946.
109. McMeekin T. L., Abstracts of Papers, 120th Meeting Am. Chem. Soc., New York, 1951, p. 10C.
110. McMeekin T. L., Groves M. L., Hipp N. J., J. Am. Chem. Soc., 72, 3662, 1950.
111. Schachmann H. K., Lauffer M. A., J. Am. Chem. Soc., 71, 536, 1949.
112. Cannan R. K., Chem. Revs., 30, 395, 1942.
113. Brand E., Saidel L. J., Goldwater W. H., Kassell B., Ryan F. J., J. Am. Chem. Soc., 67, 1524, 1945.
114. Grönwall A., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., 24, Nos. 8—11, 1942.
115. Li C. H., J. Am. Chem. Soc., 68, 2746, 1946.
116. McMeekin T. L., Polis B. D., Della Monica E. S., Custer J. H., J. Am. Chem. Soc., 70, 881, 1948.
117. Polis B. D., Shmukler H. W., Custer J. H., McMeekin T. L., J. Am. Chem. Soc., 72, 4965, 1950.
118. Jacobsen C. F., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., 26, 455, 1949.
119. Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem., 131, 387, 1939.
120. Davis B. D., Dubos R. J., J. Exptl. Med., 86, 215, 1947.
121. McMeekin T. L., Polis B. D., Della Monica E. S., Custer J. H., J. Am. Chem. Soc., 71, 3606, 1949.
122. Briggs D. R., Hull R., J. Am. Chem. Soc., 67, 2007, 1945.
123. Jacobsen C. F., Christensen L. K., Nature, 161, 30, 1948.
124. Linderstrøm-Lang K., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 14, 117, 1950.
125. Christensen L. K., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim., 28, 37, 1952.
126. Groves M. L., Hipp N. J., McMeekin T. L., J. Am. Chem. Soc., 73, 2790, 1951.
127. Keston A. S., Udenfriend S., Cannan R. K., J. Am. Chem. Soc., 68, 1390, 1946.
128. Hansen R. G., Potter R. L., Phillips P. H., J. Biol. Chem., 171, 229, 1947.
129. Sanger F., Biochem. J., 39, 507, 1945.
130. Porter R. R., Biochim. Biophys. Acta, 2, 105, 1948.
131. Porter R. R., Biochem. J., 46, 304, 1950.
132. Mellon E. F., Korn A. H., Hoover S. R., J. Am. Chem. Soc., 75, 1675, 1953.
133. McMeekin T. L., Polis B. D., Advances in Protein Chem., 5, 201, 1949.
134. Theorell H., Åkeson Å., Arkiv Kemi, Mineral. Geol., 17B, No. 7, 1, 1943.
135. Babcock S. M., Russell H. L., 14th Ann. Rept. Wis. Agr. Exptl. Sta., 1897, p. 161.
136. Theorell H., Pedersen K. O., The Svedberg Memorial Volume, Almquist Wiksells, Uppsala, 1944, p. 523.
137. Polis B. D., Shmukler H., J. Biol. Chem., 201, 475, 1953.
138. Koning C. J., Milchw. Zntr., 4, 156, 1908 (C. A., 2, 1986).
139. Vandevelde A. J. J., Biochem. Z., 11, 61, 1908.
140. Rice F. E., Markley A. L., J. Dairy Sci., 5, 64, 1922.

141. Morgan E. J., Stewart C. P., Hopkins F. G., Proc. Roy. Soc. (London), Ser. **B94**, 109, 1922.
142. Ball E. G., J. Biol. Chem., **128**, 51, 1939.
143. Corran H. S., Green D. E., Biochem. J., **32**, 2231, 1938.
144. Corran H. S., Dewan J. W., Gordon A. H., Green D. E., Biochem. J., **33**, 1694, 1939.
145. Philpot J. St. L., Biochem. J., **33**, 1707, 1939.
146. Graham W. R., Jr., Kay H. D., J. Dairy Res., **5**, 54, 63, 1933.
147. Zittle C. A., Della Monica E. S., Arch. Biochem., **26**, 112, 1950; **26**, 135, 1950; **35**, 321, 1952; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **76**, 193, 1951.
148. Tittsler R. P., Sager D. S., Sanders G. P., J. Dairy Sci., **31**, 705, 1948.
149. Mullen J. E. C., J. Dairy Res., **17**, 288, 1950.
150. Hetrick J. H., Tracy P. H., J. Dairy Sci., **31**, 867, 1948
151. Polis B. D., Shmukler H. W., J. Dairy Sci., **33**, 619, 1950.
152. Grimmer W., Biochem. Z., **53**, 429, 1913.
153. Harden A., Lane-Claypon J. E., J. Hyg., **12**, 144, 1912.
154. Dills W. L., Nelson J. M., J. Am. Chem. Soc., **64**, 1616, 1942.
155. Aschaffenburg R., Ogston A. G., J. Dairy Res., **14**, 316, 1949.
156. Weinstein B. R., Duncan C. W., Trout G. M., J. Dairy Sci., **34**, 570, 1951.
157. Jones F. S., Simms H. S., J. Exptl. Med., **50**, 279, 1929; **51**, 327, 1930.
158. Wilson A. T., Rosenblum H., J. Exptl. Med., **95**, 25, 39, 51, 1952.
159. Reineke E. P., Williamson M. B., Turner C. W., J. Biol. Chem., **138**, 83, 1941.
160. Barry J. M., J. Biol. Chem., **195**, 795, 1952.
161. McCance R. A., Widdowson E. M., Nature, **167**, 722, 1951.
162. Peskett G. R., Ann. Rept. Natl. Inst. Res. Dairying, Reading, England, 1932, p. 52.
163. Polis B. D., Shmukler H. W., Custer J. H., J. Biol. Chem., **187**, 349, 1950.
164. Coulson E. J., Stevens H., J. Biol. Chem., **187**, 355, 1950.

XI

БЕЛКИ ЯИЦ

Р. Уорнер

R. C. Warner, «Egg Proteins» (vol. II, part A, pp. 435—485)

1. ВВЕДЕНИЕ

Исследования белковых веществ яиц птиц были начаты уже более 100 лет назад. Развитие этих исследований стимулировалось большим значением изучения биологических, химических и пищевых свойств яйца. За исключением газового обмена яйцо птицы в отношении развития эмбриона представляет собой замкнутую систему. Содержимое яйца должно обеспечить не только всю потребность в белке, но и все необходимые составные части тканей развивающегося цыпленка. Первые опыты по изучению состава желтка имели целью выяснить природу биохимических превращений в яйце [1]. Однако разделение белков желтка на индивидуальные компоненты оказалось затруднительным, и большое число работ, проводившихся с яичным белком, объясняется его значительно более простым составом.

Яичный белок с точки зрения химии белковых веществ представляет собой водный раствор различных белковых веществ, не содержащий в заметных количествах других органических компонентов. В нем отсутствуют липиды, имеются только следы несвязанных углеводов и незначительные количества ферментов. Вследствие этого трудоемкая и в некоторой степени условная процедура извлечения белков из тканей или отделения их от липидов и углеводов в данном случае становится излишней. Несмотря на это белковые компоненты яичного белка, за исключением яичного альбумина, в кристаллической или высокоочищенной воспроизводимой форме были получены только в течение последних нескольких лет. Желток не дает столь однородных белковых фракций. Это объясняется в основном присутствием как свободных, так и связанных липидов и трудностью идентификации их опытным путем.

По общему составу яичный белок представляет 10-процентный водный раствор белковых веществ, а желток—эмульсию липидов и липопротеидов, содержащую около 50% сухого остатка. В табл. 74 приведены средние значения для состава белка и желтка куриного яйца.

Таблица 74

СОСТАВ БЕЛКА И ЖЕЛТКА КУРИНОГО ЯЙЦА

(В основном средние данные, собранные Романовым А. Л. и Романовым А. И. [2])

Компонент, %	Белок	Желток
N	1,77	2,7
P	0,018	0,588
S	0,195	0,016
Вода	87,9	48,7
Сухой остаток	12,1	51,3
Белок	10,6	16,6
Углеводы	0,9	1,0
Жиры	0,03	32,6
Зола	0,6	1,1
Средний вес на яйцо, *г*	32,9	18,7

Подробный обзор работ по белкам яиц приблизительно до 1930 г. дал Нидхем [1]. Имеются и другие обзорные статьи за тот же период о белках яичного белка [3] и желтка [4] куриного яйца. Более полный обзор работ, включая и более поздние, сделал Феволд [5]. Общие вопросы химии, биологии и экономики яиц рассматриваются в обзоре Романова А. Л. и Романова А. И. [2].

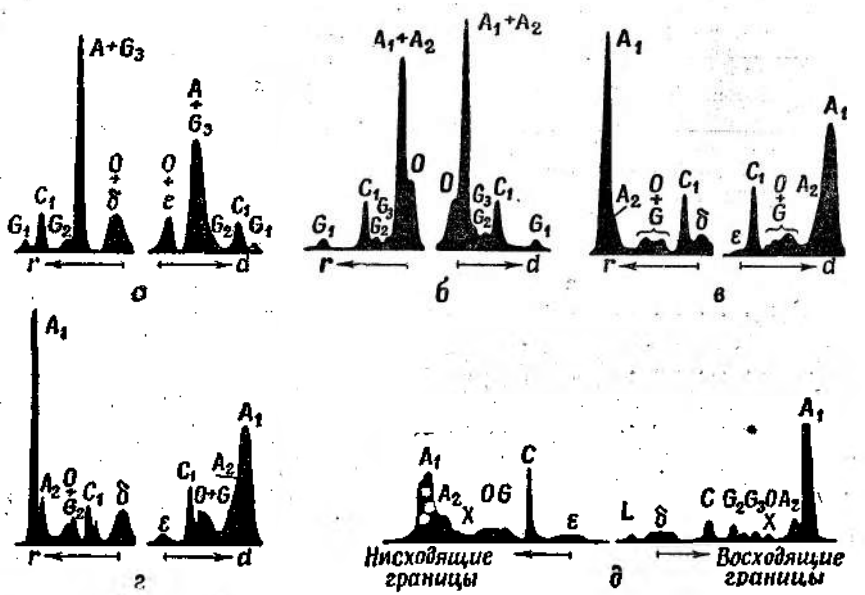
2. ЯИЧНЫЙ БЕЛОК

Яичный белок из свежих яиц не является однородным; он состоит из концентрических слоев с различными физическими свойствами [2, 6]. Верхний тонкий слой белка отделяется от гелеобразного толстого слоя, если содержимое яйца оставить стоять на плоской поверхности. Второй, внутренний тонкий слой белка можно затем получить, протыкая толстый слой. Желток окружен внутренним плотным слоем. Приведенные в литературе данные о белковом составе внешних трех слоев показывают, что они отличаются в основном только более высоким содержанием овомуцина в толстом слое [7, 8]*. Электрофоретическое исследование белков [9] этих трех слоев и кристаллического яичного альбумина [10], полученного из каждого из них, не показывает каких-либо различий в распределении белков между слоями или в характеристике препаратов яичного альбумина.

* Выводы этих авторов о существовании качественных различий в белковом составе трех слоев яичного белка не подтвердились в работах других исследователей (см. [9, 10]).

В большинстве случаев белок гомогенизировался путем разрушения мембран и не делалось различий между толстым и тонким слоями.

Белковые компоненты яичного белка, идентифицированные в настоящее время, в более ранних работах различались при помощи классических методов белковой химии или по их специфическим биологическим свойствам. Однако их наличие и относитель-



Р и с. 77. Электрофореграммы яичного белка в различных буферных растворах.

а—ацетатный буфер, pH 3,92, ионная сила 0,1 (по Лонгсвортсу [11]); *б*—ацетатный буфер, pH 4,45, ионная сила 0,1 (по Лонгсвортсу [11]); *в*—фосфатный буфер, pH 6,12, ионная сила 0,1 (по Лонгсвортсу [11]); *г*—фосфатный буфер, pH 8,0, ионная сила 0,1 (по Лонгсвортсу [11]); *д*—фосфатный буфер, pH 7,8, ионная сила 0,2 (по Форэпту и Фостеру [12]). Буквы соответствуют компонентам, указанным в табл. 75.

ную концентрацию легче всего можно установить методом электрофореза. Этот метод применялся различными авторами для исследования яичного белка и некоторых его очищенных белковых компонентов. На рис. 77 показаны электрофореграммы, полученные Лонгсвортсом, Кенненом и Мак-Иннесом [11] в буферных растворах при четырех различных значениях pH. Связь белков яичного белка с пиками на электрофореграммах сначала была установлена путем сравнения подвижностей этих белков с подвижностями очищенных белков и компонентов в частично фракционированных смесях. Относительное положение пиков не одинаково для отдельных электрофореграмм, причем наблюдается различная степень отделения данного пика от дру-

гих. Эти изменения отражают особенность изменений свободного заряда как функции pH для каждого белка. Успешное разделение компонентов яичного белка было достигнуто при единственном значении pH на электрофореграмме восходящей границы (см. рис. 77, *д* [12]). Компоненты, соответствующие этим электрофореграммам, приведены в табл. 75 с указанием процентного содержания каждого

Таблица 75

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ЯИЧНОГО БЕЛКА (в %)

Белок	а	б	в	г	д	е
Яичный альбумин . .	A_1, A_2	60	64,9	69,5	64,5	
Кональбумин	C	13,8	13,8	9	16,8	Способность связывать металл
Овомукоид	O	14,0	9,2	12,9	11,3	Ингибитор трипсина
Лизоцим	G_1, L	2,8	3,4	6,7	3,7	Лизис бактерий
Глобулин	G_2	4,6	8,7			
	G_3	4,3				
Овомуцин				1,9		1,1 [ж] Гемагглютинин
Авидин						<0,1 [з] Способность связывать биотин

[а] Обозначения см. на рис. 77.

[б] Содержание в % от общего белка, не включая муцин, рассчитанное по электрофоретическим данным Лонгсворта, Кеннена и Мак-Иннеса.

[в] То же, что и [б], но по данным Форзита и Фостера [12].

[г] Содержание (%) от общего белка, химические методы [13].

[д] Содержание (%) от общего белка, иммунологические методы [14—16].

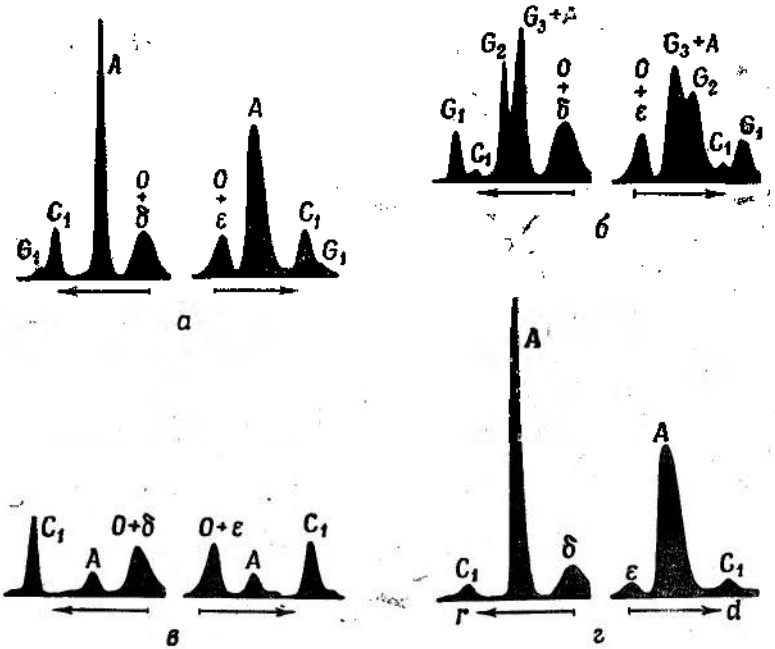
[е] Биологические или специфические свойства.

[ж] Содержание (%) от общего азота белка, прямое определение [12].

[з] Рассчитано из данных по связыванию биотина яичным белком и высокоочищенным препаратом авидина [17, 18].

компонента и его биологических или других специфических свойств. Известно, что в яичном белке содержатся два других белка, которые не обнаруживаются на этих электрофореграммах. Овомуцин был выделен в больших количествах до получения электрофореграмм, подобных изображенным на рис. 77, *а—г*, так как он осаждается в процессе диализа в буферной среде, предшествующем электрофорезу. Этот белок не образует отдельного пика на

электрофореграмме (см. рис. 77, *д*). Авидин присутствует в слишком малых концентрациях, чтобы его можно было обнаружить путем электрофореза. Эти анализы не исключают возможности наличия некоторых дополнительных компонентов, содержащихся в незначительных концентрациях



Р и с. 78. Электрофореграммы для различных стадий фракционирования яичного белка.

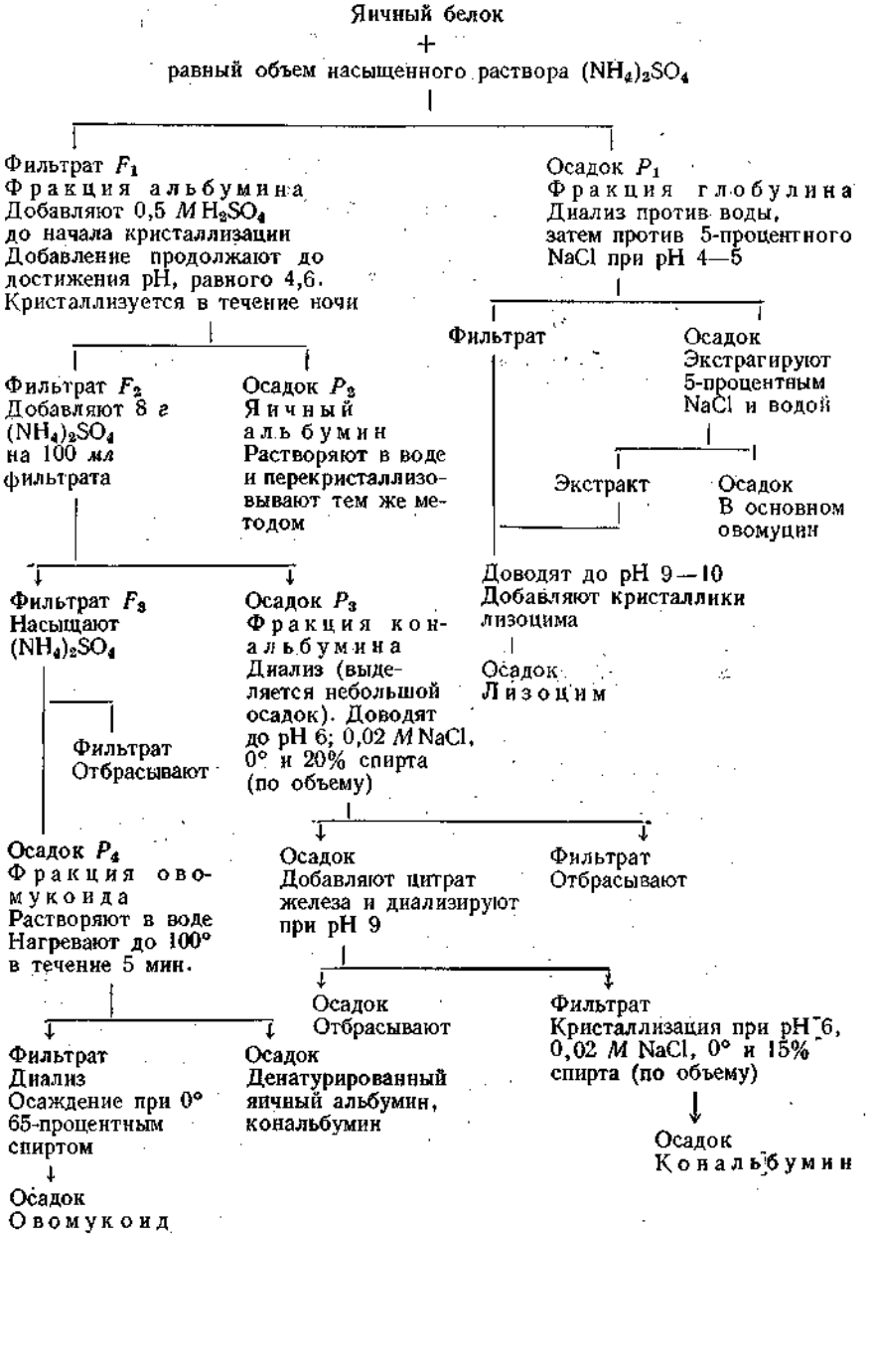
Все данные получены для ацетатного буфера при pH 3,92, ионная сила 0,1 (по Лонгсворту [11]). *а*—фракция альбумина; *б*—фракция глобулина; *в*—фильтрат после первой кристаллизации яичного альбумина; *г*—яичный альбумин, первые кристаллы.

Большинство методов, применяемых для фракционирования яичного белка, имело целью выделение какого-либо одного компонента, и поэтому их нелегко расположить в законченную схему для получения всех фракций. Однако обычный метод разделения альбуминов и глобулинов в полунасыщенном растворе сульфата аммония так часто применяли в качестве начальной стадии процесса, что следует описать разделение основных компонентов в начальной стадии фракционирования с помощью этого метода. Ниже представлена схема разделения.

Электрофореграммы, характеризующие распределение компонентов в нескольких фракциях, приведены на рис. 78 [11].

Схема 1

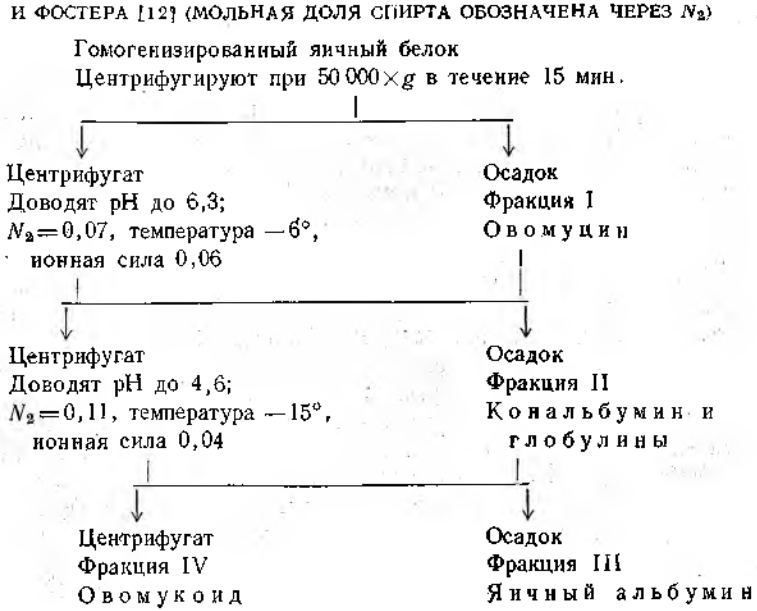
РАЗДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ ЯИЧНОГО БЕЛКА С ПРИМЕНЕНИЕМ СУЛЬФАТА АММОНИЯ



Фильтрат (F_1) после первого разделения содержит яичный альбумин, кональбумин и овомукоид (см. рис. 78, *а*). Яичный альбумин кристаллизуется непосредственно после добавления кислоты [19]. Кональбумин, наличие которого в этой фракции было доказано электрофоретически (см. рис. 78, *г*), можно удалить посредством двухкратной перекристаллизации [11]. После удаления яичного альбумина добавление новых порций сульфата аммония вызывает выпадение фракции, состоящей в основном из кональбумина (P_3). Этот белок кристаллизуется после очистки P_3 по методу, показанному на схеме 1 [20]. Овомукоид, остающийся в фильтрате (F_3), удаляется с оставшимся яичным альбумином и кональбумином при насыщении раствора сульфатом аммония. Другие белки отделяют от овомукоида тепловой коагуляцией [21], как показано на схеме 1, или 5-процентной трихлоруксусной кислотой при pH 3,5 по методу Фредерика и Дейча [22]. Первая фракция глобулинов (P_1) содержит овомуцин, лизоцим и другие глобулины (см. рис. 78, *б*). Овомуцин удаляется в виде нерастворимой в воде и в разбавленных растворах солей фракции. Лизоцим кристаллизуется из фильтрата по методу Олдертона и Феволда [23], разработанному для цельного яичного белка, как показано на схеме 1. Если кристаллы для затравки, необходимые для этого метода, отсутствуют, то для выделения лизоцима из фильтрата фракции P_1

Схема 2

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЯИЧНОГО БЕЛКА СПИРТОМ ПО МЕТОДУ ФОРЗИТА И ФОСТЕРА [12] (МОЛЬНАЯ ДОЛЯ СПИРТА ОБОЗНАЧЕНА ЧЕРЕЗ N_2)



можно использовать оригинальный метод тех же авторов [24], применивших адсорбцию лизоцима на бентоните и элюирование его водным раствором пиридина при pH 5. Остальные глобулины подробно еще не исследовались.

Метод достаточно полного фракционирования с применением спирта при низких температурах и низкой ионной силе раствора был предложен Форзитом и Фостером [12]. Основные фракции, на которые разделяется яичный белок при применении этого метода, указаны на схеме 2. Эта схема дополняется другими методами для дальнейшей очистки фракций II и III [12].

Поскольку ни один из известных белков этими методами полностью не отделяется от других, распределение их в различных фракциях определяют методом электрофореза. Лизоцим был выделен и перекристаллизован по методу Олдертона и Феволда [23], исходя из субфракции II. Яичный альбумин был выкристаллизован при помощи сульфата аммония из субфракции III. Начальная стадия фракционирования с применением спирта аналогична методу Бейна и Дейча [25] для получения сырой фракции кональбумина из яичного белка.

А. Яичный альбумин

1) ПОЛУЧЕНИЕ

Яичный альбумин, основная составная часть яичного белка, был выделен в кристаллической форме Гофмейстером [26] в 1890 г. Он получил фракцию альбумина, добавляя к яичному белку сульфат аммония до полунасыщения. При медленном испарении этого раствора при комнатной температуре выделяется осадок, который кристаллизуется при повторении этой процедуры. Вследствие доступности и несомненной чистоты кристаллического яичного альбумина его использовали в качестве стандартного препарата для исследований состава, физических свойств, денатурации и строения белков.

В большинстве методов получения яичного альбумина, предложенных позднее, также исходили из этой фракции альбумина. Хопкинс и Пинкус [27], а также Осборн [28] для инициирования кристаллизации вместо дополнительного количества сульфата аммония добавляли кислоту. В качестве стандартного метода получения был принят метод, описанный Зёренсеном и Хойрупом [19]. В основном этот метод сводится к отделению фракции альбумина путем добавления равного объема насыщенного раствора сульфата аммония к яичному белку при комнатной температуре и фильтрованию осажденных глобулинов. Затем продолжают добавлять насыщенный сульфат аммония к фильтрату до появления легкой не исчезающей мути и доводят pH раствора до ~4,6 0,2 н. раствором

серной кислоты. После этого раствор взбалтывают для растворения образующегося аморфного осадка. Кристаллизация наступает самопроизвольно и продолжается по крайней мере в течение 2 дней. Полученный продукт перекристаллизовывают аналогичным образом. Лароза [29] несколько видоизменил этот метод; другой метод, используемый в лаборатории Уорнера, показан на схеме 1. Кековик и Кеннен [30] предложили применять сульфат натрия в качестве высаливающего агента. Этот метод имеет примущества в тех случаях, когда нежелательно присутствие азота или иона аммония из-за его слабокислотных свойств. Кроме того, яичный альбумин, выкристаллизованный из раствора сульфата натрия, можно высушить до воздушно-сухого состояния при комнатной температуре для получения стабильного порошка. Сульфат натрия достаточно растворим при комнатной температуре для высаливания яичного альбумина, однако в случае более растворимых белков для достижения необходимой концентрации соли необходимо повысить температуру выше 30°. Фракции яичного альбумина, выделенные из яичного белка спиртом при низких температурах, кристаллизуются из растворов сульфата аммония [12]; кристаллизацию непосредственно из спиртового раствора не производили.

Наличие кональбумина и овомукоида во фракции альбумина доказали Зёренсен и Хойруп [19]. Ни один из этих белков не обнаружен в яичном альбумине после трехкратной перекристаллизации, что подтвердилось также и электрофоретическими исследованиями соответствующих кристаллических препаратов [11]. Гектоен и Коул пришли к аналогичному выводу, руководствуясь иммунологическими данными. Однако в последних работах, проведенных этими же методами, было показано, что даже после шестикратной перекристаллизации яичный альбумин может быть загрязнен примесями неидентифицированных белков [14].

Серия дальнейших исследований кристаллизации яичного альбумина была выполнена Зёренсеном и Хойрупом [31]. Они провели анализы кристаллической фазы (кристаллы+соответствующий маточный раствор) и водной фазы (маточный раствор) после установления равновесия в растворе и пришли к выводу, что в состав кристаллов наряду с белками входит вода в количестве 0,22 *г* воды на 1 *г* белка и что этот состав не зависит от условий кристаллизации. На основании этих косвенных данных было сделано допущение, что сульфат аммония не входит в состав кристаллов. Однако прямые анализы других белковых кристаллов, находящихся в равновесии с растворами солей, показали наличие больших концентраций солей в кристаллизационной воде [32]. По-видимому, приведенное выше значение для кристаллизационной воды является заниженным. Скорость кристаллизации возрастает с повышением концентрации сульфата аммония, белка или температуры. Изучалась также зависимость растворимости от pH, концентрации соли

и белка, а также от температуры. Установлено, что яичный альбумин ведет себя как отдельный компонент с точки зрения правила фаз. Минимум растворимости для двух различных концентраций сульфата аммония имеет место при pH 4,58 и совпадает с изоэлектрической точкой, определяемой методом электрофореза (см. табл. 77). Это значение намного ниже изоионной точки, соответствующей pH 4,84 в сульфате аммония (найденной в работе [31]) или pH 4,89 в хлориде аммония (по данным Зёренсена, Линдерштрём-Ланга и Лунда [33]). В соответствии с этим различием кристаллическая фаза, отделенная в точке минимума растворимости, всегда содержит в избытке ионы сульфата по сравнению с ионами аммония [31]. Преимущественное связывание анионов, обусловливающее различие изоэлектрической и изоионной точек, более прямыми методами не изучалось.

Хотя яичный альбумин был одним из первых белков, полученных в кристаллическом состоянии, однако исследование его кристаллов методом рентгеноструктурного анализа не проводилось в основном из-за трудности получения монокристаллов достаточных размеров. По внешнему виду эти кристаллы представляют собой иглы или вытянутые призмы, часто образующие розетки. Следует отметить, что одним из факторов, способствующих успешному выделению кристаллического яичного альбумина, является то, что в отличие от других белков эти кристаллы можно получать в широком интервале pH по обе стороны от изоэлектрической точки [31, 34].

2) СОСТАВ

Аминокислотный состав яичного альбумина исследовали очень подробно; в основном был определен весь азот в молекуле. Некоторые из этих анализов суммированы в т. I, гл. III. Другие сводные данные приведены у Тристрама [35] и Феволда [5]. Большинство аминокислот, найденных при анализах белков яичного белка, описано в работе Льюиса с сотрудниками [36]. Феволд [5] приводит выборочные данные, определяющие весь азот и находящиеся в соответствии с молекулярным весом белка. Он рассчитал общее число аминокислотных остатков, которое соответствует молекулярному весу 45 000. Однако только немногие аминокислоты имеют достаточно малое число остатков в молекуле, для того чтобы можно было надежно обосновать этот молекулярный вес.

Кроме того, было снова показано, что наряду с аминокислотами яичный альбумин содержит углеводы [13, 37, 38]. В настоящее время принято, что последние входят в состав молекулы [38], хотя некоторые авторы полагают, что присутствие углеводов объясняется примесью овомукоида [39]. Нейбергер [40] нашел, что содержание гексозы после двух перекристаллизаций составляет 1,8% и не изменяется при последующих перекристаллизациях. Он вы-

делил вещество, содержащее 2 молекулы гексозамина, 4 молекулы маннозы и некоторое количество неидентифицированного материала, содержащего азот. Нейбергер рассматривает этот углевод как простетическую группу яичного альбумина; 1 моль этого углевода, равный 1200 *г*, приходится на 1 моль белка. Зёренсен [13] при помощи орцинолового метода нашел, что содержание гексозы составляет 1,7% [41], а гексозамина—1,4% [42], что хорошо согласуется с данными Нейбергера.

Портер [43] получил динитрофторбензолпроизводные яичного альбумина и исследовал гидролизат на содержание динитрофениламинокислот. Он не нашел аминокислот, в которых группа динитрофенила была бы связана с α-аминоазотом, хотя ожидаемые ε-аминопроизводные лизина были им обнаружены. Таким образом, яичный альбумин, по-видимому, не содержит концевой аминогруппы. Однако Штейнберг [44] доказал присутствие концевой карбоксильной группы. Он установил, что аланин является единственной аминокислотой, выделяющейся при действии карбоксипептидазы при инкубировании в течение 30 мин. при 37°. Спустя 2 часа были обнаружены небольшие количества и других аминокислот. Выделяется около 20% аланина, что эквивалентно одной концевой группе на молекулу. Портер [43] высказал предположение, что отсутствие концевой аминогруппы может указывать на циклическую пептидную цепь или может являться результатом взаимодействия концевой аминогруппы с углеводным остатком. Первое допущение исключается, поскольку имеется концевая карбоксильная группа. Дополнительные данные были получены Штейнбергом, который после обработки карбоксипептидазой получил динитрофторбензолпроизводные. Он не нашел концевой аминогруппы, что свидетельствует о том, что фермент не вызвал расщепления циклической пептидной цепи*.

3) ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОДНОРОДНОСТЬ

Ранние исследования Зёренсена [45] по изучению связывания кислот и оснований яичным альбумином были продолжены в последующих работах Зёренсена, Линдерштрём-Ланга и Лунда [33], а также Кеннена с сотрудниками [34, 46]. В работах Кеннена были тщательно проанализированы кривые титрования при различных ионной силе и температуре с добавкой формальдегида и в его отсутствие. Кривые титрования с физико-химической точки

* Дальнейшие исследования]191] показали, что карбоксипептидаза отщепляет аланин от яичного альбумина только после предварительного воздействия другого фермента, который обычно присутствует в качестве примеси в препаратах карбоксипептидазы. Тем самым отпадает вывод, что аланин является С-концевой аминогруппой яичного альбумина.

зрения рассмотрены в т. II, гл. V. Характер кривой титрования определяется свободными кислыми и основными группами, в основном кислыми и основными аминокислотами; поэтому интересно сопоставить данные аминокислотного состава со стехиометрией титрования. Результаты расчета диссоциирующих групп, полученные на основе характерных особенностей кривой титрования, приведены в табл. 76 [34]. На кривой наблюдается максимум связывания,

Таблица 76

СРАВНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА С ДАННЫМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ НА ОСНОВЕ КРИВОЙ ТИТРОВАНИЯ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

Состав	Содержание аминокислот, *г* на 100 *г* белка		Количество групп в молекуле (мол. вес 45 000)
	Тристрам [35]	Льюис и др. [36]	
Аргинин	5,72	5,9	15
Гистидин	2,35	2,41	7
Лизин	6,3	6,4	20
Аспарагиновая кислота	9,3	9,2	31
Глутаминовая кислота	16,5	15,7	50
Амидный азот	1,04 [48]		33
Фосфор	0,12 [49]		1,7
Концевые карбоксильные группы			1 [44]
Всего катионов (1+2+3)			42
Всего анионов [4+5+8−(2×7)−6]			52

Группы	Количество диссоциирующих групп	
	из кривой титрования [34]	из аминокислотного состава
а. Всего катионов	41	42
б. Карбоксильные группы без гуанидина	37	37
в. Аминогруппы	22	20
г. Амидазольные группы	5	7
д. *а*−*в*−*г*=гуанидин	14	15
е. *б*+*д*=карбоксильные группы	51	52

соответствующий 41 протону, при низких pH и плоский участок— при pH 8—8,5, соответствующий отщеплению 15 протонов, который падает до уровня, соответствующего отщеплению 37 протонов, когда белок приводится к тому же значению pH в присутствии формальдегида. Эти величины относятся к белку с молекулярным весом 45 000 *г* и рассчитаны путем экстраполирования связывания протонов до нулевого значения при изоионной точке 4,90. При pH, соответствующих плоскому участку кривой (8—8,5), аминогруппы, как и группы гуанидина, являются катионами, в то время как в формальдегиде при тех же значениях pH аминогруппы не заряжены, а группы гуанидина по-прежнему несут положительный заряд. Эти соображения вместе с данными о наличии пяти имидазольных групп, полученными из результатов анализа температурного коэффициента ионизации по методу Уимена [47], позволяют вычислить величины, представленные в табл. 76. Следует отметить, что хотя *б* и *е* идентифицированы в табл. 76 как карбоксильные группы, они содержат дополнительно два эквивалента на каждый остаток фосфорной кислоты, так как *б* и *е* рассчитаны из результатов измерений заряда при pH 8—8,5.

Зёренсен [50] в своих классических исследованиях яичного альбумина определял его молекулярный вес осмометрическими методами и нашел, что он равен 34 000. Аналогичные данные были получены ранее методом ультрацентрифугирования [51], а также из других измерений осмотического давления [52]. В более поздних работах неизменно получались бóльшие значения молекулярного веса. Сюда относятся осмометрические данные—46 000 [53, 54], 45 160 [55] и 45 000 [56], данные по светорассеянию—45 700 [57] и 46 000 [58], а также значение 45 000 [59], полученное при работе с мономолекулярными пленками. Два значения, приведенные в табл. 77, получены в результате измерения седиментации и констант диффузии. Константа диффузии, приведенная в табл. 77, получена Ламмом и Польсоном [60] путем экстраполяции до бесконечного разведения. Определения константы диффузии, проведенные Лонгсвортсом [61], показали небольшой рост этой величины с повышением pH от 2,4 до 7,8. Однако найденное ими значение хорошо согласуется с данными, полученными в тех же условиях Ламмом и Польсоном [60]. Константа седиментации, равная 3,55 *S*, получена Ламмом и Польсоном [60] в лаборатории в Упсале. В последующей работе Кегельс и Гуттер [62] определяли зависимость константы седиментации от концентрации и получили значение 3,67 *S* для бесконечного разведения. Удельный парциальный объем 0,749 [63], приведенный в табл. 77, находится в соответствии с величиной 0,748, недавно определенной методом магнитного поплавка [64]. Яичный альбумин, как это следует из данных по седиментации, представляет собой гомогенный материал с некоторой тенденцией к образованию при стоянии более высокомолекулярных

Таблица 77

ФИЗИЧЕСКИЕ КОНСТАНТЫ БЕЛКОВ ЯИЧНОГО БЕЛКА

Белки	$D_{20,w}$, $см^2/сек \times 10^7$	$s_{20,w}$, единицы Сведберга	V_{20}, $см^3/г$	Молекулярный вес		pI
				M_{sd}	другие	
Яичный альбумин	7,76 [60]	3,55 [60]	0,749 [63]	43 800	45 000	4,58 [61, 65]
		3,67 [62]		45 500	См. текст	
Кональбумин	5,66 [25]	5,4 [25]	(0,731)[а]	87 000	76 600 [20][б]	6,8 [20]
Лизоцим	11,2 [16,66]	1,9 [66]	0,722 [16]	14 800	14 800, см. текст	11,3 [16]
Овомуконд . . .	8,0 [22]	2,8 [22]	0,685 [22]	27 000	28 800 [67][в]	3,9 [22]
Авидин					66 000 [68][в]	10 [18]

а Предполагаемое значение, см. работу Бейна и Дейча [25].

б Аналитические данные из связывания металла.

в Осмометрические данные.

Примечание. $D_{20,w}$, $s_{20,w}$ и V_{20}—константы диффузии и седиментации и удельный парциальный объем по отношению к воде при 20°; M_{sd}—молекулярный вес, полученный из этих данных; V и D для яичного альбумина являются экстраполированными значениями (см. текст); для других белков они относятся к конечным концентрациям; pI—изоэлектрическая точка, измеренная электрофоретически при ионной силе раствора 0,1.

веществ [62]. За наиболее вероятную величину молекулярного веса можно принять 45 000. Это значение, часто используемое в расчетах для яичного альбумина, представляет собой наиболее вероятную среднюю величину из осмометрических и седиментометрических данных.

Несмотря на гомогенность яичного альбумина в отношении молекулярного веса, методом электрофореза [69] было показано наличие в нем нескольких компонентов. Лонгсворте [11] обозначал основной компонент через A_1 и другой, более медленно движущийся компонент с меньшей концентрацией, через A_2. Компонент A_2 частично отделялся от A_1 в интервале pH 5—10, но это разделение не достигалось при более крайних значениях pH. Третий компонент—A_3—проявляется на многих кривых [70—72]. Типичная электрофореграмма для этих компонентов дана на рис. 79, *а*. Относительные количества A_1 и A_2 в различных препаратах несколько отличны [11]. Среднее содержание этих компонентов, по данным Кенна [71],

составляет 76% A_1, 18% A_2 и 6% A_3; электрофореграммы на рис. 79 соответствуют составу: 85% A_1, 14% A_2 и следы A_3 [70].

В течение некоторого времени считали, что содержание фосфора в яичном альбумине не соответствует общему числу атомов на молекулу. Значение 0,12% (табл. 76) эквивалентно 1,7 остатка на молекулу (мол. вес равен 45 000). Несколько более высокое значение получено из данных рис. 79 В настоящее время предполагается, что компоненты A_1, A_2 и A_3 отличаются в основном количеством фосфора и содержат соответственно 2, 1 и 0 фосфатных остатков на молекулу. Перлмен [70] обрабатывала яичный альбумин высокоактивной фосфатазой из предстательной железы и кишечной фосфатазой и исследовала эту реакцию методом электрофореза и по содержанию белкового фосфора. Она нашла, что под действием фосфатазы предстательной железы при pH 5,35 из яичного альбумина выделяется 46% фосфора. Электрофореграммы на рис. 79 показывают, что по мере дефосфорилирования на кривой исчезает компонент A_1 и заменяется компонентом A_2. Содержание фосфора в белке на каждой стадии инкубирования соответствует данным, рассчитанным на основании площадей на диаграммах распределения и принятого содержания фосфора для каждого компонента, как указано выше. Общее количество выделенного фосфора (46%) соответствует, следовательно, половине фосфора, содержащегося в A_1. При удлинении периода инкубации или при добавке фермента дальнейшее дефосфорилирование на этой стадии не наблюдается; по-видимому, действие фермента ограничивается удалением одного фос-

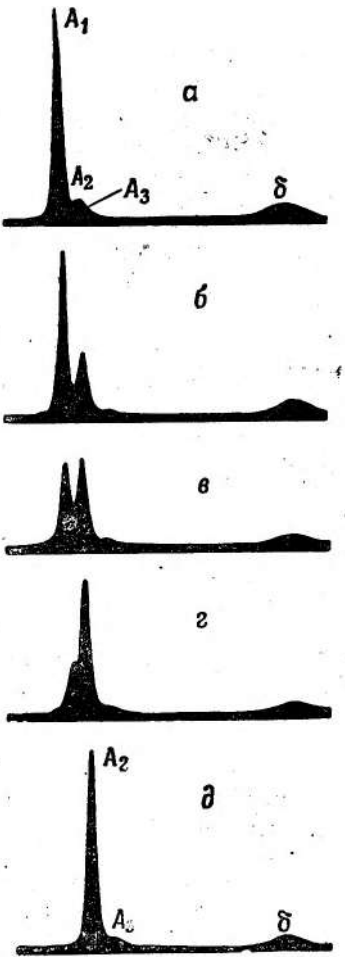


Рис. 79. Дефосфорилирование яичного альбумина фосфатазой предстательной железы (по Перлмен [70]).

Восходящая электрофореграмма (фосфатный буфер, pH 6,8, ионная сила 0,1) соответствует следующим временам инкубирования и числам атомов P на 1 моль белка, рассчитанным и наблюдаемым соответственно: *а*—0 час., 1,84 и 1,82 атома P; *б*—0,5 часа, 1,56 и 1,48 P; *в*—0,75 часа, 1,43 и 1,35 P; *г*—1,75 часа, 1,30 и 1,20 P; *д*—7 час., 0,94 и 0,97 P.

фатного остатка, так как при этом не образуется соединений азота, растворимых в трихлоруксусной кислоте.

Действие кишечной фосфатазы имеет более сложный характер. При pH 9 быстро выделяется 46% фосфора, а затем добавочное количество фосфора выделяется медленно; однако полного дефосфорилирования не происходит. При дальнейшем исследовании действия фермента на яичный альбумин было показано наличие оптимумов при значениях pH 5,3 и 9. Используя первый оптимум и исходя из компонента A_2, можно получить не содержащий фосфора компонент A_3. Оба компонента A_2 и A_3 дают одинаковые иглообразные кристаллы, характерные для яичного альбумина. Изменение подвижности при удалении 1 атома фосфора составляет в среднем $0{,}6 \cdot 10^{-5}$ при нескольких значениях pH выше нейтральной точки для переходов A_1 в A_2 и A_2 в A_3. Изменение подвижности на единицу заряда составляет $0{,}3 \cdot 10^{-5}$ [73], поэтому очевидно, что наблюдаемая разность соответствует изменению свободного заряда на —2 в пересчете на атом фосфора. Изоэлектрическая точка компонента A_2 также смещена на 0,07 pH единиц по сравнению с A_1. Изоэлектрическая точка A_3 смещена на 0,1 единицы в щелочную область по сравнению с A_2.

Значение этих наблюдений состоит в том, что они позволяют просто объяснить электрофоретическую неоднородность яичного альбумина. Они показывают также, что два фосфатных остатка компонента A_1 ведут себя неодинаково по отношению к двум ферментам. Это может быть следствием различия химической связи у этих двух остатков. Вообще предполагалось, что фосфатные остатки образуют эфиры с первичной гидроксильной группой серина. Наличие связи такого типа в яичном альбумине доказано присутствием серина в содержащем фосфор пептиде, выделенном при частичном гидролизе яичного альбумина [70]. Перлмен также показала, что простые эфиры, в которых имеется связь амид—фосфор, расщепляются кишечной фосфатазой с оптимумами при значениях pH 5,3 и 9, подобно яичному альбумину [70], подтверждая тем самым возможность связи такого типа для одного из фосфатных остатков в яичном альбумине. Эти наблюдения позволяют также объяснить разделение фосфора, наблюдаемое при электродиализе [74], и изменение содержания фосфора в яичном альбумине при хранении его в растворе в течение длительного времени [75].

4) ДЕНАТУРАЦИЯ

Яичный альбумин применяли при изучении различных сторон процесса денатурации белков. Большинство работ в этой области приведено в т. II, гл. VI; здесь мы ограничимся только кратким обсуждением этого вопроса. Увеличение доступности сульфгидрильных групп при денатурации было впервые установлено для

яичного белка с помощью нитропруссидной реакции [76]. Для этой же цели яичный альбумин подвергали действию ряда других окислителей, таких, как порфириндин [77, 78], феррицианид [79], цистин [79] и 2,6-дихлорфенолиндофенол [80]. Применение этих реагентов дало возможность установить наличие сульфгидрильных групп в осадке денатурированного яичного альбумина [79, 80] и в гомогенном растворе яичного альбумина, денатурированного концентрированным раствором мочевины [78, 81] или гуанидина [78]. В нативном белке этими реагентами сульфгидрильные группы не обнаруживаются. Однако присутствие видоизмененных сульфгидрильных групп в яичном альбумине является вполне вероятным, если учесть его реакции с иодом и иодацетамидом [82]. Доступность этих групп, по-видимому, зависит от типа реагента, который применяется для их обнаружения. В последней работе Мак-Доннелл, Сильва и Финей [83] определили сульфгидрильные группы в нативном яичном альбумине при помощи *п*-хлорртутьбензоата. Непрореагировавший с сульфгидрильными группами белка избыток этого реактива оттитровывали цистеином с применением нитропруссида в качестве индикатора. В нативном яичном альбумине было найдено три сульфгидрильные группы, а в яичном альбумине, денатурированном гуанидином,—четыре в расчете на молекулу с мол. весом, равным 44 000. Продукт взаимодействия этого реактива с нативным яичным альбумином был выделен в кристаллическом состоянии. Затем обработкой цистеином вызывали его диссоциацию, после чего удавалось снова выделить кристаллический яичный альбумин. Подобное титрование проводили после различных степеней окисления сульфгидрильных групп иодом. Было показано, что в нативном и денатурированном белке для реакции с иодом доступно то же количество групп, что и для реакции с *п*-хлорртутьбензоатом. Можно предположить, что по крайней мере три из четырех сульфгидрильных групп имеют второстепенное значение для сохранения нативного строения белка.

Для денатурированного яичного альбумина было установлено заметное увеличение реакционной способности фенольных групп по отношению к фенольному реактиву Фолина по сравнению с нативным белком [84]. Еще более явное доказательство изменения свойств этой группы получили Кремер и Нейбергер [85] при спектрофотометрическом изучении ее ионизации. Ионизация сопровождается смещением полосы поглощения при 230 *мμ*. Это смещение в случае яичного альбумина наблюдается только при pH выше 12, когда происходит денатурация. Отсюда следует, что протоны этих групп могут отщепляться только в процессе денатурации. Предполагаемая роль фенольных групп в стабилизации структуры нативного яичного альбумина находится в противоречии с поведением фенольных групп в инсулине [85] и бычьем сывороточном альбумине [86], в которых эти группы могут обратимо ионизироваться без

денатурации белка. Такое поведение фенольных групп в яичном альбумине согласуется с тем, что эти группы не являются источником протонов при получении кривой титрования вплоть до pH, равного 12 [34].

Изменения физических свойств, которыми сопровождается процесс денатурации яичного альбумина, зависит в значительной степени от условий проведения процесса, как это показано по изменению вязкости и констант седиментации и диффузии. В то время как денатурация мочевиной не вызывает изменения молекулярного веса [52, 87], в других условиях наблюдается агрегация, приводящая к увеличению веса частиц в 2—20 раз [87, 88] по сравнению с молекулярным весом нативного яичного альбумина. Изменение электрофоретической подвижности невелико [88]. Растворимость денатурированного белка в изоэлектрической точке достаточно мала для использования этого свойства в целях разделения нативного и денатурированного яичного альбумина. Чик и Мартин [89], Льюис [90], Кубин [91] и позднее Гиббс, Бир и Норд [92] использовали это характерное различие для изучения кинетики денатурации. Реакция, по-видимому, протекает по уравнению первого порядка, хотя не было показано, что весь ход процесса денатурации можно описать таким простым путем. Другие методы изучения реакции денатурации приводят к различным значениям скоростей реакции и другим ее порядкам [93]. Вероятно, реакция «все или ничего» состоит из ряда стадий, которые протекают с различной скоростью. Если свойство, используемое для изучения реакции, изменяется главным образом на одной из этих стадий, то наблюдаемый порядок реакции будет зависеть от применяемого метода [93].

Яичный альбумин очень чувствителен к поверхностной денатурации при встряхивании [94, 94а]; небольшие количества нерастворимого денатурированного белка часто образуются в результате обычных лабораторных процедур, применяемых при получении этого белка при комнатной температуре. Даже без встряхивания яичный альбумин проявляет некоторую неустойчивость, как это можно видеть по увеличению светорассеяния со временем при 25—40° и появлению некоторого количества высокомолекулярных веществ на кривых седиментации при хранении раствора [62].

5) ПЛАКАЛЬБУМИН

Интересную ферментативную модификацию яичного альбумина описали Линдерштрём-Ланг и Оттесен [96]. Видоизмененную форму вначале выделили из растворов яичного альбумина, которые хранились в течение длительного времени в холодильнике и были заражены бактериями или плесенью. Полученные кристаллы имели форму пластинок в отличие от характерных иголочек яичного альбумина и поэтому получили название плакальбумина. Впоследствии

было показано, что яичный альбумин, инкубированный в течение непродолжительного времени с препаратом фермента из *Bacillus subtilis* или прямо зараженный этим организмом, образует плакальбумин с выходом до 90%. В процессе инкубирования выделяется 1% азота в виде соединений, растворимых в трихлоруксусной кислоте [96, 97]. Действие фермента заканчивается на стадии образования плакальбумина. При удлинении времени инкубирования получается меньше кристаллизующегося плакальбумина и больше небелкового азота.

Освобождающийся при этом небелковый азот состоит в основном из пептидов [97]. Три пептида—А, В и С, выделенные хроматографически, составляют около 90% этого азота [98]. Эти пептиды состоят из глицина, валина, аспарагиновой кислоты и аланина в отношении 1 : 1 : 1 : 3 для пептида А и 1 : 1 : 1 : 1 для пептида В; пептид С представляет собой аланилаланин. Последовательность аминокислотных остатков в пептидах А и В исследовали путем постепенного отщепления фенилизоцианатом аминокислоты от концевого остатка амина [99]. Пептид В был идентифицирован как аланилглицилвалиласпарагиновая кислота. Пептид А, по-видимому, имеет тот же аминокислотный состав, но выделяет аланилаланин на второй стадии расщепления. Карбоксипептидаза освобождает $^1/_3$ аланина, откуда следует, что пептид А, по-видимому, представляет собой аланилглицилвалиласпарагилаланилаланин. Возможно, что пептиды В и С получаются из пептида А до или после отщепления от яичного альбумина. С помощью карбоксипептидазы Штейнберг [44] установил, что С-концевой аминокислотой яичного альбумина является аланин. При аналогичной обработке плакальбумина оказалось, что аланин не является в нем преобладающей аминокислотой; это подтверждается и тем фактом, что гексапептид А отщепляется от С-концевого остатка молекулы яичного альбумина.

Плакальбумин отличается от яичного альбумина также своей большей растворимостью в сульфате аммония [100], иной подвижностью [73] и большей скоростью денатурации [70]. Подвижность плакальбумина смещена на 0,5—0,6 единицы в положительную сторону по сравнению с подвижностью яичного альбумина в интервале pH 3—7, а изоэлектрическая точка его выше на 0,14 pH [73]. Выше pH 7 подвижности обоих белков одинаковы. Кривые, полученные для плакальбумина, указывают на наличие двух компонентов—P_1 и P_2, соответствующих A_1 и A_2 у яичного альбумина. Таким образом, оба компонента яичного альбумина одинаково изменяются при действии фермента *B. subtilis*, и это подтверждается тем фактом, что плакальбумин не отличается от яичного альбумина по содержанию фосфора [96, 101]. Перлмен [70] обрабатывала плакальбумин фосфатазой из предстательной железы и кишечной фосфатазой и обнаружила изменения, точно соответствующие процессам, протекающим в яичном альбумине, как это было показано выше. Компо-

нент P_3, содержащий 1 атом фосфора на молекулу, можно получить путем обработки плакальбумина фосфатазой из предстательной железы или при действии фермента *B. subtilis* на A_3. Аналогично P_3 получается из P_2 или из A_3 при применении соответствующего фермента. Содержание фосфора не изменяется при образовании плакальбумина в результате инкубирования яичного альбумина с препаратом фермента [96]. В других опытах, в которых яичный альбумин непосредственно заражали *B. subtilis*, протекало дефосфорилирование и превращение в плакальбумин [101]. Дефосфорилирование наблюдалось также при хранении растворов яичного альбумина [75], при этом последний частично кристаллизовался в виде пластинок, а частично в виде игл. Вероятно, что здесь действует несколько ферментов, а может быть, даже ферменты из различных микроорганизмов. По-видимому, такие же изменения лежат и в основе наблюдений Мак-Ферсена, Моора и Лонгсвортса [72], которые показали, что компонент с подвижностью A_2 образуется при хранении растворов яичного альбумина при избытке формы A_1.

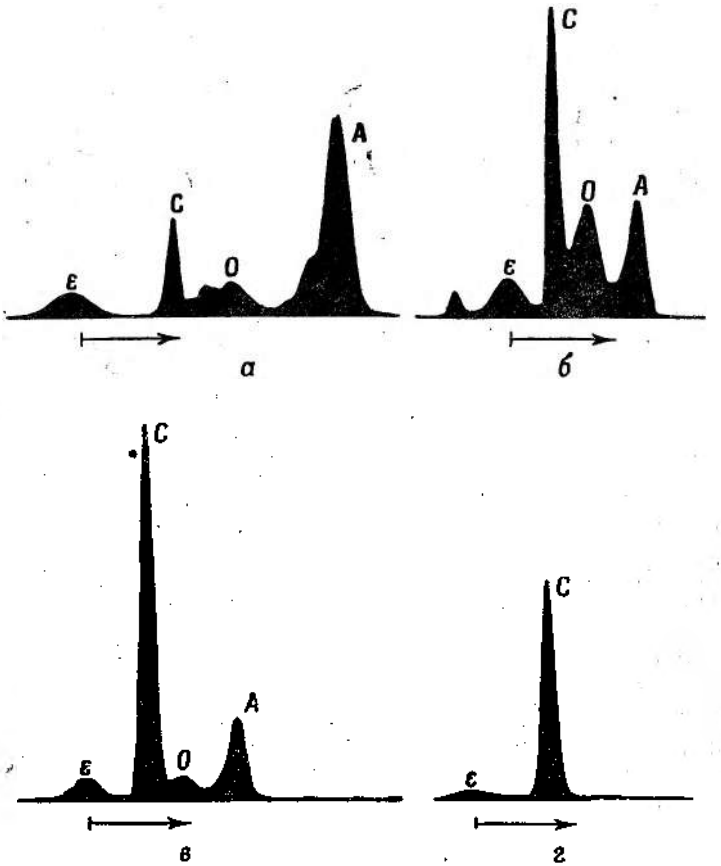
Гюнтельберг и Линдерштрём-Ланг [56] провели тщательное сравнение молекулярных весов плакальбумина и яичного альбумина, измеренных осмометрическим методом. Полученные ими значения равны 44 700 и 45 000 соответственно. Хотя разница находится в пределах ошибок опыта, эти данные согласуются с представлением о выделении пептида при переходе одного белка в другой. Гюнтельберг и Оттесен [102] получили в кристаллической форме фермент из *B. subtilis*, от которого зависит образование плакальбумина.

Б. Кональбумин

1) ПОЛУЧЕНИЕ

Осборн и Кэмпбелл [38] в 1900 г. отметили, что фракция альбумина из яичного белка содержит белок, который коагулирует при более низкой температуре по сравнению с яичным альбумином. Они назвали этот белок кональбумином. Его можно отделить от других белков только путем тепловой коагуляции. Тем не менее Осборн и Кэмпбелл показали, что белок отличается от яичного альбумина по элементарному составу и оптическому вращению. При изучении альбуминовой фракции яичного белка многие исследователи [3, 13, 19] характеризовали кональбумин как некристаллизующийся, коагулирующий при нагревании его компонент. Фракцию белка, соответствующую этому определению, можно получить путем тепловой коагуляции фильтрата после кристаллизации яичного альбумина. Фильтрат сильно загрязнен яичным альбумином, а также небольшими количествами глобулинов и овомукоида. Этим методом не удалось получить чистого препарата кональбумина.

Тем временем было установлено, что кональбумин обладает другими свойствами, которые позволяют отделить его в качестве индивидуального компонента яичного белка, а именно: 1) он не денатурируется при встряхивании в отличие от яичного альбумина, который при



Р и с. 80. Нисходящая электрофореграмма для фракций яичного белка и для комплекса железо-кональбумин в барбитуратном буфере при pH 8,6 и ионной силе 0,1 (по Уорнеру и Веберу [20])

а—яичный белок; *б*—первая фракция кональбумина; *в*—первый осадок со спиртом; *г*—кристаллический комплекс железо-кональбумин. Компоненты обозначены: кональбумин через С, яичный альбумин через А, овомуконд через О.

этом полностью осаждается [103]; 2) при хранении в обычных условиях при pH ниже 4 кональбумин переходит в другую форму, отличающуюся по растворимости и электрофоретическому поведению [11]; 3) он связывает ионы железа с образованием комплекса, окрашенного в красный цвет [104].

Устойчивость к поверхностной денатурации позволяет отделить кональбумин от яичного альбумина простым встряхиванием раствора до полного выделения альбумина с последующим фильтрованием [103]. Овомукоид нельзя отделить этим методом. Отделение от обоих белков проводится модифицированным кислотным способом, при котором кональбумин специфически осаждается из раствора при pH ниже 4 в присутствии ~1 *M* раствора NaCl или $(NH_4)_2SO_4$ [11, 104]. Однако полученный продукт не идентичен с нативным кональбумином по растворимости и по электрофоретическому поведению [11]. Бейн и Дейч [25] получили аморфный, но тщательно очищенный препарат кональбумина фракционированием спиртом; при этом белок не изменяется при низких значениях pH. Они исходили из сырой фракции кональбумина, выделенной из яичного белка, разбавленного в 5 раз, при pH 7,5 путем доведения концентрации спирта до 20%. Дальнейшая очистка сводилась к серии фракционирований при низкой температуре и переменных значениях pH, ионной силы и концентрации спирта. Полученный продукт, как это было показано методом электрофореза, не содержал других белков яичного белка.

Кристаллические препараты комплекса кональбумина с железом и белка, не содержащего металла, были выделены Уорнером и Вебером [20]. В качестве исходного материала использовали фильтрат после кристаллизации яичного альбумина [19] сульфатом аммония по стандартной методике. На рис. 80 показаны электрофореграммы, полученные на различных стадиях фракционирования по этому методу. Сырая фракция кональбумина осаждалась из этого фильтрата при добавлении сульфата аммония. Осадок растворяли и диализовали до удаления соли (см. рис. 80, *б*). Кональбумин осаждали из раствора при 0°, pH 6, концентрации NaCl 0,02 *M* и концентрации спирта 20% (см. рис. 80, *в*). Затем осадок растворяли и переводили в железный комплекс. После удаления небольшого количества примесей путем длительного диализа производилась кристаллизация комплекса в условиях, аналогичных первому осаждению спиртом (см. рис. 80, *г*). Белок, не содержащий металла (железо удаляли в виде цитрата на анионообменной колонке), кристаллизовали этим же методом. Кональбумин выделяли также в виде кристаллического комплекса с цинком [105].

2) ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ

Кональбумин, полученный по методу Уорнера и Вебера [20], представляет собой бесцветный белок с растворимостью, характерной для типичного альбумина. Растворимость железного комплекса значительно ниже, и при 0° это производное может быть выкристаллизовано из воды. Кональбумин электрофоретически однороден в ацетатном, какодилатном, фосфатном и вероналовом буферах при ион-

ной силе 0,1 в интервале pH 4,6—8,6. Соответствующие диаграммы показаны на рис. 80, *г*. Электрофореграммы, полученные при ионной силе 0,01 в изоэлектрической области с какодилатным буфером [20], имели другую форму. Причины такого поведения не совсем ясны; обычно его объясняют некоторой гетерогенностью. Андерсен и Альберти [106] установили для другого препарата наличие некоторой гетерогенности по размыванию границы.

В табл. 77 приведен молекулярный вес кональбумина, равный 87 000, рассчитанный Бейном и Дейчем [25] по результатам измерений седиментации и констант диффузии и принятому ими значению для парциального удельного объема. Розен [107] дает приблизительное значение 70 000 на основании измерений одной константы седиментации. Минимальный молекулярный вес из данных по связыванию металла составляет 38 300 [20, 105]. Таким образом, в качестве наиболее вероятной величины молекулярного веса можно принять 76 600.

Аминокислотный состав кональбумина приведен в т. I, гл. III. Найденные Зёренсеном [13] в кональбумине 2,8% углеводов представляют собой, вероятно, примеси в полученном препарате, так как в очищенном кональбумине углеводы не обнаружены [25]. Фрэнкель-Конрат и Портер [108] исследовали концевые аминогруппы динитрофторбензольным методом и установили, что в молекуле имеется одна такая группа, принимая молекулярный вес равным 87 000; эта группа была идентифицирована как аланин.

3) СВЯЗЫВАНИЕ МЕТАЛЛА КОНАЛЬБУМИНОМ

Способность кональбумина к связыванию металлов была установлена исследованиями Шейда и Каролина [109] антибактериальной активности яичного белка. Активность определяли по связыванию железа, которое делало белок неусвояемым для бактерий. Как показали Ольдертон, Уорд и Феволд [104], активным компонентом яичного белка оказался кональбумин. Эти свойства изучали также Уорнер и Вебер [105], а также Фрэнкель-Конрат и Финней [110]. Комплекс с железом окрашен в красновато-коричневый цвет с максимумом абсорбции при 470 *мμ**. В отсутствие агентов, образующих комплексы с железом, он устойчив при pH выше 5,5, но легко диссоциирует в более кислой среде. Кроме комплекса с железом, белок образует желтый комплекс с ионом меди с максимумом абсорбции при 440 *мμ* и бесцветный комплекс с ионом цинка. Стехиометрию связывания определяли титрованием белка, не содержащего

* Желтые или красноватые растворы или осадки, полученные на разных стадиях фракционирования яичного белка рядом авторов [3, 19, 26, 111], объясняются, вероятно, образованием комплексов кональбумина с железом. Железо же содержалось в виде примесей в сульфате аммония или в других применяемых солях.

металла, стандартным раствором железа или меди до точки максимальной экстинкции при 470 *мμ* или 440 *мμ* соответственно. Для каждого металла был получен четкий максимум связывания, соответствующий минимальному молекулярному весу, равному 38 300. Ион цинка связывается в таком же молярном соотношении, как это было найдено методом равновесного диализа. Учитывая молекулярный вес кональбумина, определенный по данным седиментации, можно сделать вывод (см. стр. 757), что молекула кональбумина связывает два иона металла. Поскольку медь замещает цинк в этом соединении, а железо замещает медь, то устойчивость этих комплексов должна возрастать в ряду железо > медь > цинк, и одни и те же участки белка могут связывать разные ионы [105]. Комплекс содержит также двуокись углерода в количестве, эквимолярном металлу [105, 112]. Двуокись углерода входит в состав комплекса в виде бикарбонатного иона. Это было установлено при изучении влияния карбоангидразы на скорость образования окраски при реакции двуокиси углерода с металлом [105]. Из этих соображений было сделано допущение, что бикарбонат связывается с металлом, образуя бикарбонатный координационный комплекс [105]. На основании сказанного выше, можно заключить, что кональбумин сходен с сывороточным глобулином крови человека в отношении связывания металла в β-положении [113].

Был предпринят ряд попыток идентификации реакционноспособных групп, связывающих металл. Фиала и Барк [114] высказали предположение, что здесь участвует оксиаминогруппа, но Фрэнкель-Конрат [115], работавший с оксиаминопроизводными белков и доказавший отсутствие этих групп в кональбумине, опроверг это предположение. Фрэнкель-Конрат и Финей [110] изучали влияние изменения различных функциональных групп в боковых цепях в результате различных химических реакций на связывание металла. Поскольку способность связывать металл особенно чувствительна к реакциям, затрагивающим аминогруппы, все химические изменения, как и денатурация, вызывают потерю этой способности. Таким образом, невозможно указать какую-нибудь одну или ограниченное число групп, обусловливающих эти реакции. Уорнер и Вебер пришли косвенным путем к выводу о природе этих групп. Они показали, что комплекс кональбумина с железом более отрицателен, чем не содержащий металла белок, в интервале pH 5,5—8,5 [20]. Из сопоставления электрофоретических данных и кривых титрования следует, что эта разность составляет—1 на группу, связывающую металл, или—2 на молекулу. Больший отрицательный заряд металлического комплекса является следствием связывания иона бикарбоната и замещения протонов в группах, где происходит связывание металла. Последнее было измерено количественно следующим образом: к раствору кональбумина при pH 8,5 добавляли соль соответствующего иона металла и затем определяли

объем стандартного раствора щелочи, необходимого для доведения pH до прежнего значения. Атом железа замещает 3 протона, а атом меди —2 протона. Поскольку тот же результат был получен при pH 9,5, pK групп, в которых замещается протон, должно быть выше 10. Это значение pK, по-видимому, близко к 11, так как подвижность железного комплекса становится равной подвижности свободного белка приблизительно при этом значении pH. Такое высокое значение pK указывает на то, что замещение протона при образовании металлического комплекса происходит в фенольных группах. Участие именно этих групп подтверждается изменением абсорбции при 280 $m\mu$ в комплексе железо-кональбумин по сравнению с чистым кональбумином. Число фенольных групп, участвующих в этой реакции, не установлено, поэтому не исключено также участие аминогрупп [105].

Было измерено обратимое равновесие диссоциации для железного и медного комплексов при условии постоянства парциального давления двуокиси углерода и присутствия цитратных ионов в качестве вещества, конкурирующего за связывание металла [105]. Были получены также кривые зависимости связывания кональбумина от pH в различных условиях. Кривые очень круто наклонены по отношению к оси pH, так что при изменении pH на 0,5 единицы количество связанного кональбумина возрастает от 10 до 90%. Анализ факторов, определяющих форму кривых, приводит к выводу, что в молекуле связывание происходит на двух участках, взаимодействующих таким образом, что второй ион металла присоединяется легче, чем первый. Следовательно, комплексы с 2 ионами металла на молекулу образуются за счет комплексов, содержащих только 1 ион в молекуле.

4) КИСЛОТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ КОНАЛЬБУМИНА

Реакция модификации кональбумина в кислой среде описана Лонгсвортсом, Кеннеком и Мак-Иннесом [11]. Они показали, что если pH альбуминовой фракции яичного белка, полученной осаждением сульфатом аммония или сульфатом натрия, довести до значения ниже 4 в присутствии соли, то постепенно выпадает осадок видоизмененного кональбумина. При изучении последнего методом электрофореза при pH выше 4 было установлено, что он состоит из двух компонентов—C_1 и C_2 (рис. 81). Относительные количества этих компонентов изменяются в зависимости от pH, как видно из рис. 81. Компонент, присутствующий в бо́льших количествах в более щелочном растворе (C_1), обладает подвижностью, равной подвижности кональбумина в исходном яичном белке. Соотношение между C_1 и C_2 изменяется также в зависимости от времени хранения после доведения pH до значения выше 4. По мере удлинения времени хранения накапливается компонент C_1. Авторы пришли к выводу,

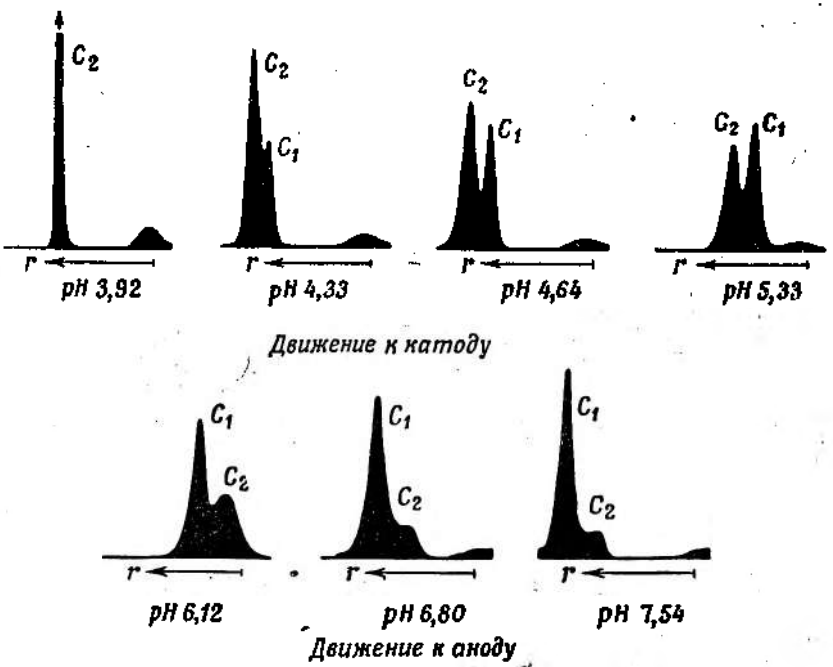


Рис. 81. Электрофореграммы (нисходящие границы) при разных pH для кональбумина, полученного осаждением в присутствии соли при pH ниже 4 (по Лонгсворту [11]).

что видоизмененная форма кональбумина, образующаяся при низких pH и отличающаяся от нативного белка по растворимости и подвижности, при более высоких значениях pH обращается, по крайней мере частично, в белок с исходными свойствами.

В. Лизоцим

1) ПОЛУЧЕНИЕ

Литическая активность яичного белка по отношению к некоторым бактериям была установлена Флемингом [116], который предложил термин «лизоцим» для активного компонента. Очищенный лизоцим получали путем нескольких операций осаждения спиртом или ацетоном и очистки в форме флавианта [117, 119]. Абрахам и Робинсон [119] выделили кристаллический препарат из концентрированного раствора, приготовленного одним из таких методов. Однако ни одна из этих методик не является удовлетворительной с точки зрения выхода и воспроизводимости. Лучший метод получения кристаллического лизоцима предложили Олдертон, Уорд и Феволд [24]. По этому методу лизоцим адсорбируется на бентони-

товой глине непосредственно из яичного белка. Бентонитовую глину промывают фосфатным буфером с pH 7,5 и 5-процентным водным пиридином при том же pH для удаления других белков. Лизоцим элюируют 5-процентным водным пиридином при pH 5,0. Значение pH в этом методе имеет решающее значение, так как при pH 4 или 6 элюируется очень мало активного материала. Элюированный белок представляет собой относительно чистый лизоцим. Его можно отделить от пиридина диализом и затем сконцентрировать путем высаливания сульфатом аммония или высушить в замороженном состоянии. Лизоцим можно выкристаллизовать из ацетатного буфера, содержащего 5% NaCl, при pH 4,5. Впоследствии было установлено, что лизоцим можно кристаллизовать непосредственно из яичного белка, содержащего 5% NaCl, при pH 9,5 и 4° путем затравки кристаллами [23]. Кристаллы лизоцима можно получить при разных условиях в интервале pH от 3,5 до 11 в присутствии 5% NaCl. До pH 6 кристаллы хлорида лизоцима получаются в виде тетрагональных бипирамид. В более щелочной области получаются орторомбические иглообразные кристаллы [23, 120]. Последние представляют собой изоэлектрический лизоцим, хотя в кристаллах при pH 8,2 содержится 1,99% связанного хлорида. Эта величина лишь немногим меньше значения 3,24%—количество хлорида, которое связывается при pH 4,3. Соли лизоцима с другими анионами, такими, как иодид, бромид, нитрат и карбонат [23], также легко кристаллизуются.

2) СОСТАВ

Льюис с сотрудниками [36] изучали аминокислотный состав белка главным образом в целях определения его молекулярного веса. Эти результаты хорошо согласуются с данными Арчер и др. [121] (см. т. I, гл. III). Путем выделения α, ε-ди-ДНФ-лизина из гидролизата лизоцима после реакции с динитрофторбензолом [122, 123] было установлено, что на молекулу приходится одна концевая аминогруппа лизина. При изучении продуктов частичного гидролиза динитрофенилпроизводных лизоцима был обнаружен α, ε-ди-ДНФ-лизилвалилфенилаланилглицин [124]. Последовательность аминокислот в тетрапептиде была установлена путем выделения α, ε-ди-ДНФ-лизилвалилфенилаланина и α, ε-ди-ДНФ-лизилвалина из гидролизата лизоцима. Эта структура подтвердилась результатами анализа продуктов гидролиза выделенного тетрапептида и сравнением со свойствами синтетического пептида. Полученные данные позволяют установить последовательность чередования первых четырех аминокислот в аминном конце пептидной цепи. Применение карбоксипептидазы [125, 126] дало возможность установить, что карбоксильная концевая группа представляет собой лейцин. Арчер с сотрудниками [127] изучал пептиды, выделяющиеся при частичном гидролизе лизоцима в 10 н. растворе соляной кислоты

при 37° в течение 8 дней. Методом хроматографии на силикагеле было выделено несколько основных пептидов, содержащих аргинин или лизин на конце цепи. Пептиды с более короткой цепью (от 2 до 6 остатков) содержат глицин, серин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, треонин, цистин и аланин, а также основания. Пептиды с большей длиной цепи содержат все аминокислоты, присутствующие в лизоциме.

Фрэнкель-Конрат с сотрудниками [128] установил наличие одной пептидной цепи в лизоциме. Эти авторы восстанавливали дисульфидные связи в цистине тиогликолем и стабилизировали полученные сульфгидрильные группы путем алкилирования иодацетамидом. При этом, по-видимому, прореагировал весь цистин, и образовалось ожидаемое количество дополнительных амидных групп. Молекулярный вес продукта оставался неизменным, как показали измерения осмотического давления. Был сделан вывод, что в лизоциме имеется одна пептидная цепь, связанная перекрестно дисульфидными связями пяти остатков цистина.

3) СВОЙСТВА И ГОМОГЕННОСТЬ

Лизоцим является основным белком с изоэлектрической точкой выше pH 11 [16, 24]. Он растворим в воде при pH 4—6, но кристаллизуется из 5-процентного раствора NaCl или другой соли при pH 3,5—11. Более низкие выходы кристаллов получаются в интервале pH 5—7. Растворимость при pH 10,5 в 5-процентном растворе соли составляет около 0,1% [23].

Лизоциму соответствует пик, обозначенный G_1, на электрофореграмме Лонгсвортса, Кеннена и Мак-Иннеса [11] (см. рис. 77). На электрофореграммах для кристаллического лизоцима наблюдается только один пик, но наличие некоторого обратимого размывания границы [106] и невозможность достижения стационарного переноса [16] указывают на неоднородность лизоцима. Теллен и Стейн [129] показали, что лизоцим содержит два или три компонента, которые могут быть разделены на колонке из ионообменной смолы, проявленной 0,2 *М* фосфатным буфером при pH 7,18. Состав кристаллического карбоната лизоцима изменялся при хранении в твердом состоянии при комнатной температуре в течение 258 дней. Вначале содержание компонента, соответствующего пику А (последний пик, получающийся при элюировании), составляло 93%, а после хранения—41% А, 41% В (промежуточный пик) и 18% С (первый пик при элюировании). Вместе с тем на электрофореграммах в вероналовом буфере при pH 7,82 появился пик, который отсутствовал вначале и который соответствовал компоненту с меньшей подвижностью, чем подвижность основного компонента. Все три компонента обладали одинаковой ферментативной активностью; В и С, по-видимому, обладали более кислыми свойствами, чем А. Изоэлек-

трический лизоцим, выделенный путем кристаллизации непосредственно из раствора, содержал больше компонента А (до 95%) и был устойчив при комнатной температуре. Перемещение хроматографического пика и изменение литической активности яичного белка происходит с таким же отставанием, как и у компонента А из кристаллического материала.

Джонс [130] провел кристаллографическое изучение тетрагональных бипирамид хлорида лизоцима. Кристаллы обнаруживают интерференционные фигуры, характерные для одноосного кристалла (+). Показатель преломления их изменяется в зависимости от содержания воды, но двойное лучепреломление остается постоянным и равняется приблизительно 0,003. Пальмер с сотрудниками [120] определили размеры элементарной пространственной ячейки воздушно-сухих кристаллов тетрагонального типа методом рентгеноструктурного анализа. Определялись также содержание воды и плотность с учетом NaCl, присутствующего в кристаллах. Был сделан вывод, что в одной ячейке содержится 8 молекул и что молекулярный вес лизоцима составляет $13\,900 \pm 600$. Значения молекулярного веса, полученные Онклеем [66] из данных по седиментации и констант диффузии, были пересчитаны, исходя из парциального удельного объема 0,722, измеренного Уэтером и Дейчем [16]. При этом было получено значение 14 800, приведенное в табл. 77. Значение молекулярного веса 17 200, рассчитанное Уэтером и Дейчем [16], основывается на более высоких значениях константы седиментации и более низкой константе диффузии по сравнению с приведенными в табл. 77. Другие значения молекулярного веса—17 500 [24] и 16 600 [68] были получены из измерений осмотического давления, 17 500 [24] и 16 600 [68]—из аналитических данных и 14 800 [57]—из измерений светорассеяния. Осмотические данные, по-видимому, несколько завышены вследствие частичной проницаемости мембран для низкомолекулярного лизоцима. Аналитические данные основаны главным образом на содержании гистидина, при этом допускается, что одна молекула белка содержит один остаток этой аминокислоты. Они очень хорошо согласуются с другими аналогичными данными и со значениями, полученными из измерений константы седиментации, приведенными в табл. 77. Это совпадение позволяет принять значение 14 800 в качестве наиболее вероятной величины.

Литическая активность лизоцима исчезает при взаимодействии двух свободных аминогрупп с уксусным или янтарным ангидридом, а также при этерификации свободных карбоксильных групп метиловым спиртом. Применение других реагентов, таких, как формальдегид или амины, которые связывают амидогруппы или группы гуанидина, и концентрированной серной кислоты, которая этерифицирует алифатические гидроксильные группы, также вызывает инактивацию. Поскольку почти каждое из таких изменений приводит

к потере активности, нельзя сделать вывод о специфической роли каких-либо отдельных групп в этом процессе. Обработка иодом приводит к частичной инактивации, которая в некоторой степени обращается при действии восстановителей. Такое поведение, по-видимому, связано с наличием в молекуле белка одной имидазольной группы [132].

Г. Овомукоид

1) ПОЛУЧЕНИЕ

В 1890 г. Неймейстер [133] впервые указал на присутствие в яичном белке белкового вещества, которое не коагулирует при нагревании. Благодаря легкости отделения этого белка от компонентов, осаждающихся при нагревании, он был изучен значительно раньше других белков яйца; особенно следует отметить работу Мёрнера [21], который установил, что этот белок представляет собой глюкопротеид, и предложил для него термин «овомукоид». После тепловой коагуляции большей части белковых веществ яичного белка или в фильтрате после выделения кристаллического яичного альбумина сульфатом аммония остается раствор, содержащий один овомукоид. Этот белок можно выделить из растворов, не содержащих солей, путем добавления нескольких объемов спирта, насыщением сульфатом аммония или добавкой сульфата натрия (320 *г* на 1 *л* раствора) [3, 11, 21, 38]. При нагревании до 75—100°, при котором происходит тепловая коагуляция остальных белков, свойства овомукоида заметно не изменяются. Однако для отождествления вещества, ингибирующего активность трипсина, с овомукоидом следует применять более мягкие методы выделения.

О наличии ингибитора трипсина в яичном белке было известно уже очень давно, и имелись основания связывать эту активность с мукоидом [134, 135]. Эта связь была доказана для большей части овомукоида яичного белка в работе Лайнуивера и Мюррея [67]. Для выделения овомукоида они использовали его способность к растворению в трихлоруксусной кислоте. pH яичного белка доводили до значения 3,5 добавлением равного объема смеси 7 объемн. ч. 0,5 *М* раствора трихлоруксусной кислоты и 2 объемн. ч. ацетона. Овомукоид осаждали из фильтрата ацетоном (2—2,5 объемн. ч.). Продукт подвергали диализу для удаления трихлоруксусной кислоты и снова осаждали ацетоном. Делались попытки выделить вещество, обладающее антитриптической активностью, из конечного продукта путем фракционного осаждения сульфатом аммония или ацетоном. Все фракции обладали одной и той же удельной активностью, на основании чего был сделан вывод, что активность характерна для овомукоида. Фредерик и Дейч [22] применили другой метод выделения овомукоида. Они осаждали другие белки добавлением 10-процентного раствора трихлоруксусной кислоты

с pH, равным 3,0, к равному объему яичного белка, pH которого был предварительно доведен до значения 3,5 серной кислотой. Овомукоид выделяли из фильтрата осаждением этиловым спиртом. Фредерик и Дейч изучили влияние pH на начальную стадию выделения и выяснили, что значение pH 3,5 является оптимальным для обеих стадий: выделения овомукоида и осаждения других белков. Дополнительное фракционирование этиловым спиртом, проведенное при низкой температуре, приводит к частичному разделению двух трудно отделимых компонентов, обнаруживаемых на электрофореграммах.

2) СОСТАВ

Для углеводного состава овомукоида были получены различные данные [1]. Более поздние определения [22, 67, 136] совпадают с данными Мейера [137], согласно которому содержание углевода в овомукоиде составляет 22—26%. По Мейеру [137], этот углевод состоит из N-ацетилглюкозамина и маннозы в молярных отношениях 1 : 1. В более ранней работе Левен и Мори [39] пришли к выводу, что трисахарид, выделенный ими из овомукоида, содержит глюкозамин и маннозу в отношении 1 : 2. Они сообщили также об отсутствии ацетильных групп, но Мейер [137, 138] высказал предположение, что эти группы могли быть удалены в процессе получения препарата. Присутствие галактозы было установлено рядом исследователей [13, 139]. Полный аминокислотный состав приведен в работе Льюиса с сотрудниками [36] (см. т. 1, гл. III). Был сделан вывод, что эти определения дают возможность предполагать, что в овомукоиде содержание углеводов значительно больше, чем было установлено путем анализа. Фрэнкель-Конрат и Портер [108] нашли, что в гидролизате динитрофенилпроизводных овомукоида в 1 моле (28 000 *г*) белка содержится 0,64—0,94 моля динитрофторалаанина. Эти данные указывают на наличие одной концевой аминогруппы аланина. Поправка на деструкцию концевых групп, образующихся в процессе гидролиза, была больше, чем обычно, вследствие высокого содержания углеводов в этом белке. Концевой группой в карбоксильном конце пептидной цепи, по данным Пеннасе и др. [140], является фенилаланин. Овомукоид восстанавливали литийалюминийгидридом [141] и подвергали гидролизу; аминоспирт фенилаланиноль был выделен методом хроматографии. Найденное его количество (0,8 моля на 28 000 *г*) показывает, что присутствует только одна концевая группа.

3) СВОЙСТВА

Препарат овомукоида, осажденный сульфатом натрия после тепловой коагуляции других белков, дает только один пик на электрофореграммах, полученных при ионной силе 0,1 в интервале

pH 3,9—6,8. Однако обратимое размывание границы в 0,1 *М* растворе ацетата натрия при pH 5,32 очень заметно, что указывает на электрофоретическую неоднородность белка [11]. Для овомукоида, полученного Фредериком и Дейчем [22], обнаружено два трудно разделяющихся пика в вероналовом буфере при pH 8,6 и ионной силе 0,1. Эти пики частично разделяются при дальнейшем фракционировании. Обратимое размывание границы наблюдается не больше, чем у многих других очищенных белков, и результаты Лонгсвортса, Кеннена и Мак-Иннеса [11], вероятно, являются следствием применения нагревания в процессе получения. При снижении ионной силы до 0,1 при pH 8,6, 4,5 и 4,0 были получены иные электрофореграммы, на которых наблюдается не менее пяти границ. Причины этого еще не вполне выяснены, но оно, несомненно, указывает на неоднородность образца. Аналогичные кривые получили Бир, Дук, Гиббс и Норд [142] при ионной силе 0,01 в ацетатном буфере при pH 4,22. Они отделили один из основных компонентов методом электрофоретической конвекции и нашли, что он имеет такую же антитриптическую активность, как и остаточный овомукоид, из которого этот препарат был выделен, и как нефракционированный белок. Неоднородность не была обнаружена при седиментационных исследованиях, проведенных в интервале pH 1,4—11,6 [23, 142, 143]. Молекулярный вес, рассчитанный из констант седиментации и диффузии, полученных Фредериком и Дейчем, оказался равным 27 000 (см. табл. 77), что хорошо согласуется с осмометрическими данными Лайнуивера и Мюррея (28 800) [67]. Результаты аминокислотного анализа Льюиса с сотрудниками [36] также находятся в соответствии с этой величиной, хотя следует отметить, что доля триптофана, на которую они указывают (0,4 на 28 800 *г*), может быть результатом присутствия нескольких компонентов в этом препарате.

Влияние нагревания на овомукоид показывает, что отсутствие заметных изменений растворимости белка при нагревании не является достаточным критерием для установления нативного строения. Уже давно предполагалось, что, поскольку овомукоид не коагулирует при нагревании, он и не денатурируется. Однако нагревание растворов овомукоида до 100° при различных значениях pH вызывает потерю антитриптической активности. В интервале pH 3—6 теряется около 50% активности в течение 0,5 часа и 90% — в течение 2 час. При pH 9 инактивация происходит легче. Наряду с этим наблюдаются и другие изменения, обычно сопровождающие денатурацию, например повышение чувствительности к гидролизу химотрипсином и заметное изменение реакционной способности дисульфидных связей [67]. При нагревании в этих условиях происходит также некоторое изменение физических свойств [22]. После нагревания отмечены небольшое падение константы седиментации, повышение изоэлектрической точки и вязкости. Нативный и прогретый овомукоиды очень хорошо растворимы в воде, но их концентри-

рованные растворы желатинируются при определенных условиях, обычно с частичной потерей активности. Желатинирование в щелочном растворе приводит к инактивации и появлению продуктов, нерастворимых в воде [67].

Фрэнкель-Конрат с сотрудниками [144] изучал влияние на антитриптическую активность различных реагентов, блокирующих или разрушающих функциональные группы овомукоида. Потеря активности происходит при замещении карбоксильных, амино- или гуанидиновых групп. Менее заметный эффект наблюдается в результате реакций, затрагивающих амидные или алифатические гидроксильные группы; взаимодействие с амино- или имидазольными группами не влияет на активность. Восстановление дисульфидных связей вызывает инактивацию. Отмечена интересная связь между аминогруппами овомукоида и трипсина. Ацетилирование этих групп не влияет заметным образом на антитриптическую активность овомукоида и протеолитическую активность трипсина. Однако ингибирование трипсина овомукоидом прекращается при ацетилировании трипсина. На этом основании был сделан вывод, что овомукоид соединяется с группами трипсина, отличными от групп, определяющих протеолитическую активность. Подтверждение этих данных было получено при изучении кинетики процесса, которое показало, что ингибирование не носит конкурентного характера с субстратом.

Д. Авидин

Показано, что присутствие в яичном белке фактора, связывающего биотин, в результате чего последний становится физиологически недоступным, является причиной «болезни яичного белка» у крыс [111]. Это заболевание, вызванное недостатком витамина, сопровождается дерматитом, полысением и потерей мускульной координации [145]. Этот фактор в яичном белке Икин, Снелл и Вильямс [111] назвали «авидином». Они установили его белковую природу и получили препараты, содержащие его в 600 раз больше, чем яичный белок. По методике этих авторов авидин экстрагируется 2-процентным раствором сульфата аммония из осадка, полученного при обработке яичного белка двумя объемами ацетона. Активный материал очищается фракционированием при высоких концентрациях сульфата аммония. Позднее Пеннингтон и др. [17] выделили кристаллический авидин, приготовленный по этому методу, путем высаливания сульфатом аммония. Волей и Лонгсворте [18] в результате аналогичного фракционирования получили продукт, дающий один основной электрофоретический пик и один второстепенный пик, соответствующий небольшому количеству примеси с высокой подвижностью. Изучение проводилось в нескольких буферах при ионной силе 0,1 в интервале pH 1,05—10,35. Изоэлектрическая

точка активного компонента оказалась выше 10, в то время как у примеси она лежит в интервале pH 3,6—5,3.

Фрэнкель-Конрат с сотрудниками [146] выделил три формы авидина: нерастворимый в воде, представляющий собой комплекс с нуклеиновой кислотой—авидин NA; растворимый белок, полученный в результате диссоциации этого комплекса—авидин А; другой комплекс авидина с кислым глюкопротеидом—авидин ХА. Материал, выделенный в более ранних работах, был нерастворим в воде и представлял собой, по-видимому, авидин NA. Этот комплекс диссоциирует при электрофорезе и дает основной пик, соответствующий авидину А, и второстепенный—для нуклеиновой кислоты, что соответствует наблюдениям Волея и Лонгсвортса, произведенным с их препаратом. Эти вещества были получены адсорбцией их из яичного белка бентонитом—метод, применяемый для выделения лизоцима [24] (см. раздел 2, В). Авидины NA и ХА, но не лизоцим, были элюированы 1 *М* раствором K_2HPO_4. При диализе элюата осаждается авидин NA. Авидин ХА получается из фильтрата в виде фракции, осаждающейся 2,5 *М* или насыщенным сульфатом аммония. Оба препарата очищали путем вторичного фракционирования сульфатом аммония при концентрации от 2,8 *М* до насыщения. Авидин А получали из фильтрата после растворения авидина NA в 2,5 *М* сульфате аммония и осаждения при диализе.

Авидин NA содержит около 10% дезоксирибонуклеиновой кислоты [146]. О типе нуклеиновой кислоты судили по результатам гидролиза авидина дезоксирибонуклеазой, но не рибонуклеазой, по присутствию тимина и при помощи реакции с дифениламином на дезоксипентозу. Хотя нуклеиновая кислота может диссоциировать из комплекса в растворах солей, она не замещается при добавлении в яичный белок меченной P^{32} дезоксирибонуклеиновой кислоты из селезенки мыши до выделения авидина NA. Авидин, по-видимому, проявляет специфическое сродство к дезоксирибонуклеиновой кислоте яичного белка. Аминокислотный состав авидина NA установили Льюис с сотрудниками [36] (см. т. I, гл. III). Анализы авидина А были выполнены Фрэнкель-Конратом с сотрудниками [147]. Наряду с аминокислотами авидин содержит углеводы (см. табл. 78). Более

Таблица 78

СОСТАВ ПРЕПАРАТОВ АВИДИНА [148]

Препараты	Состав, %		
	азот	гексоза	гексозамин
Авидин А	13,8	4,7	4,0
Авидин NA . . .	14,2	3,8	4,5
Авидин ХА . . .	11,8	7,2	3,6

высокое содержание гексозы и более низкое азота у авидина XA, по-видимому, связано с присутствием в комплексе глюкопротеида X. Оба сахара—манноза и галактоза—были идентифицированы хроматографически в гидролизатах авидина XA, в то время как в других препаратах содержалась только манноза [147]. При определении концевых аминогрупп в авидинах A, NA и XA динитрофторбензольным методом получаются различные результаты главным образом из-за неустойчивости концевой группы, образующейся, когда белок гидролизуется в присутствии углеводов. В качестве единственной концевой аминогруппы был найден аланин в количестве 1,7—3,3 остатка на молекулу с мол. весом 60 000.

Розен [148] показал, что препарат Волея и Лонгсвортса однороден при исследовании в ультрацентрифуге и дает константу седиментации, равную 4,75 *S*. Для авидина NA и авидина A были получены значения 4—4,5 *S* [149]. Эти константы седиментации соответствуют молекулярному весу 40 000—70 000, если принять сферическую форму молекулы. По осмометрическому методу получены значения 66 000 для авидина NA и 68 000 для авидина A [68]. 1 *мг* авидина NA связывает около 8 *мг* биотина, что эквивалентно молекулярному весу 30 000 [146]. По-видимому, 1 молекула авидина связывает 2 молекулы биотина.

Изменение авидина в результате различных химических реакций, затрагивающих амино-, карбоксильную, фенольную, имидазольную и дисульфидные группы, не влияет на его способность к связыванию биотина [147]. Авидин не изменяется при обработке 1 *M* кислотой или щелочью в течение 4 час. при 23°, но слабо инактивируется 0,02 *M* кислотой или щелочью при 36°. При последних условиях приобретается дополнительная устойчивость при добавлении биотина в результате образования комплекса биотин-авидин [147]. Этот комплекс устойчив также к действию протеолитических ферментов. Биотин не отделяется даже при действии пепсина, трипсина, экстракта поджелудочной железы, папаина или различных тканевых экстрактов [150]. Авидин, однако, слегка инактивируется при хранении в разбавленных водных растворах в присутствии следов тяжелых металлов [146].

E. Овомуцин

Осадок, выделяющийся при разбавлении яичного белка водой или разбавленными растворами солей, состоит из глюкопротеида и обозначается термином «овомуцин» [38, 151] (овомукоид-β —по терминологии Мейера [138]). Овомуцин осаждается также с глобулинами при обработке яичного белка полунасыщенным раствором сульфата аммония. Он образует очень плотный осадок, который трудно снова растворить в каком-либо растворителе. Подобными методами трудно количественно отделить овомуцин от глобулинов.

Осборн и Кэмпбелл [38], а также Юнг [152] полагали, что глобулины вообще отсутствуют в яичном белке. При электрофорезе было обнаружено три компонента глобулина [11], поэтому весьма вероятно, что многие препараты овомуцина содержат значительное количество глобулинов. Это подтверждается тем фактом, что количество овомуцина в яичном белке часто оценивается от 4 [138, 152] до 7% [38] всех белков, в то время как при определении другими методами получается только 1—2% [8, 12, 13]. Препараты Осборна и Кэмпбелла [38], из которых выделяется наибольшее количество белка, называемого овомуцином, получены из осадка после добавления к яичному белку сульфата аммония до полунасыщения. Этот осадок обрабатывали водой, причем нерастворимая часть отделялась и овомуцин осаждали диализом. Зёренсен [13] пытался удалить возможно большее количество глобулина путем экстрагирования осадка после обработки сульфатом аммония разбавленным раствором соли и затем водой. Осадок, составлявший 1,9% общего белка, считали овомуцином. Аналогичный метод применяли Гектоен и Коул [3]. Продукт, полученный этими авторами и Зёренсеном, растворяется в щелочи или соде с образованием опалесцирующих растворов.

Необходимость изменения методики выделения овомуцина была вызвана данными, полученными Ленни и др. [8], согласно которым яичный белок содержит ингибитор агглютинации эритроцитов вирусом гриппа и этот ингибитор содержится в фракции овомуцина. Овомуцин получали добавлением к яичному белку 0,1 *М* раствора KH_2PO_4 (1 : 7) при конечном pH, равном 5,7. Осадок промывали фосфатным буфером при том же pH. Затем его суспендировали в 0,06 *М* фосфатном буфере при pH 7,2 и осаждали KH_2PO_4. Повторение этого цикла дает продукт, активность которого в 62 раза выше по сравнению с активностью яичного белка (в пересчете на азот). Следовательно, фракция, которая обусловливает активность, не может содержать больше 1,6% азота яичного белка. Было установлено, что ингибитор может быть удален прямым центрифугированием при больших скоростях яичного белка, разбавленного в 5 раз 0,06 *М* фосфатным буфером, при pH 7,2. Продукт был достаточно хорошо растворим (0,2%) при pH 7,2, что позволяет исследовать его различными физическими методами. При исследовании в ультрацентрифуге на диаграммах получается один пик, но соответствующая ему константа седиментации изменяется при разбавлении, нагревании и хранении [153]. Аналогичное значение константы, равное 31 *S*, было рассчитано из измерений активности и электрофоретической подвижности. При электрофорезе в фосфатном буфере при pH 7,2 и ионной силе 0,1 было обнаружено три компонента [154], причем только два из них содержат ингибитор активности. Пик, соответствующий наиболее медленному компоненту, характеризуется подвижностью того же порядка, что и для

овомукоида и глобулинов, в то время как соседний пик отвечает медленному компоненту, подвижность которого приблизительно равна подвижности яичного альбумина. Этим, по-видимому, объясняется невозможность получения отдельного пика для овомуцина в цельном яичном белке. Однако пик, соответствующий наиболее быстрому компоненту, должен был бы обнаружиться; Шарп и др. [154] объясняют его отсутствие на кривых яичного белка тем, что он образуется в процессе выделения при диссоциации одного из указанных выше компонентов. Концентрация ингибитора в толстом слое яичного белка заметно выше, чем в тонком [8]. Был сделан вывод, что овомуцин следует рассматривать как смесь ингибитора и других высокомолекулярных мукопротеидов.

Форзит и Фостер [12] также пытались выделить овомуцин непосредственно центрифугированием и получили препарат, содержащий 1,1% белков яичного белка. Он не образовывал прозрачных растворов ни в одном растворителе, за исключением яичного белка. Учитывая данные Шарпа и др. [154], интересно отметить, что в яичном белке электрофоретический пик, соответствующий овомуцину, не обнаруживается даже при обогащении белка 25-кратным количеством выделенного из них материала.

До настоящего времени нет достаточных сведений по аминокислотному составу овомуцина. Некоторые данные приведены в табл. 79. В таблицу включен анализ халазы по Юнгу [152], чтобы проиллюстрировать близость этих структур к овомуцину.

Таблица 79

Компонент	Состав овомуцина, %				Состав халазы, %
	Юнг [152]	Мейер [138]	Ленни и др. [8]	Зёренсен [13]	Юнг [152]
Азот	12,5	12,1—13	12,5		13,3
Сера	1,73		2,4		1,08
Цистин	4,57				4,1
Гексозамин	11,0	7,8—9,3			11,4
Гексоза (метод с орцинолом)			10,3	14,9	
Всего углеводов в виде восстановленного сахара		17,1—19,1			

Ж. Глобулины

Гектоен и Коул [3] впервые доказали наличие глобулинов в белке яиц. Одни авторы признавали их присутствие, другие отрицали. Эта неопределенность была в основном результатом наличия ово-

муцина и более растворимых альбуминов в глобулиновой фракции, получаемой при обработке полунасыщенным раствором сульфата аммония. На электрофореграммах Лонгсвортса, Кеннена и Мак-Иннеса [11] выявлено наличие трех компонентов в яичном белке, обозначенных как G_1, G_2 и G_3, относящихся в основном к глобулиновой фракции. Из них G_1 представляет собой лизоцим [24]. Некоторые данные по растворимости этих компонентов показывают, что G_1 и G_3 обнаруживаются в овомуциновой фракции, полученной при диализе или разбавлении яичного белка, но экстрагируются из него разбавленными растворами солей. G_2 остается в растворе в присутствии других белков яичного белка, но легко осаждается при диализе фракционированного препарата [11].

О других свойствах этих глобулинов известно очень мало. Можно предположить, что один или оба глобулина—G_2 и G_3—являются глюкопротеидами. Зёренсен [13] указывает, что в плохо очищенных препаратах глобулина содержится 4% маннозы. Мейер [138] отмечает, что только часть гексозамина яичного белка входит в состав известного глюкопротеида. Кроме того, при анализе неочищенного овомуцина, загрязненного глобулинами, не обнаружено меньшего содержания углеводов по сравнению с более очищенным препаратом (см. табл. 79).

3. Ферменты

Яичный белок отличается от других животных тканей исключительно низким содержанием ферментов. Хотя бóльшая часть его компонентов обладает специфическими биологическими свойствами, к ферментативным свойствам в широком смысле слова можно отнести только литическую активность лизоцима. Лайнуивер с сотрудниками [155] провел тщательное исследование многих ферментов, относительно которых предполагалось, что они присутствуют в малых количествах. Более ранняя литература приведена в работе этих авторов. Они не смогли подтвердить некоторые данные более ранних работ и полагали, что присутствие загрязнений в виде микроорганизмов и другие экспериментальные трудности являются причиной этих ошибочных заключений. В небольших количествах были найдены трибутириназа, пептидаза и каталаза. Только каталаза присутствует в белке в большем количестве, чем в желтке. Амилаза, фосфатаза, фенолоксидаза, цитохромоксидаза и пероксидаза этими методами не обнаружены.

3. ЯИЧНЫЙ ЖЕЛТОК

Желток из яиц птиц состоит из нескольких концентрических слоев белого желтка и желтого желтка [2]. Такое строение становится заметным только в твердом, сваренном яйце; обычно при изу-

чении состава желтка эти оба слоя не разделяют. Белые слои составляют около 5% желтка; они содержат меньше сухого остатка и для них характерно меньшее количественное отношение жира к белку по сравнению с желтыми слоями [156].

Основные белковые компоненты желтка состоят из липопротеидов, содержащих 17—38% связанного липида, в основном фосфатидов [157, 158]. Это соответствует 10—12% всех липидов в желтке; остаток представляет несвязанные нейтральные жиры, фосфатиды и стеролы [2]. Связанный липид обычно определяют как вещество, не экстрагируемое эфиром на холоду. Этот метод приводит к получению продуктов довольно однородного состава, однако его следует рассматривать в качестве произвольного, пока не будет доказано, что липопротеиды того же состава и с теми же свойствами могут быть получены другими методами. Очень трудно провести четкое разделение понятий «свободный» и «связанный» липид; кроме того, методы фракционирования липопротеидов вообще очень слабо разработаны. В результате из желтка яйца не были получены белки, сравнимые по однородности с белками яичного белка.

До недавнего времени было известно только два белковых компонента желтка. Препараты, называемые «липовителлином», содержат в основном весь липопротеид желтка. Их получают путем разбавления желтка равным объемом 10-процентного раствора NaCl и экстрагированием несвязанного липида эфиром. При диализе этого раствора осаждается липопротеид [159, 160]. После экстрагирования липида из этих препаратов остается фосфопротеид—вителлин. Фильтрат после осаждения липопротеида в описанном выше методе содержит водорастворимую фракцию—ливетин [161]. Последующими работами по изучению белков желтка обнаружен ряд компонентов и в липовителлине и в ливетине. Однако название «липовителлин» сохранилось для одного из липопротеидов и «ливетин»—для суммы водорастворимых белков. Состав желтка в отношении этих фракций и некоторые аналитические данные, характеризующие их, приведены в табл. 80. Различия между фракциями и распределение белка и фосфора между ними рассматриваются в разделе 3, Е.

А. Липовителлин и вителлин

Хоппе-Зейлер [164] показал, что бо́льшая часть белка в яичном желтке связана с фосфолипидами. Однако он полагал, что весь фосфор содержится в липиде. В то время методы разделения белкового фосфора и фосфора липидов и нуклеиновой кислоты не были еще достаточно разработаны, и только в работе Плиммера и Скотта [165] было установлено, что вителлин является фосфопротеидом. Эти авторы показали, что фосфор, связанный с белком, выделяется при обработке 1-процентным раствором едкого натра при 37° в течение

24—48 час. и что аналогичное явление наблюдается в случае казеина и вителлина.

Метод получения разработали Осборн и Кэмпбелл [159]. Видоизмененный метод Чаргафа [160] сводился к разбавлению желтка

Таблица 80

БЕЛКИ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА

Препараты *б*, *в*, *г* получены в основном по методу Осборна и Кэмпбелла [159]; *д*, *е*, *ж*, *з*, *и* означают препараты, полученные по методу Феволда [157, 158].

Все анализы проведены на препаратах, не содержащих липидов, за исключением *б*, *д*, *з* в первом столбце. При расчетах некоторых данных, приведенных в этом столбце, содержание сухого остатка в желтке было принято равным 51,3% (см. табл. 74)

Белки	Сухой остаток в желтке, %	Липиды, %	Белок без липидов, %	Р, %	Белковый Р, %
а. Всего белка (без липидов) . . .	32,4[а]	—	100	1,09 [163]	100
б. Липовителлин [160]	10	23	—	1,5	—
в. Вителлин [160]	7,7	—	24	1,0	22
г. Вителлин [162]	17[б]	—	52	0,92	44
д. Липовителлин [157]	17—18	17	—	1,5	—
е. Вителлин [157]	15	—	46	1,1	46
ж. Вителлин [157][в]	—	—	—	(2,08)	(88)
з. Липовителленин [158]	12—13	38	—	1,71	—
и. Вителленин [158]	8	—	25	0,28	6,4
к. Ливетин [161]	7	—	22	0,05	1
л. Фосвитин [163]	2	—	7	9,7	62
м. Сумма *е*+*и*+*к*	—	—	93	—	53,4
н. Сумма *ж*+*и*+*к*	—	—	—	—	95,4

[а] См. табл. 74.

[б] Принимая 18,7 *г* желтка на яйцо (см. табл. 74).

[в] См. текст.

равным объемом 10-процентного раствора NaCl. Полученный раствор экстрагировали эфиром на холоду. Водную фазу диализовали до осаждения липовителлина. Осадок растворяли в 10-процентном растворе NaCl, а затем дважды повторяли экстрагирование эфиром и диализ. Состав липовителлина, установленный Чаргафом [160] по этому методу, представлен в табл. 80. Связанный липид удаляли из этого препарата путем непрерывной экстракции этиловым спиртом, в остатке получался фосфопротеид—вителлин. Из спиртового экстракта выделяли фосфатиды и сравнивали с фосфатидами, выде-

ленными из эфирного экстракта, содержащего несвязанные липиды желтка. Фосфатиды, связанные с белком, характеризуются меньшим иодным числом, но в других отношениях оба препарата были очень близки между собой и содержали в основном лецитин и кефалин, как это следует из количественного отношения азота к фосфору. Фосфатиды составляли около 80% материала, экстрагированного спиртом из липовителлина.

Олдертон и Феволд [157] описали другой метод выделения липовителлина. Яичный желток разбавляли водой (1 : 2) и центрифугировали в ультрацентрифуге Шарплеса. Осадок представлял собой воскообразное твердое вещество, содержавшее липовителлин и часть несвязанного липида. Последний удаляли экстракцией эфиром, и липовителлин очищали повторным растворением в 10-процентном

Таблица 81

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА (в %)

Данные для вителлина и фосвитина взяты из работы Льюиса с сотрудниками [36], данные для ливетина—из работы Джукса [166], за исключением особо оговоренных случаев. Все результаты выражены в граммах на 100 *г* белка

Состав белка	Вителлин	Фосвитин	Ливетин
Глицин	2,8	1,6	
Аланин	4,0	1,5	6,2
Валин	6,2	1,1	
Лейцин	8,6	1,0	10,6
Изолейцин	5,3	0,5	
Серин	11,2	33,0	
Треонин	4,7	1,4	
Аспарагиновая кислота	8,1	4,4	3,0
Глутаминовая кислота	11,0	3,4	6,8
Гистидин	3,0	4,8	0,93
Лизин	6,9	5,9	5,0
Аргинин	8,4	4,8	5,6
Фенилаланин	4,0	0,6	1,95
Тирозин	3,8	0,1	3,6
Триптофан	1,1	0,6 [163]	1,26
Цистин	1,5	0,0 [163]	3,5
Метионин	2,8	0,3	
Пролин	4,4	1,0	2,2
Амидный азот	1,29	0,8 [163]	1,3
Азот	15,7	11,9 [163]	15,5
Фосфор	2,2	9,7 [163]	0,05 [161]
Сера	0,99	<0,1 [163]	1,8 [161]

растворе NaCl и осаждением диализом. Как видно из табл. 80, содержание липида в этом препарате несколько меньше по сравнению с липовителлином Чаргафа (см. раздел 3, Е). Несмотря на различие в составе и методе получения, Олдертон и Феволд для полученного ими липопротеида сохранили название «липовителлин».

Хотя липовителлин растворим в 10-процентном растворе NaCl, вителлин, полученный из него, растворяется только в растворе щелочи и, по-видимому, может рассматриваться как денатурированный белок. Ни один из этих белков не был охарактеризован физическими методами. Аминокислотный состав вителлина, полученного по методу Олдертона и Феволда, дан в табл. 81.

Б. Липовителленин и вителленин

По методу Ольдертона и Феволда [157] липовителлин удаляется из разбавленного яичного желтка центрифугированием при высоких скоростях. Феволд и Лаустен [158] выделили другой липопротеид из полученного фильтрата, который назвали липовителленином. При экстрагировании этого фильтрата эфиром получалось три слоя: водный слой, содержащий ливетин, эфирный слой, содержащий свободный липид, и промежуточный слой осадка между ними. Этот осадок, представляющий собой липовителленин, затем экстрагировали эфиром. Его очищали путем растворения в 10-процентном растворе NaCl, насыщенном эфиром, и осаждали при помощи диализа. Полученный продукт значительно отличался от липовителлина. Как следует из табл. 80, он содержит больше липида и меньше белкового фосфора. Кроме того, липовителленин легко разлагается эфиром после обработки ацетоном и образует прозрачный раствор в 10-процентном растворе NaCl только при насыщении раствора эфиром. Липидная часть, по-видимому, целиком состоит из фосфолипида, о чем можно судить по содержанию и количественному соотношению азота и фосфора. Вителленин по растворимости близок вителлину. Аминокислотный состав его неизвестен.

Липопротеид, близкий по составу к липовителленину, был получен Шепардом и Хоттлом [167] другим методом. Эти исследователи осаждали бóльшую часть липопротеида желтка разбавлением желтка 0,85-процентным раствором (1 : 2) NaCl в присутствии эфира. Фильтрат экстрагировали эфиром, и липопротеид осаждали после удаления растворенного эфира из водного раствора. Липопротеид содержал 39% связанного липида и 1,16% фосфора; его состав сравним с составом липовителленина (см. табл. 80). Содержание азота и серы в нем ниже, чем в липовителленине. Шепард и Хоттл изучали полученный ими липопротеид электрофоретическим методом в фосфатном буфере при pH 7,95 и ионной силе 0,1. Для получения достаточного количества растворенного белка в этом буфере

липопротеид в 0,85-процентном растворе NaCl, насыщенном эфиром, приводили в равновесие сначала с эфиром, содержащим свободные липиды желтка, а затем с буфером, применяемым при электрофорезе. На электрофореграммах выявляется в основном один компонент.

В. Фосвитин

Мечем и Олкотт [163] выделили из яичного желтка осаждением магниевой солью богатый фосфором белок. Желток смешивали с 1,2 *М* раствором сульфата магния (2 : 1) и смесь разбавляли водой приблизительно в 4 раза. Осадок растворяли в 0,4 *М* сульфате аммония и pH доводили до значения 4. Этот раствор экстрагировали эфиром при комнатной температуре для удаления липидов и коагуляции нефосвитинового белка, который отделяли фильтрованием. Осадок экстрагировали сульфатом аммония и экстракт соединяли с фильтратом. Этот раствор снова экстрагировали эфиром и затем фосвитин осаждали из водного раствора путем насыщения его сульфатом аммония. Фосвитин очищали осаждением путем диализа после растворения в 0,25 *М* растворе NaCl. После очистки фосвитин содержал 9,7% фосфора, который соответствует 60—70% всего белкового фосфора желтка. Таким образом, очевидно, что фосвитин содержит бо́льшую часть белкового фосфора, который обычно считали связанным с вителлином, и является составной частью большинства препаратов вителлина. В первой работе фосвитин был получен из исходного осадка липовителлина, выделенного по методу Олдертона и Феволда [157]. Весь белок в этом препарате осаждали сульфатом натрия (36 *г* на 100 *мл*) и фосвитин затем выделяли из центрифугата в виде медной соли. Медь удаляли диализом против цитратного буфера при pH 5.

Фосвитин растворим в растворах солей средней концентрации, например в 0,4 *М* сульфате аммония, но осаждается при диализе или при насыщении раствора сульфатом аммония. На электрофореграммах обнаружено два компонента. Соответствующие этим компонентам пики лучше разделяются в цитратном буфере, чем в ацетатном, при pH 4,6 и ионной силе 0,1 [168]. На кривых седиментации наблюдается только одна граница, но получены две константы седиментации: 1,84 *S* (в отсутствие магния) и 3,79 *S* (при наличии магния) [168]. Аналогичное влияние ионов магния наблюдается при измерениях молекулярного веса осмометрическим методом. Значения молекулярного веса увеличиваются от 21 000 в отсутствие магния до 38 000 в его присутствии, что указывает на образование димера при наличии магния [163].

Аминокислотный состав (см. табл. 81) указывает на присутствие такого количества серина, которое как раз достаточно, чтобы весь фосфат был связан в виде эфиров с гидроксильными группами серина. Наличие связи такого рода доказано выделением фосфорных

эфиров серина из белков желтка и других фосфопротеидов [169]. Кривая титрования была получена для препарата фосвитина, тщательно промытого подкисленным этиловым спиртом до удаления металлических примесей. Количество эквивалентов едкого натра, пошедшее на титрование от точки перегиба кривой около pH 4 до точки перегиба при pH 9,5, было исправлено с учетом диссоциации основных и кислых аминогрупп в этом интервале pH. Исправленный титр находится в согласии с допущением, что весь фосфор связан в виде моноэтерифицированного фосфата. Лимонная фосфатаза дефосфорилирует фосвитин на 90% [163].

По общему составу фосвитин близок к богатой фосфором вителлиновой кислоте, которую Левен и Олсберг [170] выделили из вителлина. Препараты этого вещества содержат 9,9—12,7% фосфора, 10,1—13,1% азота и близки к фосвитину также по содержанию железа, серы и тирозина [169, 171]. Вителлиновая кислота была получена экстрагированием вителлина аммиаком. Возможно, что она в основном аналогична фосвитину или получается из тех же компонентов яичного желтка. Другая группа веществ, по-видимому, связанных с этими же компонентами, представляет собой пептиды, содержащие фосфор и железо; эти вещества были выделены рядом исследователей при разложении вителлина или желтка протеолитическими ферментами [159, 172—176]. Ни один из этих пептидов не был достаточно хорошо изучен, но все они отличаются высоким содержанием фосфора (3—14%) и обычно содержат железо (0,5—3%). Связь между фосвитином и этими продуктами разложения подтверждается не только их составом, но также и относительной устойчивостью фосвитина к ферментативному воздействию трипсина [163].

Г. Ливетин

Как показал Плиммер [177], фильтрат водного раствора при получении липовителлина по методу Осборна и Кэмпбелла [159] содержит белок, коагулирующий при нагревании. Плиммер предложил назвать эту фракцию ливетином. Растворимость этих препаратов, полученных путем тепловой коагуляции, не определяли; известно только, что они получены в основном из растворов, не содержащих солей. Было показано, что они отличаются от вителлина по составу главным образом значительно меньшим содержанием фосфора. Эта фракция очень мало изучена; имеется только одна работа Кея и Маршалла [161]. Эти авторы получили ливетин в виде растворимого белка путем высаливания полунасыщенным раствором сульфата аммония, что характеризует его как псевдоглобулин. На основании данных по растворимости Кей и Маршалл полагают, что ливетин содержит несколько белков. Количество белка в фракции ливетина, полученной этим методом, составляет 20—25% общего количества белков в желтке. Это значительно меньше, чем

получено в препарате, выделенном Плиммером при тепловой коагуляции. Аминокислотный состав, по данным Джукса [166], представлен в табл. 81.

Некоторые водорастворимые фракции яичного желтка Шепард и Хоттл [167] изучали электрофоретическим методом. Эти авторы применяли две методики выделения. По первой липопротеиды осаждали разбавлением желтка 0,85-процентным раствором NaCl (1 : 2) в присутствии эфира. Водную фазу экстрагировали эфиром; при удалении растворенного эфира получались дополнительные количества липопротеида. Водный фильтрат представлял собой фракцию ливетина. По второй методике эфир не применялся. Липопротеид осаждали разбавлением 0,85-процентным раствором NaCl и проводили диализ против раствора этой соли. Остальной липопротеид и свободный липид удаляли в виде отдельной фракции при доведении pH раствора до 6; при этом фракция ливетина оставалась в водном растворе. Фракция ливетина, полученная таким методом, содержала липиды, экстрагируемые эфиром. Эти препараты изучались электрофоретически в фосфатном буфере при pH 7,95 и ионной силе 0,1. Для обоих препаратов получены различные диаграммы. На каждой из них наблюдалось 4 или 5 пиков, но вещества, соответствующие этим пикам, из обоих препаратов различались по своей подвижности. Изменения в распределении площадей между пиками и в подвижностях, соответствующих этим пикам веществ наблюдаются после экстрагирования эфиром фракции, полученной по второй методике. Следует отметить также изменения, зависящие от количества экстракций эфиром, применяемых в первой методике. Очевидно, что при применении этих методов фракции ливетина связывают значительное количество липидов. Поскольку присутствие липопротеидов в фракции ливетина ранее не обнаруживалось, следует полагать, что большинство исследователей экстрагировало свои препараты спиртом и эфиром. В работе Шепарда и Хоттла [167] подтверждается вывод Кея и Маршалла [161] о том, что фракция ливетина содержит несколько белков.

Д. Ферменты и другие компоненты, содержащиеся в незначительных количествах

Исследования Лайнуивера с сотрудниками [155] ферментов яйца показали, что в желтке имеется несколько больший набор ферментов по сравнению с белком. Желток содержит трибутириназу, пептидазу и каталазу, а также белок, амилазу и фосфатазу. Амилаза и трибутириназа в основном связаны с фракцией ливетина. Окислительные ферменты как в желтке, так и в белке отсутствуют.

Наличие белков яичного белка в желтке было доказано Маршаллом и Дейчем [178] с помощью иммунологических методов. Они уста-

новили, что кональбумин присутствует в желтке в малых количествах, яичный альбумин едва определяется, а лизоцим и овомукоид полностью отсутствуют.

Оноэ [179] выделил из яичного желтка очень небольшие количества мукоида.

Е. Белковый состав желтка

В табл. 80 перечислены различные белковые фракции желтка и в первом столбце указано содержание (в %), соответствующее сухому остатку, для каждой из них. Количество каждой фракции соответствует фактически выделенному и является минимальным содержанием ее в желтке. В третьем столбце указано содержание (в %) общего белка без липидов для каждой фракции. Очевидно, что количество белка, выделенное методами Осборна и Кэмпбелла, очень сильно варьирует (см. табл. 80 *е*, *и*). Это количество представляет собой ту же фракцию свободных от липида белков, что и вителлин Олдертона и Феволда [157], но оно значительно меньше, чем сумма вителлина и вителленина (см. табл. 80 *е*, *и*). Значительная потеря липопротеида в старых методах, по-видимому, являлась результатом повторного осаждения и промывки, применяемых в этих методах. Кроме того, следует ожидать, что конечный продукт должен содержать липовителлин и липовителленин по Феволду [157, 158], так как последние два препарата, как и липовителлин, выделяемый по старому методу, осаждаются при диализе солевого раствора липопротеида. Общее количество белков в желтке приблизительно соответствует сумме вителлина, вителленина и ливетина (см. табл. 80 *м*). Липопротеид содержит часть фосвитина, поэтому не весь фосвитин *л* надо добавлять к сумме *м* для расчета общего белка. Присутствие фосвитина в липопротеиде было показано Мечемом и Олкоттом [163] выделением его из препарата липовителлина, полученного по методу Олдертона и Феволда. Это следует также из данных по содержанию белкового фосфора (см. табл. 80, пятый столбец). Если произвести такое же суммирование, как это сделано для суммарного белка (*м*), то очевидно, что 47% белкового фосфора недостает, в то время как добавление фосфора из фосвитина приведет к превышению общего содержания несколько выше 100%. Этот недостаток в содержании фосфора, по-видимому, зависит от потерь фосвитина в фильтратах после осаждения липовителлина при разбавлении или диализе. Это подтверждается данными по растворимости фосвитина и тем фактом, что небольшие потери его заметно не отражаются на содержании белка, но могут соответствовать значительной части фосфора. Потерю фосвитина при этой процедуре обнаружил Френсис [180], который смешивал фосвитин, меченный P^{32}, с липовителлином и смесь осаждал путем разбавления. Фосвитин быстро обменивался с фракцией белка, содержащей около 75%

белкового фосфора. При первом осаждении липопротеид терял больше фосвитина, чем его было вначале. Как показали определения радиоактивности, при каждом последующем осаждении часть фосвитина из липопротеида терялась. Точно так же липовителлин, полученный Олдертоном и Феволдом (их образцы №№ 1—6) [157] без осаждения диализом, содержал почти вдвое больше фосфора (см. табл. 80, *ж*), чем после трех осаждений (*е*). Сумма белкового фосфора, рассчитанная на основании более ранних работ, правильнее отражает данные для общего белкового фосфора желтка по сравнению с результатами последних работ (*и*). Однако содержание (в %) фосфора, рассчитанное по выделенному фосвитину, указывает на то, что при обычном методе очистки из липовителлина удаляется только часть этого белка. Это подтверждается опытами Френсиса [180], упоминавшимися выше, которые показали, что около 75% белкового фосфора липовителлина обмениваются с добавленным фосвитином. Таким образом, фосвитин, по-видимому, удаляется из липопротеида в различных количествах в зависимости от метода обработки. Не выяснено, можно ли его полностью удалить без разрушения липопротеида. Остается нерешенным вопрос, можно ли часть фосфора липовителленина также отнести за счет фосвитина. Некоторое количество фосвитина, остающееся в фильтрате от препарата липовителлина, не входит в состав ливетина, выделенного по методу Кея и Маршалла [161], так как эта фракция очищается осаждением полунасыщенным раствором сульфата аммония, в котором фосвитин растворим.

Юнг и Финней [181] провели электрофоретическое исследование всего экстрагированного эфиром желтка в вероналовом буфере при pH 8,5 и ионной силе 0,3; они показали, что имеются только один основной пик липопротеида и два второстепенных пика, соответствующих, по-видимому, ливетину или ливетину и фосвитину. Хотя более подробное электрофоретическое исследование, возможно, позволило бы выделить основной пик, все же на основании этих кривых можно заключить, что весь липопротеид, включая фракции липовителлина и липовителленина и даже часть фосвитина, движется как одно целое. Этот слабый комплекс легко разделяется химическими методами на различные фракции в зависимости от применяемого метода. Соединение белка с липидом разлагается при экстрагировании спиртом, и это разложение вызывает изменения в свойствах компонентов. Белок теряет растворимость в нейтральных растворах солей, а фосфатид—устойчивость к окислению на воздухе [158].

4. ВИДОВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В БЕЛКОВОМ СОСТАВЕ ЯЙЦА

Большая часть работ, описанных выше, относится к куриному яйцу *Gallus domesticus*. До сих пор нет сравнительных данных для белков яиц других видов. Опубликованные работы по изучению

яиц птиц и не птиц содержат данные, касающиеся общего состава яиц и небольшого числа белковых препаратов, полученных из них, обычно недостаточно хорошо охарактеризованных. Большинство этих анализов собрано в обзорах Нидхема [1] и Джукса и Кея [4].

Наиболее полный обзор видовых изменений белкового состава белка яиц птиц дается электрофореграммами, полученными Бейном и Дейчем [182]. Они охватывают 13 видов из 6 филогенетических отрядов. Наряду с видовой индивидуальностью наблюдается и сходство диаграмм в пределах одного отряда. Компоненты тщательно идентифицировались путем сравнения подвижностей с подвижностями на электрофореграммах для белка куриного яйца. В случае менее близких видов различия на диаграммах были столь значительными, что идентификация их становилась невозможной. Все кривые указывают на наличие быстродвижущегося компонента, сравнимого с альбумином куриного яйца, и группы компонентов глобулина, которой в некоторых случаях соответствует большее количество белка, чем в альбумине. Пик, соответствующий кональбумину, также имеется на всех кривых, но другие, второстепенные, пики наблюдаются не для всех видов.

Альбумины яиц некоторых видов птиц получали в кристаллическом виде путем высаливания сульфатом аммония с помощью методов, аналогичных применяемым при работе с альбумином куриного яйца. Это относится к яичным альбуминам яиц индюшки [183], цесарки [183, 184], фазана [184] и утки. Альбумины яиц курицы, цесарки, индюшки, утки и гуся имеют различные подвижности в 0,02 н. ацетатном буфере при pH 5,2 [186]. Эти яичные альбумины различаются иммунологически, но вообще дают близкие реакции [183, 184]. Были изучены иммунологические взаимоотношения слабо охарактеризованных препаратов кональбумина [187] и овомукоида [188] указанных, а также и других видов.

Изучение белков яиц других видов (не птиц) ограничивалось морскими и пресноводными животными. Общий состав этих яиц близок к составу желтка куриных яиц. Аналогия распространяется также и на типы присутствующих белков. Яйца многих рыб также содержат липопротеин, который после удаления липида дает фосфопротеид с содержанием фосфора, близким к его содержанию в вителлине [4]. Часть этого фосфора может быть в фракции, аналогичной по составу с фосвитином. Левен [189] выделил «ихтулиновую кислоту» этого типа из яиц трески. Кроме того, в ряде случаев был обнаружен водорастворимый белок с низким содержанием фосфора, сравнимый с левитином [181, 190]. Аналогия существует также в электрофореграммах, полученных Юнгом и Финнеем [181] в вероналовом буфере при pH 8,5 и ионной силе 0,3. Подобное распределение подвижностей и площадей на электрофореграммах установлено для эфирного экстракта яиц семги и препаратов из желтка куриного яйца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Needham J., Chemical Embryology, Cambridge University Press, Cambridge, 1931, part III, sec. 1.
2. Romanoff A. L., Romanoff A. J., The Avian Egg, John Wiley and Sons, New York, 1949.
3. Hektoen L., Cole A. G., J. Infectious Diseases, **42**, 1, 1928.
4. Jukes T. H., Kay H. D., J. Nutrition, 5, 81, 1932.
5. Fevold H. L., Advances in Protein Chem., **6**, 187, 1951.
6. Conrad R. M., Scott H. M., Physiol. Revs., **18**, 481, 1938.
7. Frampton V. L., Romanoff A. L., Arch. Biochem., **13**, 315, 1947.
8. Lanni F., Sharp D. G., Eckert E. A., Dillon E. S., Beard D., Beard J. W., J. Biol. Chem., **179**, 1275, 1949.
9. Forsythe R. H., Foster J. F., Arch. Biochem., **20**, 161, 1949.
10. Frampton V. L., Joncich M. J., Arch. Biochem., **37**, 490, 1952.
11. Longsworth L. G., Cannan R. K., MacInnes D. A., J. Am. Chem. Soc., **62**, 2580, 1940.
12. Forsythe R. H., Foster J. F., J. Biol. Chem., **184**, 377, 385, 1950.
13. Sørensen M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, **20**, No. 3, 1934.
14. Cohn M., Wetter L. R., Deutsch H. F., J. Immunol., **61**, 283, 1949.
15. Wetter L. R., Deutsch. H. F., Arch. Biochem., **28**, 399, 1950.
16. Wetter L. R., Deutsch. H. F., J. Biol. Chem., **192**, 237, 1951.
17. Pennington D., Snell E. E., Eakin R. E., J. Am. Chem. Soc., **64**, 469, 1942.
18. Wolley D. W., Longsworth L. G., J. Biol. Chem., **142**, 285, 1942.
19. Sørensen S. P. L., Høyrup M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, **12**, 12, 1915/1917.
20. Warner R. C., Weber I., J. Biol. Chem., **191**, 173, 1951.
21. Morner C. T., Z., physiol. Chem., **18**, 525, 1894.
22. Fredericq E., Deutsch H. F., J. Biol. Chem., **181**, 499, 1949.
23. Alderton G., Fevold H. L., J. Biol. Chem., **164**, 1, 1946.
24. Alderton G., Ward W. H., Fevold H. L., J. Biol. Chem., **157**, 43, 1945.
25. Bain J. A., Deutsch H. F., J. Biol. Chem., **172**, 547, 1948.
26. Hofmeister F., Z. physiol. Chem., **14**, 165, 1890.
27. Hopkins F. G., Pincus S. N., J. Physiol. (London), **23**, 130, 1898.
28. Osborne T. B., J. Am. Chem. Soc., **21**, 477, 1899.
29. La Rosa W., Chemist-Analyst, **16**, No. 2, 3, 1927.
30. Kekwick R. A., Cannan R. K., Biochem. J., **30**, 227, 1936.
31. Sørensen S. P. L., Høyrup M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, **12**, 164, 312, 1915/1917.
32. McMeekin T. L., Warner R. C., J. Am. Chem. Soc., **64**, 2393, 1942.
33. Sørensen S. P. L., Linderstrøm-Lang K., Lund E., J. Gen. Physiol., 8, 543, 1927.
34. Cannan R. K., Kibrick A., Palmer A. H., Ann. N. Y. Acad. Sci., **41**, 243, 1941.
35. Tristram G. R., Advances in Protein Chem., **5**, 83, 1949.
36. Lewis J. C., Snell N. S., Hirschmann D. J., Fraenkel-Conrat H., J. Biol. Chem., **186**, 23, 1950.
37. Hofmeister F., Z. physiol. Chem., **24**, 159, 1898.
38. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., 22, 422, 1900.
39. Levene P. A., Mori T., J. Biol. Chem., **84**, 49, 1929.

40. Neuberger A., Biochem. J., 32, 1435, 1938.
41. Sørensen M., Haugaard G., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 19, No. 12, 1933.
42. Sørensen M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 22, 487, 1938.
43. Porter R. R., Biochem. J., 46, 473, 1950.
44. Steinberg D., J. Am. Chem. Soc., 74, 4217, 1952.
45. Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, 12, 68, 1915/1917.
46. Cannan R. K., Chem. Revs., 30, 395, 1942.
47. Wyman J., Jr., J. Biol. Chem., 127, 1, 1939.
48. Rees M. W., Biochem. J., 40, 632, 1946.
49. Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 18, No. 5, 1930.
50. Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 12, 262, 1917.
51. Svedberg T., Nichols J. B., J. Am. Chem. Soc., 48, 3081, 1926.
52. Burk N. F., Greenberg D. M., J. Biol. Chem., 87, 197, 1930.
53. Taylor G. L., Adair G. S., Adair M. E., J. Hyg., 32, 340, 1932.
54. Gutfreund H., Nature, 153, 406, 1949.
55. Bull H. B., J. Biol. Chem., 137, 143, 1941.
56. Güntelberg A. V., Linderstrøm-Lang K., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 27, 1, 1949.
57. Halwer M., Nutting G. C., Brice B. A., J. Am. Chem. Soc., 73, 2786, 1951.
58. Foster J. F., Rhees R. C., Arch. Biochem. Biophys., 40, 437, 1952.
59. Bull H. B., J. Biol. Chem., 185, 27, 1950.
60. Lamm O., Polson A., Biochem. J., 30, 528, 1936; Polson A., Koll. Z., 87, 149, 1939.
61. Longsworth L. G., Ann. N. Y. Acad. Sci., 41, 267, 1941.
62. Kegeles G., Gutter F. J., J. Am. Chem. Soc., 73, 3770, 1951.
63. Nichols J. B., J. Am. Chem. Soc., 52, 5176, 1930.
64. Dayhoff M. O., Perlmann G. E., MacInnes D. A., J. Am. Chem. Soc., 74, 2515, 1952.
65. Tiselius A., Svensson H., Trans. Faraday Soc., 36, 16, 1940.
66. Oncley J. L., quoted by Aldertong et al. [24].
67. Lineweaver H., Murray C. W., J. Biol. Chem., 171, 565, 1947.
68. Mohammad A., quoted by Lewis et al, [36] and by Fraenkel-Conrat et al. [147].
69. Longsworth L. G., J. Am. Chem. Soc., 61, 529, 1939.
70. Perlmann G. E., J. Gen. Physiol., 35, 711, 1952.
71. Cann J. R., J. Am. Chem. Soc., 71, 907, 1949.
72. MacPherson C. F. C., Moore D. H., Longsworth L. G., J. Biol. Chem., 156, 381, 1949.
73. Perlmann G. E., J. Am. Chem. Soc., 71, 1146, 1949.
74. Macheboeuf M., Sørensen M., Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 16, No. 12, 1927.
75. Sørensen S. P. L., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, 18, No. 5, 1930.
76. Arnold V., Z. physiol. Chem., 70, 300, 314, 1911.
77. Kuhn R., Desnuelle P., Z. physiol. Chem., 251, 14, 1938.
78. Greenstein J., J. Biol. Chem., 125, 501, 1938; 130, 519, 1939.
79. Mirsky A. E., Anson M. L., J. Gen. Physiol., 18, 307, 1935; 19, 427, 1936.
80. Todrick A., Walker E., Biochem. J., 31, 292, 1937.
81. Hopkins F. G., Nature, 126, 328, 1930.
82. Anson M. L., J. Gen. Physiol., 23, 321, 1940.

83. MacDonnell L. R., Silva R. B., Feeney R. E., Arch. Biochem. Biophys., 32, 288, 1951.
84. Mirsky A. E., Anson M. L., J. Gen. Physiol., 19, 451, 1936.
85. Crammer J. L., Neuberger A., Biochem. J., 37, 302, 1943.
86. Tanford C., Roberts G. L., Jr, J. Am. Chem. Soc., 74, 2509, 1952.
87. Rothen A., Ann. N. Y. Acad. Sci., 43, 229, 1942.
88. MacPherson C. F. C., Heidelberger M., J. Am. Chem. Soc., 67, 574, 1945; MacPherson C. F. C., Heidelberger M., Moore D. H., J. Am. Chem. Soc., 67, 578, 1945.
89. Chick H., Martin C. J., J. Physiol. (London), 40, 404, 1910; 43, 1, 1911; 45, 61, 1912; 45, 261, 1912.
90. Lewis P. S., Biochem. J., 20, 978, 1926.
91. Cubin H. K., Biochem. J., 23, 25, 1929.
92. Gibbs R. J., Bier M., Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., 35, 216, 1952.
93. Haurowitz F., DiMola F., Tekman S., J. Am. Chem. Soc., 74, 2265, 1952.
94. Wu H., Ling S. M., Chin. J. Physiol., 1, 407, 1927.
94a. Bull H. B., Neurath H., J. Biol. Chem., 118, 163, 1937; 125, 113, 1938.
95. Bier M., Nord F. F., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 35, 17, 1949.
96. Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., Nature, 159, 807, 1947; Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 26, 403, 1949.
97. Eeg-Larsen N., Linderstrøm-Lang K., Ottesen M., Arch. Biochem., 19, 340, 1948.
98. Ottesen M., Villee C. A., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 27, 421, 1951.
99. Ottesen M., Wollenberger A., Nature, 170, 801, 1952.
100. Fredericq E., Linderstrøm-Lang K., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim., 26, 443, 1949.
101. Perlmann G. E., Nature, 164, 961, 1949.
102. Günteiberg A. V., Ottesen M., Nature, 170, 802, 1952.
103. Wu H., Ling S. M., Chin. J. Physiol., 1, 431, 1927.
104. Alderton G., Ward W. H., Fevold H. L., Arch. Biochem., 11, 9, 1946.
105. Warner R. C., Weber I., J. Am. Chem. Soc., 75, 5094, 1953.
106. Anderson E. A., Alberty R. A., J. Phys. Coll. Chem., 52, 1345, 1948.
107. Rothen A., quoted by Longsworth et al [11].
108. Fraenkel-Conrat H., Porter R. R., Biochim. Biophys. Acta, 9, 557, 1952.
109. Schade A. L., Caroline L., Science, 100, 14, 1944.
110. Fraenkel-Conrat H., Feeney R. E., Arch. Biochem., 29, 101, 1950.
111. Eakin R. E., Snell E. E., Williams R. J., J. Biol. Chem., 140, 535, 1941.
112. Schade A. L., Reinhart R. W., Levy H., Arch. Biochem., 20, 170, 1949.
113. Koechlin B. A., J. Am. Chem. Soc., 74, 2649, 1952.
114. Fiala S., Burk D., Arch. Biochem., 20, 172, 1949.
115. Fraenkel-Conrat H., Arch. Biochem., 28, 452, 1950.
116. Fleming A., Proc. Roy. Soc. (London), B93, 306, 1922.
117. Meyer K., Thompson R., Palmer J. W., Khorazo D., J. Biol. Chem., 113, 303, 1936.
118. Roberts E. A. H., Quart. J. Exptl. Physiol., 27, 89, 1937.

119. Abraham E. P., Robinson R., Nature, **140**, 24, 1937.
120. Palmer K. J., Ballantyne M., Galvin J. A., J. Am. Chem. Soc., **70**, 960, 1948.
121. Archer R., Jutisz M., Fromageot C., Biochim. Biophys. Acta, **5**, 493, 1950.
122. Thompson A. R., Nature, **168**, 390, 1951.
123. Green F. C., Schroeder W. A., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1385, 1951.
124. Schroeder W. A., J. Am. Chem. Soc., **74**, 5118, 1952.
125. Thompson A. R., Nature, **169**, 495, 1952.
126. Harris J. L., J. Am. Chem. Soc., 74, 2944, 1952.
127. Archer R., Jutisz M., Fromageot C., Biochim. Biophys. Acta, **8**, 442, 1952.
128. Fraenkel-Conrat H., Mohammad A., Ducay E. D., Mecham D. K., J. Am. Chem. Soc., **73**, 625, 1951.
129. Tallan H. H., Stein W. H., J. Biol. Chem., **200**, 507, 1953; J. Am. Chem. Soc., **73**, 2976, 1951.
130. Jones F. T., J. Am. Chem. Soc., **68**, 854, 1946.
131. Fromageot C., de Garilhle M., Biochim. Biophys. Acta, **4**, 509, 1950.
132. Fraenkel-Conrat H., Arch. Biochem., 27, 109, 1950.
133. Neumeister R., Z. Biol., **27**, 369, 1890.
134. Balls A. K., Swenson T. L., J. Biol. Chem., **106**, 409, 1934.
135. Meyer K., Palmer J. W., Thompson R., Khorazo D., J. Biol. Chem., **113**, 479, 1936.
136. Karlberg O., Z. physiol. Chem., **240**, 55, 1936.
137. Meyer K., Advances in Protein Chem., **2**, 249, 1945.
138. Meyer K., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., **6**, **91**, 1938.
139. Stacey M., Woolley J. M., J. Chem. Soc., **1940**, 184; **1942**, 550.
140. Pénasse L., Jutisz M., Fromageot C., Fraenkel-Conrat H., Biochim. Biophys. Acta, 9, 551, 1952.
141. Fromageot C., Jutisz M., Meyer D., Pénasse L., Biochim. Biophys. Acta, **6**, 283, 1950.
142. Bier M., Duke J. A., Gibbs R. J., Nord F. F., Arch. Biochem. Biophys., **37**, 491, 1952.
143. Young E. G., Nature, **145**, 1021, 1940.
144. Fraenkel-Conrat H., Bean R. S., Lineweaver H., J. Biol. Chem., **177**, 385, 1949.
145. Boas M., Biochem. J., **21**, 712, 1927.
146. Fraenkel-Conrat H., Snell N. S., Ducay E. D., Arch. Biochem., Biophys., **39**, 80, 1952.
147. Fraenkel-Conrat H., Snell N. S., Ducay E. D., Arch. Biochem. Biophys., **39**, 97, 1952.
148. Rothen A., quoted by Woolley, Longsworth [18].
149. Ward W. H., quoted by Fraenkel-Conrat et al [147].
150. György P., Rose C. S., Proc. Soc. Expll. Biol. Med., **53**, **55**, **1943**.
151. Eichholz A., J. Physiol. (London), **23**, 163, 1898.
152. Young E. G., J. Biol. Chem., **120**, 1, 1937.
153. Sharp D. G., Lanni F., Lanni Y. T., Beard J. W., Arch. Biochem., **30**, 453, 1951.
154. Sharp D. G., Lanni F., Lanni Y. T., Csaky T. Z., Beard J. W., Arch. Biochem., **30**, 251, 1951.
155. Lineweaver H., Morris H. J., Kline L., Bean R. S., Arch. Biochem., **16**, 443, 1948.
156. Riddle O., J. Morphol, **22**, 455, 1911; Spohn A. A., Riddle O., Am. J. Physiol., **41**, 397, 1916.
157. Alderton G., Fevold H. L., Arch. Biochem., 8, 415, 1945.
158. Fevold H. L., Lausten A., Arch. Biochem., **11**, 1, 1946.

159. Osborne T. B., Campbell G. F., J. Am. Chem. Soc., **22**, 413, 1900.
160. Chargaff E., J. Biol. Chem., **142**, 491, 1942.
161. Kay H. D., Marshall P. G., Biochem. J., **22**, 1264, 1928.
162. Calvery H. O., White A., J. Biol. Chem., **94**, 635, 1931.
163. Mecham D. K., Olcott H. S., J. Am. Chem. Soc., **71**, 3670, 1949.
164. Hoppe-Seyler G. K. F., Handbuch d. physiol. u. pathol. chem. analyse, Berlin, 1865, p. 192; Med.-Chem. Untersuch., **2**, 209, 1867/1868; cited by Jukes and Kay [4].
165. Plimmer R. H. A., Scott F. H., J. Chem. Soc., **93**, 1699, 1908.
166. Jukes T. H., J. Biol. Chem., **103**, 425, 1933.
167. Shepard C. S., Hottle G. A., J. Biol. Chem., **179**, 349, 1949.
168. Ward W. H., quoted by Mecham and Olcott [164].
169. Lipmann F. A., Levene P. A., J. Biol. Chem., **98**, 109, 1932; Levene P. A., Schormüller A., J. Biol. Chem., **103**, 537, 1933.
170. Levene P. A., Alsberg C. L., Z. physiol. Chem., **31**, 543, 1900.
171. Kay H. D., Marshall P. G., quoted by Jukes and Kay [4].
172. Miescher F., Med.-Chem. Untersuch., 4, 502, 1870; cited by Jukes and Kay [4].
173. Bunge G., Z. physiol. Chem., **9**, 49, 1885.
174. Hugounenq L., Morel A., Compt. rend., **140**, 1065, 1905; **141**, 848, 1905; J. physiol. et path. gén., 8, 391, 1906.
175. Posternak S., Posternak T., Compt. rend., **184**, 909, 1927; **185**, 615, 1927.
176. Blackwood J. H., Wishart G. M., Biochem. J., **28**, 550, 1934.
177. Plimmer R. H. A., J. Chem. Soc., **93**, 1500, 1908.
178. Marshall M. E., Deutsch H. F., J. Biol. Chem., **189**, 1951.
179. Onoe T., J. Biochem. (Japan), **24**, 1, 1936.
180. Francis G. E., Biochem. J., **51**, 715, 1952.
181. Young E. G., Phinney J. I., J. Biol. Chem., **193**, 73, 1951
182. Bain J. A., Deutsch H. F., J. Biol. Chem., **171**, 531, 1947.
183. Landsteiner K., van der Scheer J., J. Exptl. Med., **71**, 445, 1940.
184. Cole A. G., Arch. Path., **26**, 96, 1938.
185. Dale H. H., Hartley P., Biochem. J., **10**, 408, 1916.
186. Landsteiner K., Longsworth L. G., van der Scheer J., Science, **88**, 83, 1938.
187. Hektoen L., Cole A. G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **36**, 97, 1937.
188. Lewis J. H., Wells H. G., J. Infectious Diseases, **40**, 316, 1927.
189. Levene P. A. Z. physiol. Chem., **32**, 281, 1901.
190. Needham J., Biochem. J., **23**, 1222, 1929.
191. Steinberg D., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4875, 1953.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА РЕДАКТОРА

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ I

1. Гольдштейн Б. И., О биологических свойствах сульфгидрильных групп тканевых белков, Усп. сов. биол., 38, 280, 1954.
2. Белки и их специфические свойства, Труды Совещания по проблемам белка, состоявшегося 4—7 июня 1954 г., Киев, 1955.
3. Мосолов В. В., О специфическом действии протеиназ, Усп. сов. биол., 44, 300, 1957.
4. Опарин А. И., Возникновение жизни на земле, изд. 3-е, М., 1957, гл. VII.
5. Dreiding A. S., Molekulararchitektur und die lebende Nature, Chemie, 11, 152, 1957.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ II

1. Белозерский А. Н., Абелев Г. И., К вопросу о единстве химического строения ядерного материала растительных и животных клеток, Вест. Моск. универ., № 9, 103, 1955.
2. Белозерский А. Н., Спирин А. С., Современные представления о строении нуклеиновых кислот и их специфичности, Усп. совр. биол., 41, 144, 1956.
3. Гамов Г., Рич А., Икас М., Проблема передачи информации от нуклеиновых кислот к белкам, сб. «Вопросы биофизики», Москва, 1957, стр. 205—261.
4. Дебов С. С., Нуклеиновые кислоты в норме и патологии, Усп. биол. хим., 2, 115—141, Москва, 1954.
5. Дэвидсон Д., Биохимия нуклеиновых кислот, пер. с англ. под ред. А. Н. Белозерского, Издатинлит, Москва, 1952.
6. Збарский И. Б., Химия клеточного ядра, Усп. биол. хим., 1, 91—115, Москва, 1950.
7. Зильбер Л. А., Учение о вирусах, Москва, 1956.
8. Кедровский Б. В., Рибонуклеиновая кислота и ее роль в развитии и функции клеток, Усп. совр. биол., 31, 38, 1951.
9. Кедровский Б. В., Нуклеиновые кислоты в клетках поврежденного и больного организма, Усп. совр. биол., 32, 309, 1951.
10. Клейн Б. И., Биохимизм процесса бактериофагии, Усп. совр. биол., 37, 291, 1954.
11. Котельникова А. В., Новые данные о природе и роли свободных рибонуклеотидов и некоторых их производных, Усп. совр. биол., 43, 133, 1957.
12. Крисс А. Е., Строение бактериофага, Усп. совр. биол., 36, 346, 1953.
13. Маалое О., Генетическое значение вирусной дезоксирибонуклеиновой кислоты, «Проблемы цистофизиологии», Издатинлит, Москва, 1957, стр. 281—289.
14. Макаров П. В., Теория постоянства дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке и ее критика, Усп. совр. биол., 41, 3, 1956.

15. Маркхем Р., Химия рибонуклеиновых кислот, сб. «Современные проблемы биохимии», Издатинлит, Москва, 1958, стр. 131—148.
16. Медведев Ж. А., Процессы обновления и изменения нуклеиновых кислот в организме, Усп. совр. биол., **36**, 161, 1953.
17. Нуклеиновые кислоты, под ред. Э. Чаргаффа и Дж. Дэвидсона, пер. с англ. под ред. А. Н. Белозерского, Издатинлит, Москва, 1957.
18. Онтогенез вирусов, пер. с англ. под ред. В. Л. Рыжкова, Издатинлит, Москва, 1956.
19. Природа размножения вирусов, пер. с англ. под ред. В. Л. Рыжкова, Издатинлит, Москва, 1956.
20. Раутенштейн Я. И., Бактериофагия, Москва, 1955.
21. Рич А., Уотсон Я., Некоторые взаимоотношения ДНК и РНК, сб. «Проблемы цитофизиологии», Издатинлит, Москва, 1957, стр. 71—75.
22. Сухов К. С., Вирусы, изд. АН СССР, Москва, 1957.
23. Товарницкий В. И., Химия и биохимия фильтрующихся вирусов, Усп. биол. хим., **1**, 143—179, Москва, 1950.
24. Товарницкий В. И., Химия и биохимия вируса гриппа, Усп. хим., **20**, 231, 1951.
25. Тодд А. Р., Некоторые новые достижения в химии нуклеиновых кислот, Усп. хим., **26**, 263, 1957.
26. Уотсон Д., Крик Ф., Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты, сб. «Проблемы цитофизиологии,» Издатинлит, Москва, 1957, стр. 58—70.
27. Френкель-Конрат Г., Вильямс Р., Реконструкция активного вируса табачной мозаики из его компонентов — неактивного белка и нуклеиновой кислоты, сб. «Современные проблемы биохимии», Издатинлит, Москва, 1957, стр. 120—131.
28. Чепинога О. П., Нуклеиновые кислоты и их биологическая роль, Киев, 1956.
29. Шапот В. С., Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеотидов, Усп. биол. хим., **1**, 115—143, Москва, 1950.
30. Boyd I. S. K., Bacteriophage, Biol. Rev., **31**, 71, 1956.
31. Broda E., Biochemie des Tabakmosaikvirus, Österr. Chem. Ztg., 58, 86, 1957.
32. Davison P. F., Conway B. E., Butler J. A. V., The Nucleoprotein Complex of the Cell Nucleus and its Reaction, в кн. «Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry», v. **4**, pp. 148—195, London, 1954.
33. Heroik F., Problém bacteriofága, Praha, 1953.
34. Markham R., Recent Views on the Chemical Structure of Polynucleotides, Biochem. Soc. Sympos., № 14, 5, 1957.
35. The Nucleic Acids, Chemistry and Biology, ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, v. I, II, Academic Press, New York, 1955.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВАМ III и IV

1. Биохимия зерна, сб. 1—4, изд. АН СССР, Москва, 1951, 1954, 1956, 1958.
2. Боуден Ф., Вирусы и вирусные болезни растений, Издатинлит, Москва, 1952.
3. Иванов Н. Н., Проблема белка в растениеводстве, Москва — Ленинград, 1947.
4. Козьмина Н. П., Кретович В. Л., Биохимия зерна и продуктов его переработки, Москва, 1951.
5. Кретович В. Л., Основы биохимии растений, изд. 2-е, Москва, 1956.

6. Сабинин Д. А., Физиологические основы питания растений, изд. АН СССР, 1955.
7. Сисакян Н. М., О природе протеидного комплекса пластид, Усп. совр. биол., 36, 332, 1953.
8. Сисакян Н. М., Ферментативная активность протоплазменных структур, 5-е Баховское чтение, Москва, 1951.
9. Сисакян Н. М., Биохимия обмена веществ, Москва, 1954.
10. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, Сельхозгиз, Москва, 1952.
11. Danielsson C. E., Plant proteins, Ann. Rev. Plant Physiol., 7, 215, 1956.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВАМ V И VI

1. Блюменфельд Л. А., Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода, Москва, 1957.
2. Верболович П. А., Миоглобин и его роль в физиологии животного организма, Усп. совр. биол., 31, 170, 1951.
3. Владимиров Г. Е., О некоторых сторонах обмена гемоглобина, Воп. мед. хим., 3, 332, 1957.
4. Коржуев П. А., Эволюция дыхательной функции крови, Москва, 1954.
5. Коржуев П. А., О формах локализации и количестве гемоглобина в крови различных животных, Усп. совр. биол., 33, 391, 1952.
6. Степаненко Б. Н., Работы М. Ненцкого в области пиррольных пигментов, Усп. биол. хим., 2, 5—27, Москва, 1954.
7. Чарный А. М., Красовицкая С. Э., Порфирины, Усп. совр. биол., 32, 166, 1951.
8. Stein W. H., Kunkel H. G., Cole R. D., Spackman D. H., Moore S., Observations on the Aminoacid Composition of Human Hemoglobins, Biochem. Biophys. Acta, 24, 640, 1950.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ VII

1. Гурвич А. Е., Определение белковых антигенов при помощи хроматографии на бумаге, Биохимия, 20, 550, 1955,
2. Зильбер Л. А., О специфическом компоненте злокачественных опухолей, Усп. совр. биол., 30, 188, 1950.
3. Иванов В. И., Антигены брюшнотифозных и дизентерийных бактерий, Усп. совр. биол., 37, 114, 1954.
4. Конюхов Б. В., Изменение антигенных свойств тканей животных в онтогенезе, Усп. совр. биол., 45, 97, 1958.
5. Котькова К. И., Антигенность и физико-химические свойства модифицированных сывороточных белков, Вып. мед. хим., 3, 22, 1957.
6. Парнес В. А., Аутоантигены, Усп. совр. биол., 44, 202, 1957.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ VIII

1. Волкова М. С., Тоигур А. М., Чунаева А. С., Пасынский А. Г., Радиационное определение молекулярного веса инсулина, Биофизика, 2, 465, 1957.
2. Зангер Ф., Химические исследования строения инсулина, сб. «Аминокислоты и белки», Издатинлит, Москва, 1952, стр. 94.
3. Самсонов Г. В., Фадеева М. Д., Хроматография инсулина на ионообменных смолах, Биохимия, 21, 403, 1956.

4. Тонгур В. С., Тонгур А. М., Регенерация инсулина под давлением, Биохимия, **16**, 410, 1951.
5. Фромажо К., Количественный анализ аминокислот в инсулине и лизоцима, сб. «Аминокислоты и белки», Издатинлит, Москва, 1952, стр. 110.
6. Hamburger Ch., The assay of gonadotropic hormons; a survey, Acta endocrinol., 24, 59, 1957.
7. Wilkinson J. H., Recent work on thyroid hormones, Postgrad. Med. J., **33**, 333, 1957.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ IX

1. Вышепан Е. Д., Краснова Т. В., Шарликова Л. Ф., К вопросу об образовании α-токсина (лецитиназы С) *Bac. Perfingens* (тип А), Биохимия, **18**, 576, 1953.
2. Дюбо Р., Биохимические факторы в микробных заболеваниях, Издатинлит, Москва, 1957.
3. Капланский С. Я., Химическая природа токсинов *Bac. Perfingens* и их влияние на процессы обмена в организме животных и человека, Усп. биол. хим., 2, 292—305, Москва, 1954.
4. Кушко И. В., Коников А. П., Инглова А. С., Очистка и кристаллизация эритрогенного скарлатинозного токсина, Воп. мед. хим., **4**, 33, 1958.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ X

1. Перов С. С., Биохимия белковых веществ, Москва, 1951.
2. Сумцов Б. М., Фракционирование белков грудного молока электрофорезом на бумаге, Биохимия, **21**, 793, 1956.
3. Энгельгардт В. А., Ферментные системы, участвующие в молокообразовании, Усп. совр. биол., **29**, 60, 1950.
4. De Luca R., Cutroneo A., Compartamento electroforetico delle proteine del colostro di donna, Bull. Soc. Ital. Biol. Sperim., **31**, 203, 206, 1955.

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ XI

1. Белицер В. А., Саенко Т. В., Об изменениях состояния яичного альбумина под влиянием кислоты и щелочи, Биохимия, **22**, 254, 1957.
2. Кофман Е. Б., Фотохимические изменения в растворах яичного альбумина, идущие независимо от фотоденатурации, Биохимия, **15**, 534, 1950.
3. Кофман Е. Б., О фотоокислении сульфгидрильных групп яичного альбумина, Биофизика, **2**, 215, 1957.
4. Ореховичч В. Н., Левянт М. И., Левчук-Курохина Т. П., Включение меченых аминокислот в белки развивающегося куриного яйца, Биохимия, **19**, 610, 1954.
5. Орехович В. Н., Левянт М. И., Левчук Т. П., О включении аминокислот в белки неоплодотворенного куриного яйца, Биохимия, **20**, 714, 1955.
6. Тонгур В. С., Регенерация яичных альбуминов под давлением, Биохимия, **17**, 495, 1952.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абелин (Abelin A.) 625
Абель (Abel J. J.) 596, 603, 604, 606, 607
Абрахам (Abraham E. P.) 760
Аддисон (Addison T.) 569
Адер Г. (Adair G. S.) 341, 343, 428
Адер М. (Adair M. F.) 341, 343
Айбол (Iball J.) 44
Аккерман (Ackermann D.) 95
Александер Б. (Alexander B.) 367
Александер Дж. (Alexander J.) 39, 509
Альберт (Albert A.) 579
Альберти (Alberty R. A.) 757
Альтман (Altmann R.) 56
Амброзе (Ambrose J. F.) 26
Амуар (Hamoir G.) 101
Андерсон Е. (Anderson E. A.) 756
Андерсон Т. (Anderson T. F.) 158, 161, 163, 164
Ансельмино (Anselmino) 586
Анфинсен (Anfinsen C. B.) 285
Арбогаст (Arbogast R.) 157
Арндт (Arndt U. W.) 97
Аррениус (Arrhenius) 547
Арчер (Archer R.) 761
Асколи (Ascoli A.) 56
Астбери (Astbury W. T.) 82, 486
Аствуд (Astwood E.) 588, 589
Ашафенбург (Aschaffenburg R.) 725
Ашейм (Ascheim S.) 590

Б

Балмен (Bulman N.) 482, 496, 513, 532, 534
Банг (Bang I. Z.) 92
Барбиери (Barbieri J.) 220
Барк Д. (Burk D.) 758
Барк Н. (Burk N. F.) 193, 697
Барнет Б. (Barnett B.) 673
Барнет Ф. (Burnet F. M.) 39, 142, 170, 528, 529
Басс (Bass L. W.) 61
Бассет (Bassett R. B.) 578
Батлер Дж. (Butler J. A.) 616
Батлер Л. (Butler L. A.) 616
Баур (Baur E.) 173
Бебкок (Babcock S. M.) 724
Бейл (Bale W. F.) 309
Бейли В. (Bailey W. T.) 168
Бейли К. (Bailey K.) 11, 192, 201, 205
Бейн (Bain) 337, 748, 756, 757, 782
Бейтс (Bates) 586
Бекер (Becker E. L.) 518, 698
Беккари (Beccari) 188
Белл (Ball E. G.) 726
Белозерский А. Н. 59
Беналья (Benaglia A. E.) 652
Бенке (Behnke J.) 518
Беннет (Bennet J. P.) 290
Бенсли (Bensley R. R.) 90
Бенсон (Benson A. A.) 279
Бентинг (Banting F. G.) 606
Берг (Berg A.) 268
Берггрен (Berggren R. E.) 700
Бергман (Bergmann M.) 29, 30, 616
Бергольд (Bergold G. Z.) 145, 146
Берджер (Barger G.) 623, 624
Беренблюм (Berenblum I.) 490
Беренс (Behrens O. K.) 617, 618
Берлтроп (Barltrop J. A.) 280
Бернар (Bernard) 303
Берри (Barry J. M.) 728
Берридж (Berridge N. J.) 705
Берриен (Barrien B. S.) 287
Бест К. (Best C. H.) 606
Бест Р. (Best R. J.) 113
Берцелиус (Berzelius) 216
Бивен (Beaven) 356
Бизерт (Biserte G.) 209
Бинкли (Binkley F.) 285
Бир (Bier M.) 752, 766
Бирд (Beard J. W.) 144, 526
Бишоп (Bishop L.) 198, 205, 208
Бланшар (Blanchard M. H.) 341

Бли (Bly C. G.) 309
Бликс (Blix G.) 341, 344, 354, 375
Блок (Block R. J.) 233
Блум (Blum L.) 362
Блэк (Black L. M.) 139
Блэнк (Blank F.) 230
Бойд (Boyd W. C.) 480, 489, 496, 508, 514, 517, 518, 520, 522, 523, 533, 544, 545, 553
Бойер (Boyer P. D.) 532
Боке (Boquet P.) 670
Болдуин (Baldwin R. L.) 515
Боллинг (Bolling D.) 233
Болс (Balls A. K.) 34
Боннер (Bonner J.) 239, 242, 244, 245, 247, 250, 251, 252, 253, 255
Борде (Bordet J.) 147, 367, 477, 536, 544, 546
Борелл (Borell U.) 579
Бородин 22
Борроу (Borrows E. T.) 623
Босвел (Boswell J. G.) 278
Босворте (Bosworth A. W.) 693
Боттс (Botts J.) 552
Боуден (Bawden F. C.) 113, 114, 133, 134, 138
Боумен (Bowman W. M.) 558, 559
Боуэн (Bowen H.) 655
Брайс (Brice B. A.) 716
Браконно (Braconnot) 188
Браун А. (Brown A. P.) 500
Браун Д. (Brown D. M.) 64, 72, 73, 74, 75
Браун Дж. (Browne J. S.) 590
Браун Р. (Brown R.) 220, 221, 222, 230, 522
Браун Ф. (Browne F. L.) 692
Браунинг (Browning C.) 477
Браше (Brachet J.) 102, 111
Брейнл (Breinl F.) 39, 509, 526
Бриггс (Briggs D. R.) 204
Бринк (Brink N. G.) 589
Бронфенбреннер (Bronfenbrenner J.) 156
Брохульт (Brohult S.) 188
Брэнд (Brand E.) 323, 324 360, 723
Буавэн (Boivin A.) 105, 109, 677
Булл (Bull H. B.) 614, 715
Буров (Burow R.) 693
Бурстрём (Burström H.) 231, 289
Буссенго (Boussingault) 188
Бьёрнебе (Bjorneboe M.) 527
Бэйлисс (Bayliss W. M.) 569
Бэркер (Barker G. R.) 58
Бэрр (Barr M.), 537
Бюргер (Bürger M.) 618

В

Валквист (Vahlquist B.) 377
Валли (Waley S. G.) 612
Ван-Абеле (Van Abelee F. R.) 616
Ван-Дейк (Van-Dyke H. B.) 596, 604, 605
Вандендриссш (Vandendriessche L.) 340
Ван-дер-Шир (Van der Scheer J.) 493, 494, 547
Ван-Дик (Van Dyke H. B.) 575
Вандрели Р. (Vendrely R.) 105
Вандрели С. (Vendrely C.) 105
Ван-Слайк (Van Slyke L.) 693, 698
Ван-Хайнинген (Van Heyningen W. E.) 661
Вассерман (Wasserman P.) 20
Вебер (Weber J.) 337, 755, 756, 757, 758
Вейл (Weil A. J.) 558
Веймер (Weimer R. J.) 608
Велецкий (Welecki S.) 536
Велш (Waelsch H.) 268, 269
Вемер (Wehmer C.) 259
Вензинк (Wensinck F.) 666
Веттер (Wetter L.) 490
Виккери (Vickery H.) 216, 219, 223, 224, 226, 232, 233, 242, 259, 267
Вильсон И. (Wilson I. B.) 31
Вильсон П. (Wilson P. W.) 225, 257, 270
Вильямс Дж. (Williams J. W.) 513, 515, 518, 519, 521
Вильямс К. В. (Williams C. W.) 656
Вильямс К. М. (Williams C. M.) 370
Вильямс Р. (Williams R. E.) 661, 767
Винер (Wiener A. S.) 477, 507, 520
Винкатисен (Venkatesan T. R.) 264
Виннинг (Venning E. M.) 590
Винцлер (Winzler) 373
Виртанен (Virtanen A. J.) 225, 257, 262, 268, 270, 290
Виттлстон (Whittlestone W.) 602
Вихманн (Wichmann A.) 713
Во (Waugh D. F.) 319, 368, 606, 608
Воен А. (Vaughan A. C.) 662
Воен Дж. (Vaughan J. H.) 506
Войвод (Woiwod A. J.) 262
Волей (Wolley D. W.) 767, 768, 769
Волкин (Volkin E.) 75, 79
Вольф (Wolfe M.) 289
Вормел (Wormall A.) 488
Вроблевский (Wroblewski A.) 693
Ву (Wu H.) 502
Вуд (Wood J. G.) 227, 273, 283, 287
Вудс (Woods N. W.) 253
Вюрмзер (Wurmser R.) 511

Г

Гаддум (Gaddum J. H.) 624
Галленд (Gulland J. M.) 58, 72, 599
Гансен (Hansen R.) 376, 709
Гард (Gurd F.) 341, 342, 344
Гауровитц (Haurowitz F.) 39, 219, 307, 346, 347, 406, 481, 482, 484, 509, 523, 526, 527, 528, 529, 534, 557, 559
Ге (Gay F.) 477
Гебель (Goebel W. F.) 495, 516, 522, 532, 678
Гебермен (Haberman S.) 505
Гейдельбергер (Heidelberger M.) 347, 351, 352, 353, 362, 486, 487, 500, 502, 503, 517, 520, 525, 526, 533, 536, 537, 538, 544, 545, 547, 554, 557, 558, 620, 621
Гейлинг (Geiling E.M.K.) 618
Гектоен (Hektoen L.) 770, 771
Геллегер (Callagher T. F.) 599, 602
Геллерман (Hellerman L.) 26
Гемблтон (Hambleton A.) 558
Гендерсон (Henderson L. M.) 333, 510
Гершей (Hershey A. D.) 156, 157, 166—168, 548, 549, 550
Гиббс (Gibbs R. J.) 752, 766
Гибсон (Gibson J. G.) 313
Гипп (Hipp N. J.) 694, 700
Гири (Giri K.V.) 257
Гирш (Hirsh E. F.) 524
Гитлин (Gitlin D.) 306, 308, 521
Глезер (Glaser R. W.) 145
Гленни (Glenny A. T.) 537, 543
Голсуорси (Goldsworthy N. E.) 558
Гольдберг (Goldberg R. J.) 43, 519, 521, 552, 553, 554
Гольдер (Golder R. H.) 716
Гонт (Gaunt W. E.) 488
Гопкинс (Hopkins F. G.) 25, 726
Гордон А. (Gordon A. H.) 613
Гордон В. (Gordon W. G.) 690, 698, 713, 714
Гордон С. (Gordon S.) 600
Гормсен (Gormsen H.) 527
Госс (Goss H.) 593
Гофман (Gofman J. W.) 341, 345
Гочкис (Hotchkiss R. D.) 109
Гош (Ghoch B. N.) 550, 669
Гралén (Gralén N.) 193, 198
Гребер (Grabar P.) 490
Грегори (Gregory F. G.) 228, 274, 276, 277, 279, 288
Грейдон (Graydon J. J.) 661
Грёнвал (Grönwall A.) 719
Гриммер (Grimmer W.) 727
Грин А. (Green A. A.) 341
Грин Б. (Greene B.) 509
Гринберг (Greenberg D. M.) 697
Гринштейн (Greenstein J. P.) 89
Грип (Greep R. O.) 574
Гро (Groh J.) 696
Гровс (Groves M. L.) 722
Гросс (Gross J.) 625
Грунбаум (Grunbaum A.) 488
Грютер (Grueter F.) 576
Гуггисберг (Guggisberg H.) 700
Гуднер (Goodner K.) 517
Гуи (Guy R.) 505
Гурин (Gurin S.) 590, 591
Гутман (Gutman A. B.) 170, 309
Гуттер (Gutter F. J.) 747
Гутфройнд (Gutfreund H.) 610
Гутч (Gutsche A. E.) 280
Гэбель (Goebel W. F.) 28
Гюискемп (Huiskamp W.) 88, 98
Гюнтельберг (Güntelberg A. V.) 754

Д

Даймонд (Diamond L. K.) 477, 520
Дамодаран (Damodaran M.) 264, 269, 704
Даниельссон (Danielsson) 193, 195, 197, 203, 207, 209
Дарлингтон (Darlington C. D.) 174
Даунс (Dounce A. L.) 285
Дворецкий (Dworetzky M.) 670
Де (De S. S.) 669
Девис (Davis B. D.) 511, 514
Деволл (Davoll H.) 601
Дей (Day A. J.) 668
Дейхмиллер (Deichmiller M. P.) 306
Дейч (Deutsch H. F.) 337, 356, 376, 490, 691, 748, 756, 757, 763, 764, 765, 766, 779, 782
Деланж (Delange L.) 367
Делезен (Delezenne M. C.) 658
Делла Моника (Della Monica E. S.) 727
Дельбрюк (Delbrück M.) 168
Дельвич (Delwiche C. C.) 252, 254
Де-Мария (De Maria G. J.) 31
Демерец (Demerec M.) 148, 151
Ден Доорен де Йонг (Den Dooren de Jong) 170
Дент (Dent C. E.) 260, 263
Дентон (Denton R.) 477
Дерр (Doerr R.) 502
Деррье (Derrien Y.) 620, 621
Деснюэль (Desnuelle P.) 26
Джекобс В. (Jacobs W. A.) 57, 59, 80
Джекобс С. (Jacobs S. L.) 487

Дженретт (Jenrette W. V.) 89
Дженуэй (Janeway C. A.) 306, 313
Джонс В. (Jones W.) 59, 61, 69
Джонс Р. (Johns R. G.) 518
Джонс Ф. С. (Jones F. S.) 537, 538
Джонс Ф. Т. (Jones F. T.) 728, 763
Джонсон П. (Johnson P.) 203, 204
Джонсон Т. (Johnson T. B.) 626, 627
Джукс (Jukes T. H.) 775, 778, 781
Диксон (Dixon F. J.) 306
Диллс (Dills W. L.) 727
Дин (Dean H. R.) 477, 542, 543
Дингл (Dingle J.) 517
Динсли (Deanesly R.) 619
Дитц (Dietz P. M.) 254
Диш (Dische Z.) 372
Довей (Dovey A.) 707
Доддс (Dodds E. C.) 616
Дойзи (Doisey E. A.) 590, 591
Док (Dock W.) 312
Дотн (Doty P.) 610
Доун (Done J.) 265
Доэрман (Doermann A. H.) 165, 169
Дук (Duke J. A.) 766
Дункан (Duncan J. T.) 544
Дьюи (Dewey T. L.) 233
Дьюси (Duthie E. S.) 672, 673
Дэвис (Davis S. G.) 235
Дэлглиш (Dalgliesh C. E.) 285
Дю Виньо (du Vigneaud V.) 600, 601, 602, 603, 627, 628
Дюран-Рейнолс (Duran-Reynals F.) 676

Е

Егер (Jäger B. V.) 346, 360, 510, 516

Ж

Жене (Jeener R.) 99, 100
Жордан (Jordan D. O.) 58

З

Заменгоф (Zamenhof S.) 82
Захариус (Zacharius R. M.) 263, 265
Зейберт (Seibert F. B.) 513
Зейтц (Seitz) 673
Зёренсен М. (Sørensen M.) 713, 715, 727, 757, 770, 772
Зёренсен С. (Sørensen S.) 713, 717, 727, 747
Зильбершмидт (Silberschmidt K.) 173
Зингер Дж. (Singer J. J.) 246
Зингер С. (Singer S. J.) 44, 519, 521, 532, 538
Зингер Т. (Singer T. P.) 31

И

Ивановский Д. 112
Игл (Eagle H.) 673
Иенсон М. (Yenson M. M.) 557
Иенсен Х. (Jensen H.) 611
Иерсен (Yersin) 655
Излайкер (Isliker H.) 354
Икин (Eakin R. E.) 767
Ингелмен (Ingelman B.) 336
Иноуэ (Inoue S.) 652
Ирвинг (Irving G. W.) 595, 599
Ифантис (Yphantis D. F.) 319
Йемм (Yemm E. W.) 269, 276

К

Калмансон (Kalmanson G.) 156
Каминский М. 490
Камм (Kamm O.) 588, 595, 596
Камус (Camus) 247
Каролин (Caroline L.) 757
Карпентер Д. (Carpenter D.) 698
Карпентер Л. (Carpenter L.) 698
Каррер (Karrer P.) 262
Каррэр (Carrére M.) 147
Каруш (Karush F.) 353, 496, 518
Касперсон (Caspersson T.) 58, 59, 103, 110, 111, 222
Кастоpo (Chastoro N. Z.) 229
Каттнер (Kuttner A.) 709
Катцман (Katzman P. A.) 590, 591
Кауфман (Kaufman P. J.) 374
Квенсель (Quensel O.) 195
Кебет (Kabat E. A.) 350, 351, 502, 506, 518, 536, 537
Кегельс (Kegeles G.) 747
Кеквик (Kekwick R.) 372, 394, 713
Кей (Kay H. D.) 704, 778, 779, 781
Кейлин (Keilin D.) 41, 42, 338
Кельвин (Calvin M.) 227, 279, 280
Кендалл Е. (Kendall E. C.) 517, 525, 526, 544, 547, 619, 622, 625
Кендалл Ф. (Kendall F. E.) 315, 347, 353
Кенн (Cann J. R.) 349, 351, 354, 522, 748
Кеннен (Cannan R. K.) 720, 737, 738, 759, 762, 766, 771
Кетчпол (Catcole H. R.) 653
Кехлин (Koecpin B. A.) 337
Кёниг (Koenigs V. L.) 319

Кидо (Kido I.) 590
Кизель (Kiesel A.) 59
Кимура (Kimura F.) 156
Кирк (Kirk J. S.) 524
Кирквуд Дж. (Kirkwood J. G.) 354, 522, 525
Кирквуд С. (Kirkwood S.) 262
Кирней (Kearney E. B.) 31
Клаттон (Clutton R. F.) 491
Клейншмидт (Kleinschmidt W. J.) 532
Клейссон (Claesson L.) 591
Клечковский (Kleczkowski A.) 35, 484
Клобузяцкий (Klobusitzky D.) 649
Клод (Claude A.) 98, 104
Клотц (Klotz I. M.) 330, 333, 549
Кодама (Kodama S.) 693
Колдуэлл (Caldwell P. C.) 111
Коллип (Collip) 586, 590
Коминц (Cominz) 338
Комлин (Comline R. S.) 713
Коммонер (Commoner B.) 251, 253, 254
Кон В. (Cohn W. E.) 64, 75, 79
Кон Е. (Cohn E. J.) 303, 337, 341, 342, 355, 369, 381, 383, 394, 607, 700, 702
Консден (Consden R.) 613
Кори (Cori C. F.) 618
Кориелл (Coryell C.) 457
Корен (Corenn H. S.) 726
Коссель (Kossel A. Z.) 56, 87, 93, 101
Коул А. (Cole A. G.) 770, 771
Коул Х. (Cole H. H.) 593
Коулсон (Coulson E. J.) 730
Коэн (Cohen S. S.) 84, 121, 157, 158, 165, 166, 226, 270
Краус (Kraus R.) 537
Кребс (Krebs E. G.) 503
Крег (Craig L. C.) 607, 608, 611, 615
Крейг (Craig L. C.) 21
Креммер (Crammer J. L.) 751
Крик (Crick F. H.) 85, 86
Крит (Creeth J. M.) 319
Крог (Krogh A.) 311
Кроузер (Crowther C.) 709, 728
Кроуфут-Годкин (Crowfoot-Hodgkin D.) 610, 715
Крук (Crook E. M.) 244
Крэмптон (Crampton C. F.) 527
Крюгер (Krüger F.) 443
Кубин (Cubin H. K.) 752
Кумбс (Coombs R.) 477, 505
Кунитц (Kunitz M.) 34, 69
Кункель (Kunkel H.) 356
Кунс А. (Coons A. H.) 307
Кунс У. (Kuhns W.) 506
Кэмпбелл Г. (Campbell G.) 203
Кэмпбелл Д. (Campbell D. H.) 43, 346, 352, 482, 496, 513, 519, 521, 530, 532, 534, 544, 546
Кэмпбелл Е. (Campbell E. D.) 616
Кэмпбелл П. (Campbell P. N.) 285, 707, 728, 754, 769, 770, 773, 774, 778, 780
Кюри (Currie B. J.) 715
Кюстер (Küster W.) 410

Л

Лагг (Lugg J. W.) 232—237, 239—244, 247, 249, 255
Лайнуивер (Lineweaver H.) 764, 766, 772, 779
Лайонс (Lyons W. R.) 576, 577, 593
Ламм (Lamm O.) 747
Ландгрен (Lundgren H.) 518, 622
Ландстин (Lundsteen E.) 706
Ландштейнер (Landsteiner K.) 21, 27, 28, 30, 35, 346, 484, 488, 489, 491, 492, 493, 494, 500, 508, 536, 557
Ланкастер (Lancaster R.) 459
Лаустен (Lausten A.) 776
Лауффер (Lauffer M. A.) 718
Леб (Loeb L.) 578
Ле-Бретон (Le Breton E.) 652
Левен (Levene P. A.) 57, 58, 59, 61, 72, 80, 704, 765, 778, 782
Леви М. (Levy M.) 652
Леви Х. (Levy H.) 272
Левин (Lewin J.) 318
Ледебт (Ledebt S.) 658
Лейн (Laine T.) 262, 270
Лейн-Клейпон (Lene-Claypon J. E.) 727
Лейтчер (Leutscher J. A.) 315
Леки (Laki K.) 338
Лендвер (Landwehr G.) 367
Лендоу (Landow H.) 506
Ленз (Lens J.) 607, 612, 614
Ленни (Lanni F.) 346, 353, 544, 770
Леманн (Lehmann W.) 706
Леми (Lamy F.) 368
Лепов (Lepow I. H.) 362
Лерман (Lerman J.) 624
Леффлер (Loeffler) 112
Лёсер (Loesser A.) 578
Ли Д. (Lea D.) 144
Ли К. (Lee K. H.) 502

Ли С. (Li C. H.) 33, 573, 574, 576, 577, 589, 616, 719
Лилиенфельд (Lilienfeld L.) 88, 89, 98
Лимен (Lehmann J.) 693
Линдерштрём-Ланг (Linderstrøm-Lang K.) 334, 693, 696, 707, 721, 752, 754
Линдквист (Lindquist F.) 527
Липманн (Lipmann F.) 285, 704
Лисбонн (Lisbonne M.) 147
Литтл (Little R. B.) 709
Ллевеллин (Llewellyn) 661
Лок (Locke A.) 524
Лонг (Long C. N.) 33
Лонгсвортс (Longsworth L. G.) 737, 738, 747, 748, 754, 759, 760, 762, 766, 767, 768, 769, 771
Лонти (Lontie R.) 360
Лорелл (Laurell C. B.) 336, 338
Лоренц (Lorenz L. L.) 672
Лоу (Low B. W.) 319, 607
Лутвак-Манн (Lutwak-Mann C.) 25
Львов 170, 171, 172
Льюис Дж. (Lewis J.) 479, 761, 765, 768, 775
Льюис Л. (Lewis L.) 341
Льюис П. (Lewis P. S.) 752
Лэмб (Lamb W. G.) 104
Л'Эритье (l'Heretier Ph.) 175
Лэш (Lesh J. B.) 587
Людвиг (Ludwig W.) 625
Ляховский (Laskowski M.) 710
Ляховский мл. (Laskowski jr.) 710, 712

М

Магнус (Magnus P.) 142
Мад (Mudd S.) 39, 509
Майер М. (Mayer M. M.) 362
Майер Р. (Meyer R. K.) 520, 533, 575
Майлс (Miles A. A.) 678
Майхил (Micheel F.) 678
Мак-Артур (MacArthur C. G.) 604, 605
Мак-Доннелл (MacDonnell L. R.) 751
Мак-Иннес (MacInnes D. A.) 737, 738, 759, 762, 766, 771
Макино (Macino K.) 58
Мак-Калла (McCalla A. G.) 192, 198, 207
Мак-Каллум (MacCallum W. G.) 113
Мак-Карти (McCarty M.) 108, 309
Мак-Кенс (McCance R. A.) 729
Мак-Ки (McKee H. S.) 223, 265
Мак-Клин (McClean D.) 676
Мак-Леод (McLeod C. M.) 108
Мак-Микин (McMeekin T. L.) 315, 324, 338, 372, 686, 688, 703, 716, 717, 718, 719, 724, 728
Мак-Ферлан А. (McFarlane A. S.) 339, 344
Мак-Ферлан Р. (Macfarlane R. G.) 673
Мак-Ферсон (MacPherson C. F.) 538, 754
Мак-Шан (McShan W. H.) 575
Манн М. (Mann M.) 42
Манн Р. (Mann R. L.) 204
Манн Т. (Mann T.) 338
Марион (Marion L.) 262
Маркс (Marks J.) 662
Маркхэм Р. (Markham R.) 54, 144
Мартин А. (Martin A. J.) 613
Мартин К. (Martin C. J.) 21, 701, 752
Маршак (Marshak A.) 158
Маршалл (Marshall P. G.) 778, 779, 781
Маурер (Maurer P. H.) 306, 487
Машбёф (Macheboeuf M.) 340, 341, 342, 343
Машке (Maschke) 188
Мегем (Mecham D. K.) 777, 780
Медден (Madden S. C.) 308, 526
Мейн Е. (Main E. R.) 524
Мейер К. (Meyer K.) 371, 765, 769, 772
Мейер М. (Mayer M. M.) 558, 559
Мейстер (Meister A.) 268
Мелвилл (Melville J.) 264
Мелин (Melin M.) 341, 344
Мелкил (Malkiel S.) 490, 513
Меллон (Mellon E. F.) 701
Мель (Mehl) 373
Мендель (Mendel L. B.) 651
Менегини (Meneghini M.) 252, 254
Меринг (Mering J.) 606
Мерлин (Murlin J. R.) 617
Меррек (Marrack J. R.) 346, 347, 484, 496, 509, 517, 518, 534, 536, 544, 545
Месробеню (Mesrobeanu L.) 677
Мёрнер (Morner C. T.) 764
Миллендер (Mellander O.) 692, 693, 694, 705
Миллер Г. (Miller G. L.) 713, 716
Миллер Л. (Miller L. L.) 309
Миллер Х. (Miller H. K.) 268
Минловский (Minlowski V.) 606
Мирский А. (Mirsky A. E.) 90, 95, 96, 98, 104, 105, 107
Мирский И. (Mirsky I. A.) 20
Мишель (Michel R.) 620, 621, 627
Мишер (Miescher F.) 54, 55, 56, 59 87, 88, 89, 92, 95
Мойер (Moyer L. S.) 248, 249

Моралес (Morales M. F.) 552
Морган Е. (Morgan E. J.) 25, 726
Морган У. (Morgan W. T.) 677, 678
Морган Ф. (Morgan F. G.) 661
Мори (Mori T.) 765
Моррис (Morris) 586
Моррисон П. (Morrison P. R.) 364
Моррисон Р. (Morrison R. I.) 263
Моул (Moule Y.) 652
Муе Д. (Moore D. H.) 754
Муе С. (Moore S.) 324
Мулдер (Mulder G. J.) 692
Муррей (Myrray G. R.) 619
Мутсаарс (Mutsaars W.) 489
Мутценбеккер (Mutzenbecker P.) 625, 626
Мьеттинен (Miettinen J. K.) 261
Мэккор (Mackor E. L.) 111
Мюир (Muir R.) 477
Мюллер (Mueller J. H.) 259
Мюррей (Murray C. W.) 764, 766

Н

Найт (Knight C. A.) 13
Найтингейл (Nightingale G. T.) 223, 287
Натталл (Nuttall G. H.) 18, 499
Наттинг Г. (Nutting G. C.) 716
Наттинг М. (Nutting M. D.) 34
Неджер (Najjar V. A.) 503
Нейбергер (Neuberger A.) 260, 265, 266, 751
Нейман (Neumann A.) 56
Неймейстер (Neumeister R.) 764
Нейрат (Neurath H.) 17, 30, 40, 506, 513, 521, 611
Нейсмит (Naismith W. E.) 204
Нельсон (Nelson J.) 513, 727
Нидхем (Needham J.) 736, 781
Николас (Nicholas D. J. D.) 289
Николет (Nicolet B. H.) 705
Нитшманн (Nitschmann H.) 700, 706
Нич (Nitsch J. P.) 229
Новик (Novick A.) 169
Норд (Nord F. F.) 752, 766
Нортроп Дж. (Northrop J. H.) 29, 36, 151, 155, 156, 515, 516, 522
Нортроп Ф. (Northrop F. E.) 315
Ньютон Н. (Newton N.) 256
Ньютон У. (Newton W. H.) 599

О

Обель-Лезюр (Aubel-Lesure G.) 511
Обермауер (Obermayer F.) 21, 481, 482
Огстон (Ogston A. G.) 716
О'Келл (O'Keil C. C.) 543
Окесон (Akeson A.) 725
Олбриттон (Albritton E. C.) 368
Оливер (Oliver G.) 595
Олкотт (Olcott H. S.) 22, 23, 332, 777, 780
Олсберг (Alsberg C. L.) 778
Олсоп (Allsopp A.) 229
Ольдертон (Alderton G.) 757, 760, 775, 776, 777, 780
Онклей (Oncley J. L.) 305, 313, 337, 339, 341, 344, 349, 355, 763
Оноэ (Onoe T.) 779
Оппенгеймер (Oppenheimer E.) 113
Оргель (Orgel G.) 91
Оркэт (Orcutt M. L.) 537, 538, 709
Орландо (Orlando A.) 173
Орс (Orth H.) 410, 411
Осборн (Osborn T.) 19, 56, 57, 188, 189, 190, 203, 205, 217, 218, 651, 695, 696, 754, 769, 770, 773, 774, 778, 780
Освальд (Oswald A.) 619, 620
Оттесен (Ottesen M.) 752, 754
Оудин (Oudin J.) 516, 655
Оухтерлони (Öuchterlony Ö.) 516

П

Пайк (Paic M. M.) 511
Пак (Puck T. T.) 163, 164
Пальмер А. (Palmer A. H.) 690, 715, 719, 763
Пальмер У. (Palmer W. W.) 620, 621
Паппенгеймер (Pappenheimer A. M.) 36, 307, 347, 350, 506, 515, 518, 520, 521, 655, 656
Парвентьев И. А. 36
Парди (Pardee A.) 496
Паркс (Parkes A. S.) 587, 619
Паулинг (Pauling L.) 28, 29, 30, 39, 40, 347, 457, 493, 495, 496, 509, 518, 523, 524, 530, 531, 544, 545, 550, 551
Педерсен (Pedersen K. O.) 339, 351, 376, 621, 688, 689, 698, 713, 714, 715
Пейн (Payne R. W.) 588
Пейнтер (Painter H. M.) 693
Пеннасе (Penasse L.) 765
Пеннингтон (Pennington D.) 767
Перкинс (Perkins M. E.) 59
Перлмен (Perlmann G. E.) 374, 697, 705, 748, 750, 753
Перринг (Perring J. D.) 319

Перутц (Perutz M. F.) 717
Пескетт (Peskett G. R.) 729
Петерман (Petermann M. L.) 36, 350, 515
Петри (Petrie A. H.) 227, 232, 286
Пик (Pick E. P.) 21, 481, 482
Пиккельс (Pickels E. G.) 248
Пиллимер (Pillemer L.) 362, 394, 554, 556
Пири (Pirie N. W.) 99, 113, 114, 133, 134, 135, 138, 242, 245, 678
Пириа (Piria) 219
Пирс (Pierce J. G.) 600
Питт-Риверс (Pitt-Rivers R.) 331, 624, 625, 626
Плещина (Plescia O. J.) 518
Плиммер (Plimmer R. H.) 773
Пломлей (Plomley K. F.) 700
Полис (Polis B. D.) 724, 727
Поллистер (Pollister A. W.) 90, 95, 96, 98
Полсон (Polson A.) 156, 159, 163, 747
Попено (Popenoe E. A.) 602
Порат (Porath J. O.) 589
Портер К. (Porter K. R.) 366
Портер Р. (Porter R.) 7, 16, 21, 35, 36, 352, 485, 530, 757, 765
Портье (Portier P.) 478
Поттер (Potter J. S.) 104
Поттс (Potts A. M.) 599, 602
Поуп (Pope C. G.) 36
Поуэл (Powell R. E.) 698
Прайс С. (Price S. A.) 661
Прайс У. С. (Price W. C.) 248
Прайс У. Х. (Price W. H.) 160
Прессмен (Pressman D.) 29, 362, 485, 493, 496, 525, 544, 545
Престон (Preston C.) 226, 266, 267, 287
Прир (Preer J. R.) 174, 175
Прум (Proom H.) 262
Прянишников Д. Н. 224, 225, 226, 227, 263
Пэдж (Page I.) 341, 345
Пэн (Pan S. Y.) 575

Р

Рабидо (Rabideau G. S.) 238
Рабинович (Rabinowitch E. И.) 248
Райдл (Riddle O.) 576
Райкер (Riker A. J.) 280
Райли (Riley D. P.) 97
Раймингтон (Rimington C.) 372, 375, 594, 704
Райнерт (Reinert M.) 650
Райстрик (Raistrick H.) 709, 728
Рамахандран (Ramachandran B. V.) 704
Рамон (Ramon G.) 524, 542
Расс (Russ V.) 502
Рассел (Russell H. L.) 724
Рапкин (Rapkine L.) 17
Рапп (Rapp H. J.) 558, 559
Рейнеке (Reineke E. P.) 624, 625
Рейнке (Reinke J.) 248
Рейс (Race R. R.) 520, 521, 538
Рейфер (Reifer L.) 264
Рейхерт (Reichert E.) 500
Ретнер (Ratner B.) 709
Рибейрот (Rebeyrotte P.) 341
Риклесс (Rickless P.) 230
Рис М. (Reese M. C.) 612
Рис Х. (Ris H.) 96, 104, 105, 107
Риттенберг (Rittenberg D.) 308
Ритхаузен (Ritthausen H.) 188, 269
Ричардс (Richards F. J.) 274, 286, 311, 312
Риче (Richet C.) 478
Роббинс (Robbins W. R.) 287
Робертсон (Robertson N. R.) 220
Робинсон Е. (Robinson E.) 221, 231
Робинсон Р. (Robinson R.) 760
Ровери (Rowery M.) 26
Розен (Rothen A.) 43, 44, 532, 608, 757, 769
Розенблюм (Rosenblum H.) 728
Розенфельд (Rosenfeld M.) 596, 604
Романов А. И. 736
Романов А. Л. 736
Росс (Ross O.) 362
Россенбек (Rossenbeck H.) 59
Ротман (Rotman R.) 168
Ротон (Roughton F.) 430, 433
Роуз Р. (Rose R. C.) 198
Роуз У. (Rose W. C.) 259
Роуленде (Rowlands I. W.) 599
Роус (Rous P.) 526
Роха-и-Сильва (Rocha e Silva) 676
Роше (Roche J.) 620, 621, 627
Ру (Roux) 655
Рудалл (Rudall K. M.) 25
Руска (Ruska H.) 152, 154
Руэлл (Rouelle H. M.) 212
Рэмсделл (Ramsdell G. A.) 693

С

Сабин (Sabin F. R.) 526
Сайерс (Sayers G.) 33
Самнер (Sumner J.) 17, 524
Сангер (Sanger F.) 48, 260, 265, 266, 611, 612, 613, 614, 724

Сандегрен (Sandegren E.) 188
Саркар (Sarkar N. K.) 669
Саров (Sarrow A. H.) 322
Саундерс (Saunders W. M.) 515
Саюн (Sahyun M.) 607
Сведберг (Svedberg T.) 195, 697, 698, 713, 714
Свенссон Г. (Svensson H.) 341, 395
Свенсон П. (Swenson P. A.) 111
Себелье (Sebelien J.) 707
Севаг (Sevag M. G.) 559
Сезерленд (Sutherland E. W.) 618
Селтер (Salter W. T.) 622
Сен (Sen P. K.) 228, 274, 276, 277, 279
Сендор (Sandor G.) 343
Сенти (Senti F. R.) 715
Сесил (Cecil R.) 716
Сигал (Siegal M.) 496
Сигнер (Signer R.) 58
Сиджерс (Seegers) 367, 368
Сильва (Silva R. B.) 751
Симинович (Siminovitch L.) 17, 172
Симмет (Semmett W. F.) 713, 714
Симмс (Simms H. S.) 728
Симпсон (Simpson M. E.) 33, 576
Синдж (Synge R. L.) 613
Синн (Sinn L.) 618
Сквайр (Squire P. G.) 515
Скетчард (Scatchard G.) 313, 333
Скотт Д. (Scott D. A.) 606, 607
Скотт Ф. (Scott F. H.) 773
Скрибан (Scriban R.) 209
Слотта (Slotta K. H.) 658
Слоттер (Slotter K.) 501
Смит А. (Smith A. U.) 619
Смит Д. (Smith D.) 54
Смит Е. (Smith E.L.) 30, 248, 346, 356, 360, 509, 510, 516, 583, 690, 708, 723, 728
Смит К. (Smith K. M.) 144, 146
Смит М. (Smith M.) 661
Смит П. (Smith P. E.) 572, 578, 586
Смит Т. (Smith T.) 709
Смит. У (Smith W.) 671, 672
Снелл (Snell E.) 510, 767
Снэппер (Snapper I.) 488
Соммерс (Sommers S. C.) 487
Соннеборн (Sonneborn T. M.) 174
Сорэ (Soret A.) 423
Спек (Speck J. F.) 268
Спенсер (Spencer E. L.) 198, 253
Стедмен (Stedman E.) 90, 96, 102, 103
Стедмен (Stedman E.) 90, 96, 102, 103
Стейл (Stehl R. L.) 595, 599
Стейн (Stein W. H.) 762
Стейнер (Steiner R. F.) 611
Стенли (Stanley W. M.) 84, 113, 114, 121, 145
Стерлинг (Starling E. H.) 569
Стефен (Stephen J.M.L.) 616, 617
Стивенс (Stevens H.) 730
Стилмен (Steelman S. L.) 580
Страйкер (Stricker P.) 576
Стренг (Streng O.) 477
Стрит (Street H. E.) 223, 224, 226, 232, 242, 266, 276, 277
Стронг (Strong) 341
Стьюард Ф. (Steward F.) 216, 222, 223, 226, 229, 232, 238, 239, 242, 258, 260, 261, 263, 265, 266, 267, 276, 277, 279, 280, 287
Стьюарт К. (Stewart C. P.) 726
Стэпка (Stepka W.) 260, 263, 269
Сутермейстер (Sutermeister E.) 692
Сьёгрен (Sjögren B.) 713
Сэверборн (Säverborn S.) 195, 197, 208

Т

Такахаси (Takahashi N. N.) 253, 269
Таллис (Tullis J. L.) 303
Таннхаузер (Thannhauser S.) 157
Таппи (Tuppy H.) 627
Тарнер Дж. (Turner J. F.) 220
Тарнер К. (Turner C. W.) 624, 625
Тейлор А. (Таулор А. R.) 144
Тейлор Х. (Taylor H. E.) 109
Теллен (Tallan H. H.) 762
Темплемен (Templeman W.) 286
Тенгл (Tangl F.) 693
Теорелл Т. (Theorell T.) 543, 546, 551
Теорелл Х. (Theorell H.) 725
Тессье (Teissier) 176
Тизелиус (Tiselius A.) 314, 341, 377, 588
Тиманн (Thimann K. V.) 226, 231, 271
Тисловиц (Tyslowitz R.) 33
Титце (Tietze F.) 611
Тодд А. (Todd A. R.) 64, 72, 73, 74, 75
Тодд Е. (Todd E. W.) 362
Тодэй (Thoday D.) 242
Томпсон Дж. (Thompson J.) 216, 223, 226, 238, 242, 258, 261, 263, 265, 267, 277, 279, 280
Томпсон Е. (Thompson E. O.) 612
Томпсон Р. (Thompson R. E.) 608
Тресеви (Trethewie E. R.) 668
Трефферс (Treffers H. P.) 520, 533, 588
Триз (Trease G. E.) 224
Тристрам (Tristram G.) 216, 233
Тролл (Troll W.) 366

Трюрни (Trurnit H.) 44
Тсоу (Tsou C. L.) 34
Туорт (Twort F.) 146
Тэйлор (Taylor A. R.) 144
Тэнфорд (Tanford C.) 325
Тьюксбери (Tewkesbury L.) 626, 627

У

Уайкофф (Wyckoff R. W.) 146, 248
Уайт А. (White A.) 33, 578, 581, 587, 589
Уайт Г. (Wyatt G. R.) 58
Уайтинг (Whiting G. C.) 278
Уайттир (Whittier E. O.) 693
Уиддоисон (Widdowson E. M.) 729
Уилдмен (Wildman S. G.) 242, 244, 245, 246, 247, 249, 251, 252, 253, 255
Уилкокс (Wilcox P. E.) 332
Уимен (Wyman J.) 747
Уиппл (Whipple G. H.) 308, 526
Уокли (Walkly J.) 232
Уокмен (Wakeman A. J.) 695, 696
Уолл (Wall M. E.) 288
Уорд (Ward W. H.) 757, 760
Уордлоу (Wardlaw A. C.) 362
Уорк Е. (Work E.) 233
Уорк Т. (Work T. S.) 285
Уорнер (Warner R. C.) 336, 337, 694, 697, 715, 716, 717, 724, 735, 755, 756, 757, 758
Уотсон (Watson J. D.) 85, 86
Уэбб (Webb R. A.) 542, 543
Уэллер (Weller R. A.) 244, 247
Уэллс (Wells H. G.) 19
Уэтер (Wetter L. R.) 763
Уэтмор (Wetmore R. H.) 229

Ф

Фагрез (Fagraeus A.) 527
Фано (Fano U.) 148, 151
Фасбендер (Fassbender) 650
Фауден (Fowden L.) 235, 265
Фауст (Faust E.) 649
Феволд (Fevold H. L.) 736, 757, 760, 774, 775, 776, 777, 780
Феликс (Felix K.) 97
Феллерс (Fellers C. R.) 235
Фелтон (Felton L.) 356, 525
Феннер (Fenner F.) 528, 529
Фергусон (Ferguson J.) 433
Ферри (Ferry J. D.) 319
Фёльген (Feulgen R.) 59, 103
Фиала (Fiala S.) 758
Филд (Field C. W.) 651
Филитти-Вюрмсер (Filitti-Wurmsers) 533, 534, 535
Филлипс Д. (Phillips D. M.) 616, 617
Филлипс П. (Phillips P. H.) 376, 709
Филпот (Philpot) 698
Финней (Feeney R. E.) 751, 757, 758, 781, 782
Фишер Г. (Fischer H.) 410, 411
Фишер Э. (Fischer E.) 224
Фишман (Fishman M. M.) 248, 249
Флекенштейн (Fleckenstein A.) 670, 671
Флеминг (Fleming A.) 760
Флори (Flory P. J.) 552
Фогг (Fogg G. E.) 289
Форзит (Forsythe R. H.) 737, 738, 771
Фостер (Foster J. F.) 737, 738, 771
Фредерик (Fredericq E.) 611, 764, 765, 766
Фрезер А. М. (Fraser A. M.) 595, 599
Фрезер А. С. (Frazer A. C.) 345
Фрезер Д. (Fraser D.) 698
Фрей-Висслинг (Frey-Wyssling A.) 230
Френкель-Конрат (Fraenkel-Conrat H.) 22, 23, 332, 501, 579, 580, 616, 658, 757, 758, 762, 765, 767, 768
Френсис (Francis G. E.) 780, 781
Фромажо (Fromageot C.) 601, 609, 612, 628
Фрош (Frosch) 112
Фрутон (Fruton J. S.) 616

Х

Хагдал (Hagdahl L.) 588
Халвер (Halwer M.) 716
Хаммарстен Е. (Hammarsten E.) 58, 88
Хаммарстен О. (Hammarsten O.) 692, 693, 706
Хансен (Hansen R. G.) 510
Хант (Hunt G. E.) 261
Хантер (Hunter M.) 333
Харгривс (Hargreaves A. B.) 673
Харден (Harden A.) 727
Хардин (Hardin R.) 406
Харингтон (Harington C. R.) 606, 622, 623, 624, 625, 626
Харпер (Harper G. J.) 661
Харис Дж. (Hariss J. I.) 612, 616, 651
Харрис И. (Harris I.) 56, 57, 72

Харт (Hart G. H.) 593
Хартиг (Hartig) 188
Хартридж (Hartridge H.) 430
Харфенист (Harfenist E. J.) 607, 608, 609, 611, 615
Хевитт (Hewitt L. F.) 324, 372, 373, 375, 487
Хевн (Hawn C.) 366
Хейл (Heyl J. T.) 313, 671, 672
Хейнис (Hanes C. S.) 227, 285
Хемпел (Hempel W.) 693
Хенсон (Hanson E. A.) 249, 287
Херберт (Herbert D.) 42
Хёйруп (Hoyrup M.) 717
Хилл Д. (Hill D. W.) 704
Хилл Дж. (Hill J. M.) 505
Хилл Р. (Hill R.) 414
Хилл Т. (Hill T. L.) 552
Хойл (Hoyle L.) 143
Холден (Holden F.) 414
Холидэй (Holiday E.) 35, 356
Холлибертон (Halliburton W.) 88
Холлис (Hollies N.) 337
Холм (Holm G. E.) 704
Холмберг (Holmberg C. G.) 338, 366
Холмгрен (Holmgren H.) 579
Холтер (Holter H.) 705
Хоппе-Зайлер (Hoppe-Seyler) 54, 89, 408, 773
Хорсфолл (Horsfall F. L.) 517
Хоттл (Hottle G. A.) 776, 778, 779
Хоув (Howe P. E.) 708, 709
Хоул (Hole N.) 477
Хоуэлл (Howell W. H.) 595
Хофсти (Hofstee B J.) 17
Хох (Hoch H.) 375, 377, 518
Хочкис (Hotchkiss R. D.) 532
Христиансен (Christiansen G. S.) 226, 231, 271
Хукер (Hooker S. B.) 480, 489, 496, 517, 522, 523, 544, 545
Хуссей (Houssay B. A.) 578
Хьюмел (Hummel E. J.) 618
Хьюсон (Hewson W.) 302

Ц

Целлер (Zeller E. A.) 676
Циттл (Zittle C. A.) 727
Цондек (Zondek B.) 590

Ч

Чалмерс (Chalmers J.) 623
Чанутин (Chanutin A.) 375
Чаргаф (Chargaff E.) 82, 85, 773, 774, 775
Чейз (Chase M. W.) 35, 157, 166, 167
Чейн (Chain E.) 670
Ченс (Chance B.) 42
Чео (Cheo C. C.) 250
Чибнэл (Chibnall A.) 220, 223, 224, 225, 227, 228, 231, 232, 243, 249, 259, 265, 268, 283, 610, 612
Чик (Chick H.) 701, 752
Чирешко (Ciereszko L. S.) 579
Читтенден (Chittenden R. H.) 693
Чоу (Chow B. F.) 502, 573, 575
Чоу Хао Ли (Choh Hao Li) 569

Ш

Шантрен (Chantrenne H.) 99, 111
Шарп (Sharp D. G.) 144
Шахманн (Schachmann H. K.) 718
Шверт (Schwert G. W.) 30
Шейд (Schade A. L.) 272, 757
Шеллмен (Schellman J.) 334
Шемин (Shemin D.) 324
Шепард (Shepard C. C.) 156, 776, 778, 779
Шермерхорн (Schermerhorn L. G.) 287
Шерри (Sherry S.) 366
Шефер (Shäfer E. A.) 595
Шидловский (Shedlovsky T.) 573, 575
Шилард (Szilard L.) 169
Шинн (Shinn L. A.) 705
Шипли (Shipley R. A.) 618
Шлезингер (Schlesinger M.) 113, 114, 151, 156, 158, 162, 163
Шмидт (Schmidt G.) 157
Шмуклер (Schmukler H.) 725, 727
Шонгеймер (Schoenheimer R.) 308
Шорей (Shorey E. C.) 259
Штейдель (Steudel H.) 57, 58, 95, 97
Штейн М. (Stein M.) 597
Штейн У. (Stein W. H.) 324
Штейнберг Д. (Steinberg D.) 753
Штейнберг Р. (Steinberg R. A.) 273, 274, 280, 285, 287, 290
Штерн (Stern K. G.) 91
Штернбергер (Sternberger L. A.) 362, 485, 525
Штокмейер (Stockmayer W. H.) 552
Шугар (Shugar D.) 17
Шульман Shulman S.) 319, 363, 365, 36 , 367
Шульц (Sch z J.) 111
Шультце Schultze E.) 219, 220, 224, 226, 227, 229, 259, 260, 263, 265

Э

Эванс (Evans H. M.) 33, 572, 576, 577, 611
Эвери (Avery O. T.) 108, 495
Эвертзен (Evertzen A.) 614
Эггмен (Eggman L.) 245, 246
Эдельхох (Edelhoch H.) 43, 521
Эдсалл (Edsall J. T.) 521, 702
Эйзен (Eisen W.) 496, 518
Эймс (Ames R. G.) 605
Эккер (Ecker E. E.) 554
Эмменс (Emmens C. W.) 619
д'Эрелль (D'Herelle F.) 146, 149, 159
Эриксон (Erickson J. O.) 17, 40, 506
Эрлих (Erlich) 19, 651
Эррио (Herriott R. M.) 22
Эссекс (Essex H. E.) 670
Эсселен (Esselen W. B.) 235

Ю

Юз (Hughes) 301, 315, 316, 317, 318, 324, 325, 326, 334, 338, 394
Юнг (Young E. G.) 769, 771, 781, 782
Юрион (Urion E.) 199

Я

Ягендорф (Jagendorf A. T.) 242, 244, 245, 247, 253
Якобсен (Jacobsen C. F.) 34, 334
Янсен E. (Jansen E. F.) 34
Янсен C. (Janssen S.) 578

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абрин 650—652
— из семян индийского лакричника 501
Авидин 738, 739
— выделение 767
— — из яичного белка 100
— инактивация 769
— константа диффузии 748
— — седиментации 748, 769
— мол. вес 748, 769
— связывание биотина 7, 769
— удельный парциальный объем 748
Авидин А 768, 769
— — состав 768
Авидин NA 767—769
— — содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты 768
— — состав 768
Авидин ХА 768, 769
— — состав 768
Агглютинин О тифоидный 349
Агглютинины 503
Адениловая кислота дрожжевая 63
— — коэффициент молярной экстинкции 68
— — мышечная 63
— — — гидролиз смолой дауэкс-50 64, 65
Аденин ДНК *E. coli* 70
— — зародыша зерна пшеницы 70
— — — цыпленка 70
— — зобной железы теленка 70
— — икры сельди 70
— — полиэдрового вируса непарного шелкопряда 70
— — саранчи 70
— — саркомы мыши 70
— — селезенки быка 70
— — человека 70
— — черепахи 70
— коэффициент молярной экстинкции 68
Аденин РНК вируса желтой мозаики репы 69
— — — карликовой кустистости томата 69
— — — мозаики табака 69
— — дрожжей 69
— — карциномы печени 69
— — нуклеотропомиозина рыб 69
— — печени овцы 69
— — поджелудочной железы быка 69
— — — — свиньи 69
— — саркомы кур 69
— тритиконуклеиновой кислоты 56
— — цитоплазмы зобной железы теленка 69
Аденозин-2′-фосфат, см. Адениловая кислота дрожжевая
Аденозин-3′-фосфат, см. Адениловая кислота дрожжевая
Аденозин-5′-фосфат, см. Адениловая кислота мышечная
Адреналин, место образования 570
— физиологическое действие 570
Адренокортикотропный гормон, см. Гормон адренокортикотропный
Азот белковый в растущих клетках и клетках, находящихся в покое 228—230
— небелковый — азот белковый, количественное отношение 271—273
— — — — — — влияние CO_2 272, 273
— — — — — — — HCO_3^- 272, 273
— — — — — — — $K^+ : Ca^{2+}$ 272
— — — — — — — минерального питания 273, 291
— — — — — — — низкой температуры 273
— — — — — — — фосфата 273
— — в бобовых растениях 263, 264
— — продукты декарбоксилирования 261—263
— — в растениях, история открытия 259

Азот небелковый в растущих клетках и клетках, находящихся в покое 228—230
— — связь с белковым обменом в растениях 256—271
— — сравнение аминокислотного состава с а. с. белков 280—282
— общая экономия в организме растения 216—222
— распределение в гормоне роста 584, 585
Азот-15, применение для изучения обмена веществ в растениях 216, 223, 252, 253
Азота неорганические соединения 257
— органические небелковые соединения 257—259
Азотбензолгемоглобин 438
Азотный обмен 222 и сл.
— — и дыхание растений 222, 276—278
— — связь с другими жизненными функциями 275, 276
— — и углеводный обмен 222
— — и фотосинтез 278—280
Аланин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гистонов 94
— глиадина 210
— β-глобулина ячменя 210
— в гормоне роста 586
— зеина 210
— в инсулине 609, 612
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— ливетина 775
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 210
β-Аланин 258, 262
Альбумин гороха, аминокислотный состав 210
— молока и альбумин сыворотки крови 730
— содержащий углевод 372
Альбумин сывороточный, аминокислотный состав 324
— — асимметрия молекул 312, 319
— — быка, аминокислотный состав 324
— — «валентность» 497
— — взаимодействие с белками 321
— — влияние на объем плазмы 313
— — гетерогенность 314—317
— — группы, обусловливающие биологическую активность 23
— — денатурация 322, 333
— — димеризация ионами Hg 328—330
— — иодированный 331, 332
— — кривая титрования 325, 326
— — кристаллизация 317, 318
— — крови, подвижность 689
— — лошади/альбумин антисыворотки кролика в осадках 565
— — — аминокислотный состав 324
— — мол. вес 313, 319, 320, 497
— — мономолекулярные слои 18, 44
— — определение 314
— — определение ε-аминогрупп лизина 330, 331
— — — имидазольных групп 330
— — — карбоксильных групп 332, 333
— — — сульфгидрильных групп 327—330
— — — тирозильных остатков 331
— — и осмотическое давление белков плазмы 313
— — «пастеризация» 322
— — плазмы человека, состав 360
— — и проницаемость почечных гломерул 312
— — растворимость 320, 321
— — реакционная способность 325—335
— — как резервный белок 309
— — содержание серы 325
— — состав 323—325
— — устойчивость 321—323
— — физико-химические свойства 318—321
— — физиологические функции 335
— — человека, аминокислотный состав 324
— *Hordeum vulgare*, молекулярные константы 196
— яичный 736, 738—742, 754—756, 779
— — аминокислотный состав 744, 746
— — «валентность» 497

Альбумин яичный, выделение небелкового азота 753
— — гомогенность 747, 748
— — группы, обусловливающие биологическую активность 23
— — денатурация 750—752
— — — поверхностная 752
— — денатурированный, свойства 751, 752
— — дефосфорилирование кишечной фосфатазой 749, 750
— — — фосфатазой предстательной железы 749
— — — при хранении 754
— — динитрофторбензолпроизводные 745
— — константа диффузии 748
— — — седиментации 748
— — кристаллы 744
— — мол. вес 497, 747, 778
— — мономолекулярные слои 18
— — и плакальбумин 752—754
— — получение 742—744
— — содержание фосфора 748—750
— — титрование 745—747
— — углеводный состав 744, 745
— — удельный парциальный объем 747, 748
— — электрофоретическая неоднородность 748—750
Альбуминурия 312
Альдолаза 727
Амандин персика, константа диффузии 202
— — — седиментации 202
— — мол. вес 202
— элементарный состав 191
Аманитин 651
Амиды белков 269, 270
— в растениях 258
— синтез 268, 269
Амилаза 725
— поджелудочной железы, группы, обусловливающие биологическую активность 23
β-Амилаза ячменя, группы, сбусловливающие биологическую активность 23
α-Аминоадипиновая кислота 233
n-Аминобензоилфенилуксусной кислоты *d* и *l*-изомеры 494
Аминокислоты, встречающиеся в гидролизатах белков 232, 233, 257
— — в растениях, свободные 257, 258
— папоротниковых 240
Аминокислоты и синтез белков 227
α-Аминомасляная кислота 258
γ-Аминомасляная кислота 258, 261—263
— — белковой фракции картофеля 281
— — небелковой фракции картофеля 281
2-Амино-6-оксипурин, см. Гуанин
6-Аминопурин, см. Аденин
Аминофенолы и образование сульфгемоглобина *in vivo* 438
Амины в растениях 258
Аммиак и азотный обмен растений 225
— белковой фракции картофеля 281
— как источник азота 257
— небелковой фракции картофеля 281
Аммония сульфат, применение для кристаллизации сывороточного альбумина 317
Ангидрогемоглобин 409, 410, 457, 458
Андрогены, место образования 571
— физиологическое действие 571
Антибактериальный фактор молока, см. Молоко, антибактериальный фактор
Антибиотический фактор в парамеции 174, 175
Антигенные детерминанты, влияние изомеров 493, 494
— — — оптических изомеров 494—496
— — значение полярных групп 492, 493
— — природа 483—496
Антигены 478 и сл.
— «валентность» 496—498
— замещение групп в а. 27—29
— природа антигенных детерминантов 483—496
— и синтез сывороточного глобулина 39, 40
— условия антигенности 480—483
— частичный гидролиз 35, 36
Антикоагулянты 674
— змеиных ядов 674
Антиовальбумин кролика, группы, обусловливающие биологическую активность 23
— лошади, группы, обусловливающие биологическую активность 23
— очистка 353
Антипневмококковый полисахарид лошади, группы, обусловливающие биологическую активность 23

Антистрептолизин S 663
Антисыворотка кроличья против овальбумина, устойчивость 358, 360
— — — пневмококков, денатурация 358
Антитела 501 и сл.
— агглютинирующие, см. Агглютинины
— аллергические 506, 507
— анализы 509—511
— как белки 508, 509
— блокирующие 504—506
— валентность молекул 517—521
— видовые различия 516, 517
— гетерогенность 348—352, 522
— и γ-глобулины 348—352, 354, 357—360
— изоэлектрические точки 513
— иодирование 361, 362
— количественное определение 526
— млекопитающих, мол. вес 350
— множественность функций 502—508
— мол. вес 511, 512
— нейтрализующие 503
— образование 38—41, 526—531
— определение 346, 347
— осаждающие, см. Преципитины
— очистка 521—526
— полимеризация с белками 359
— получение в чистом состоянии 352, 357
— — — — — адсорбцией 352, 353
— — — — — специфическим осаждением 352
— природа детерминантов 522—524
— природные 507, 508
— и противоинфекционные функции 345—362
— реакции с антигенами 43, 47
— связывающие комплементы 503, 504
— соединение с антигенами 346, 347
— сочетание с соединениями диазония 362
— устойчивость 358—362
— физико-химические свойства 357—362
— форма молекул 513
— химические свойства 508—522
— частичный гидролиз 36, 37
— чувствительность к ферментам 515, 516
— электрофоретическая подвижность 513—515
Антитело—антиген соединение 531 и сл.
— — — авидность 537
— — — агглютинация 537, 538
— — — влияние электролитов 536
— — — действующие силы 531—533
— — — зоны агглютинации 537, 538
— — — нейтрализация токсинов и вирусов 536, 537
— — — преципитация 538 и сл.
— — — — зоны эквивалентности 539
— — — — количество осадка 538, 539
— — — — математическая теория 547
— — — — механизм реакции 543—547
— — — — молекулярный состав осадков 541
— — — — оптимальная скорость осаждения 542, 543
— — — — растворимость осадка 541
— — — — связь между оптимумом флоккуляции и нейтрализацией 543
— — — — состав осадка 540
— — — скорость реакции 533
— — — теплота взаимодействия 533—535
— против *n*-азофениларсоновой кислоты, очистка 353
— лошади, мол. вес 350
Антитоксин дифтерийный, гидролиз 36
Антитоксины, см. Антитела нейтрализующие
Арахин, аминокислотный состав 210
— диссоциация 203, 204
— константа диффузии 202
— — седиментации 202
— и легумин 204
— мол. вес 202
Аргинин альбумина гороха 210
— арахина 210
— бактериофага T_2 158
— белка спермы иглокожих 94
— — —моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— вицилина 210
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210

Аргинин глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— левитина 775
— легумина 210
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— и нуклеопротеиды 97
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14
— фосвитина 775
— штаммов вируса мозаики табака 14, 120
— эдестина 12, 210
— яичного альбумина 746
Аргиноянтарная кислота 258
Арсенаты и выделение дезоксирибонуклеопротеидов 91
Аспарагин—глутамин, относительное содержание в растениях 265, 266
— — связь свойств со структурой 267, 268
— — физико-химическое поведение 266, 267
— небелковой фракции картофеля 281
— и эдестин 269
Аспарагиновая кислота и азотный и белковый обмен в растениях 225
— — альбумина гороха 210
— — арахина 210
— — белка спермы иглокожих 94
— — — — моллюска 94
— — белковой фракции 281
— — вителлина 775
— — вицилина 210
— — гемоглобина лошади 416
— — гипофизарного гормона роста 584
— — гистонов 94
— — глиадина 210
— — глобулина коровьего молозива 723
— — β-глобулина ячменя 210
Аспарагиновая кислота зеина 210
— — как индуцирующее лизис средство 171
— — в инсулине 609, 612
— — казеина женского молока 723
— — — коровьего молока 723
— — лактогенного гормона 577
— — β-лактоглобулина коровьего молока 723
— — легумина 210
— — ливетина 775
— — миоглобина лошади 450
— — — небелковой фракции картофеля 281
— — образование из оксиминоянтарной кислоты 225
— — протаминов 94
— — содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— — фосвитина 775
— — эдестина 210
— — яичного альбумина 746
Аспарагинотрансфераза 269
Ауксин, см. 3-Индолуксусная кислота
α-Ахроглобин 467
β-Ахроглобин 467
γ-Ахроглобин 467
N-Ацетил-*dl*-тироксилтирозилглутаминовая кислота 626

Б

Байкиаин 258, 263
Бактерии лизогенные 115, 169—173
— цикл лизиса 159—161
Бактериофаг *E. coli* 113, 114
— *Staphyloccus*, выделение 151
— — инфекциозность 150
— — константа диффузии 150
— — — седиментации 150, 151
— — и лизис бактерий 160, 161
— — седиментация в ультрацентрифуге 155
Бактериофаг T_2, константа диффузии 156
— — константы седиментации 150, 155
Бактериофаг T_2r+, единичный цикл размножения 160
Бактериофаг T_4, константа диффузии 150, 163
Бактериофаг T_6, выделение 152
— — константы седиментации 150, 155, 156
— — продукты гидролиза 159

Бактериофаги 146 и сл.
— адсорбция на бактерии-хозяине 161—164
— — — — — влияние ионов 163, 164
— — — — — кинетика процесса 162, 163
— — — — — специфичность процесса 163
— и бактерии 147, 148, 159 и сл.
— выделение и очистка 151, 152
— генетика и размножение вирусов 167—169
— генетическая рекомбинация 168, 169
— диффузия 156
— *E. coli* 148, 149, 151—154, 156, 158, 160—162, 164—166, 169, 172
— изучение инфекциозных частиц 149, 150
— мутация 168
— образование внутри бактериальной клетки 164—167
— открытие 146
— размножение 159—164
— седиментация 155, 156
— устойчивость 154, 155
— фенотипические вариации 169
— физические свойства 152—156
— химический состав 156—159
— электронная микроскопия 152—154
— явление индукции при образовании б. 171, 172
Бактериофаги Т, биологические свойства 148
— — размеры и форма 149, 152—154
— — устойчивость 154, 155
— — физические свойства 150
Белки, возобновление синтеза 221, 222
— гипотеза клеточной матрицы при синтезе 218, 219
— глобулярные 217, 484
— дыхательные 406 и сл.
— — распространенность 406—408
— запасные 216, 217
— — отложение 219, 220
— иммунные, состав 350
— иммунологические свойства, влияние ацилирования 488
— — — — восстановления 487
— — — — галоидирования 488, 489
— — — — дезаминирования 487
— — — — денатурации 486
— — — — диазотирования 490
Белки, иммунологические свойства, влияние нитрования 489
— — — — обработки ипритом 490
— — — — обработки кислотой 487
— — — — — β-нафтохиносульфонатом 490
— — — — — фенилизоцианатом 490
— — — — — формальдегидом 487, 488
— — — — — щелочью 487
— — — — окисления 486
— — — — переваривания ферментами 487
— — — — этерификации 488
— иодированные, обладающие тиреоидной активностью 625—627
— конъюгированные 491, 492
— листьев 242—249
— — методы экстрагирования 243
— меристематических клеток 256
— метаболически активные 217, 218
— молока 686 и сл.
— — аминокислотный состав 722—724
— — и белки сыворотки крови 728—730
— — биологическое значение 686, 687
— — изменение в распределении в течение цикла лактации 690—692
— — коровьего, распределение 689
— — разделение и свойства 692 и сл.
— — распределение в молоке, метод ультрацентрифугирования 688—690
— — — — — электрофоретический метод определения 687—689
— — — в среднем смешанном молоке 687—690
— — снятого, электрофореграммы 688
— молочной сыворотки 707 и сл.
— — — альбуминовая фракция 712—715
— — — глобулиновая фракция 707—712
— нативные, специфичность видовая 499, 500
— — — функциональная 499
— основные спермы, выделение 95
— — — состав 95
— очищенные, анализ 233
— как переносчики метаболитов 336—345
— плазмы 301 и сл.
— — внутренняя вязкость 305
— — внутриклеточные 307, 308

Белки плазмы, источники 306, 307
— — обмен 309
— — осмотические свойства 313
— — в экстраваскулярной жидкости 306, 307
— в поверхностных пленках 218
— в реакциях иммунитета 477 и сл.
— регулирование синтеза 283, 284
— семян 187 и сл.
— — альбуминовая фракция 190, 192—196, 200, 207
— — аминокислотный состав 209—211
— — глобулиновая фракция 190, 192—197, 200, 201, 207
— — глютелиновая фракция 190, 192—195, 198—201, 207
— — гороха в период прорастания 209
— — — — — созревания 207, 208
— — — содержание незаменимых аминокислот 211
— — злаков в период хранения 208
— — проламиновая фракция 190, 192—196, 198—200, 207
— — пшеницы в период созревания 207
— — — содержание незаменимых аминокислот 211
— — сои, содержание незаменимых аминокислот 211
— — физико-химические методы анализа 192, 193
— — химический анализ 191
— — экстрагирование 189—191
— — ячменя в период прорастания 208, 209
— — — — — созревания 206, 207
— синтез 281, 285
— — влияние бора 289, 290
— — — железа 290
— — — калия 288, 289
— — — кальция 288, 289
— — — магния 288
— — — макроэлементов питания 286—289
— — — меди 290
— — — микроэлементов питания 289, 290
— — — молибдена 289
— — — серы 287, 288
— — — фосфора 286, 287
— — — цинка 290
— — *in vivo* 280—286
— — — — субстраты 280
— — в листьях и связь с развитием растения 231, 232
Белки семян во время роста путем клеточного деления 230, 231
— — и рост мясистых запасных органов 220, 221
— сыворотки крови и белки молока 728—730
— токсичные 639 и сл.
— — иммунологические свойства 644—646
— — распространенность 646—654
— — свойства и механизм действия 655—678
— — факторы, влияющие на токсичность 641—643
— токсоидирование 641, 642
— химически измененные 485—490
— хлоропластов 248, 249
— — отличие от белков цитоплазмы 249
— фибриллярные 217
— цитоплазмы 244—247
— — выделение 244, 245
— — гетерогенная фракция 245—247
— — гомогенная фракция 245—247
— — — — и вирусный белок 251, 252
— — — — фосфатазная активность 246
— яиц 735 и сл.
— — видовые изменения 781, 782
— — физические константы 778
Белковая фракция клубня картофеля, аминокислотный состав 281
— — растений, аминокислотный состав 232 и сл.
Белковые гормоны, см. Гормоны белковые
Белковый обмен, исторический обзор 223—228
— — в растениях 216 и сл.
— — связь с питанием 271, 275
— — — с процессами обмена веществ 275—280
Белок, аминокислотный состав 11—15, 45
— бактериофагов, химический состав 158, 159
— биологическая активность и аминокислотный состав 11—15, 45
— — — и блокирование активных групп 21—27, 46
— — — и конфигурация молекул 15—18, 45
— — — и растворимость 10, 45
— — — и структура 18—21, 41—45
— биологически активный, механизм образования 37—41

Белок вируса мозаики табака 253, 254
— — — — влияние на растворимые азотсодержащие соединения листьев 254
— вирусный, ингибиторы синтеза 253, 254
— глобулярный, размеры молекул 218
— замещение групп в б. 27—32, 46
— исследование природы биологической активности 41—45
— методы определения чистоты 10, 11
— общий бобовых, аминокислотный состав 234
— — губоцветных, аминокислотный состав 234
— — данные хроматографического анализа 236—238
— — злаковых, аминокислотный состав 234
— — зонтичный, аминокислотный состав 235
— — крестоцветных, аминокислотный состав 235
— — листьев 244
Белок общий луковицы тюльпана, аминокислотный состав 237
— — *M. piperita*, аминокислотный состав 234
— — пасленовых, аминокислотный состав 235, 237
— — пивных дрожжей, аминокислотный состав 235
— — розоцветных, аминокислотный состав 235, 238
— — *Chlorella vulgaris*, аминокислотный состав 235
— остаточный, выделение 96
— — состав 96, 97
— полиэдровых телец 145
— соевых бобов, экстрагирование 201
— специфичность 7 и сл., 45
— теории образования в клетке 111
— форма молекулы и биологическая активность 9, 45
— частичный гидролиз 32—37, 46
— яичный, белковый состав 738, 748
— — гетерогенность 736
— — состав 736
— — ферменты 772
— — фракционирование с применением сульфата аммония 739—741
— — — спиртом 741, 742
— — электрофореграммы 737
Белок М1, см. Гликопротеид кислый
Х-Белок 342—344
— мол. вес 343
— неустойчивость 343
— получение 339, 341, 342, 343
— состав 341, 343
— структура 344
Белок-хлорофилл комплекс 248, 249
Бензогидроксамовая кислота, образование 269
Бетаины в растениях 258
Биаля реакция 145
Биливердин 441
Биотин, связывание с авидином 769
Биуретовая реакция 109, 158
Бор, влияние на синтез белков 289, 290
Бора эффект 433, 434
Ботропотоксин 649
Брадикинин 676
Брадикиноген 676
5-Бутилпиколиновая кислота 258

В

Вазопрессин, аминокислотный состав 602, 603
— выделение 601, 602
— место образования 571
— строение 628
— тесты для определения окситоцического действия 596, 602
— физиологическое действие 571, 595, 596
— элементарный анализ 603
Валин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— миоглобина лошади 450

Валин небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Вердоглобин 441, 442
Вердоглобин и сульфгемоглобин 438
Вещества, вызывающие шок 675, 676
Вирус вакцины 113, 114, 138—140
— — константа седиментации 139
— — свойства 140
— — элементарный состав 140
— гриппа 114, 138, 141—143
— — группы А, агглютининовая фракция 143
— — группы А, антигенная фракция 143
— — константы седиментации 141
— — очистка 141
— — свойства 141—143
— — штаммы 141
— — элементарный состав 141
— желтый карликовости картофеля, константа седиментации 139
— — мозаики репы 127—131
— — — — антигенные свойства 131
— — — — «верхний» и «данный» компоненты 128—131
— — — — денатурация 130
— — — — константы седиментации 129
— — — — концевые группы рибонуклеиновой кислоты 78
— — — — кристаллы 130
— — — — очистка 127
— — — — рентгенографические исследования 130
— — — — содержание рибонуклеиновых кислот 69
— — — — спектр поглощения рибонуклеиновой кислоты 83
— — — — физические свойства 128—130
— — — — химические свойства 130, 131
— карликовой кустистости томата 124—127
— — — — денатурация 126
— — — — кристаллизация 125
— — — — кристаллы 114, 126, 127
— — — — очистка 125
— — — — парциальный удельный объем 126
Вирус карликовой кустистости томата, рентгенографические исследования 216
— — — — содержание рибонуклеиновых кислот 69
— — — — физические свойства 126, 127
— — — — химические свойства 125, 126
— кольцеобразной пятнистости табака 135
— — — — константа седиментации 135
— мозаики *Aucuba* 117
— — люцерны 135, 137
— — — константа седиментации 137
— — — свойства 137
— — табака 113
— — — активные группы 24
— — — аминокислотный состав 120
— — — и белковые фракции листьев 250—252
— — — «влажный гель» 122, 123
— — — влияние на синтез белков листа 255, 256
— — — — ультразвуковых колебаний 490
— — — группы, обусловливающие биологическую активность 24
— — — двулучепреломление в потоке 121, 122
— — — действие ферментов 119
— — — исследование методами рентгеновской кристаллографии 122, 123
— — — константа седиментации 123
— — — — — рибонуклеиновой кислоты 84
— — — кристаллизация 123
— — — нуклеиновая кислота 120, 121
— — — очистка 117, 118
— — — паракристаллы 114
— — — парциальный удельный объем 123
— — — и рибоза 114, 120
— — — содержание аминокислот 14
— — — — рибонуклеиновых кислот 69
— — — — фосфора 114
— — — спектр поглощения 121
— — — физические свойства 121—124
— — — химические свойства 119, 120

Вирус мозаики табака, хранение 118
— — — штаммы 117, 119, 120
— — — элементарный состав 119
— — томата 117
— — *Hyoscyamus* 138
— ночной бабочки кремовой тигровой расцветки 146
Вирус 3 огурца 117, 119
Вирус 4 огурца 117, 119
— — — аминокислотный состав 119, 120
— папилломы серого кролика 114, 138, 143, 144
— — — — — константа седиментации 143, 144
— — — — физические свойства 144
— — — — элементарный состав 143
— полиэдровый непарного шелкопряда, содержание дезоксирибонуклеиновых кислот 70
— пятнистости конских бобов 137, 138
— — — — и нуклеопротеид 137
— и растворимые азотсодержащие компоненты 254
— ребристости травы, аминокислотный состав 119, 120
— и синтез белков 255, 256
— энцефаломиелита лошади 144, 145
— южной мозаики фасоли 131, 132
— — — — — константа седиментации 132
— — — — очистка 131
— — — — свойства 132
X-Вирус картофеля 113, 124, 138
— — двулучепреломление 124
— — очистка 116, 124
Y-Вирус картофеля 138
— — очистка 116
Вирусы 112 и сл.
— животные 139 и сл.
— некроза табака 132—136
— — — кристаллы 133—135
— — — очистка 133
— — — свойства 133—135
— — — штаммы 133—135
— полиэдровые 145, 146
— — химический состав 146
— растительные 115 и сл.
— — как белка 250—256
— — — общие методы очистки 115—117
— — и рибонуклеопротеиды 115
Вителленин 774, 776, 780
Виттеллин 773—776, 780, 782
— аминокислотный состав 775
Виттеллиновая кислота, получение 778
— — и фосвитин 778
Вицилин, аминокислотный состав 210
— гороха, изменение содержания в период созревания 207
— — константа диффузии 202
— — — седиментации 202
— — мол. вес 202, 203
— — распад в период прорастания 209
— — содержание триптофана 203
Высаливание, применение для очистки вирусов 116, 117, 125

Г

Геликорубин 466
Гем, магнитная восприимчивость 454
— продолжительность существования 413, 414
Гем — глобин, взаимодействие 453—459
Гемы 410
Гематин солянокислый 451
Гематопорфирин 411
Гемиглобин, см. Метгемоглобин
Гемин, магнитная восприимчивость 454
α-Гемин 412
β-Гемин 412
γ-Гемин 412
Геминпротеоза 412
Гемины 410
Гемморагины змеиных ядов 675
Гемованадин 466, 467
Гемоглобин, аквакомплекс 431
— быка, распределение серы 417
— величина молекул 418, 419
— и гемохромогены 454, 455
— гидролиз 417
— действие нитритов 437
— денатурация 415
— диссоциация 419
— каталитические свойства 447, 448
— кислородная емкость 425
— козы, концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19
— количественное определение 451, 452
— — — по кислородной емкости 452
— — — колориметрическими методами 451, 452
— — — спектрофотометрическим методом 452

Гемоглобин, концентрация в цельной крови 407
— — — в эритроцитах крови 407
— коровы, концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19
— лошади, аминокислотный состав 416
— концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19
— — распределение серы 417
— и миоглобин 448—450
— мышечный, см. Миоглобин
— «неактивный» 442, 452
— и нитроксигемоглобин 437
— новорожденных детей 444
— овцы, концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19
— — распределение серы 417
— осла, концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19
— парамагнитная восприимчивость 454, 457
— и пепсин 412
— превращение в метгемоглобин 439
— — в сульфгемоглобин 438, 447
— и превращение ортоводорода в параводород 447
— приготовление и очистка 408—410
— простетическая группа 410—414
— распространенность 406, 407
— «синтетический» 414
— собаки, распределение серы 417
— содержание гема 412
— — железа 412, 418
— — в теле млекопитающих 407
— соединение с алкилизоцианидами 438
— — с кислородом 425—432
— — с нитробензолом 438
— — с трехфтористым фосфором 438
— — с цианидами 438
— спектры поглощения 421—424
— сродство к кислороду 425, 426, 433
— — к окиси углерода 434—437
— форма кристаллов 409
— — молекул 420, 421
— и хлорокруорин 460
— человека 443—446
— — концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19
— — определение с помощью бензидиновой реакции 452
— — распределение серы 417
— электрохимические свойства 432—434
Гемоглобин эмбриона человека, концевая аминокислота 19
— — — мол. вес 19
— энергия активации денатурации 415
Гемоглобин A 444, 446
Гемоглобин C 446, 500
Гемоглобин D 446
Гемоглобин F 444, 446, 500
Гемоглобин S 446, 500
Гемоглобин — карбоксигемоглобин, константа равновесия 437
Гемоглобина производные, магнитные свойства 458
Гемоглобинурия 439, 448
Гемоглобины беспозвоночных, изоэлектрическая точка 419
— — молекулярный вес 419
— — и хлорокруорин 419
— взрослого и эмбриона 443—445
— внеклеточные, мол. вес 407
— внутриклеточные, мол. вес 407
— — сродство к кислороду 431
— денатурация щелочью 442—444
— концевые остатки 19
— распределение серы 417
— растворимость 409
— специфичность 442—446
— сродство к кислороду 442
Гемокупреин плазменный 338
Гемолизин *Cl. septicum* 662
— яды кобры 664
— — — аминокислотный состав 664
— — — свойства 640
α-Гемолизин 661
β-Гемолизин 661
γ-Гемолизин 662
ε-Гемолизин 661
Гемолизины 657—664
— бактериальные 663, 664
— — инактивация 663
— — ингибирование холестерином 663
— — и сапонин 664
— нестойкие к кислороду 663, 664
— стафилококковые 661—663
— стойкие к кислороду 657—663
Гемохромогены и гемоглобин 454, 455
— имидазольные 456
— образование 453, 454
Гемоцианин как антиген 480
— встречаемость 460, 461
— живородящих, «валентность» 497
— — мол. вес 497
— моллюска *Busycon*, «валентность» 497

Гемоцианин моллюска *Busycon*, мол. вес 497
— получение 461
— распространенность 406
— соединение с кислородом 461, 462
— и эуглобулин 461
Гемоцианины, аминокислотный состав 461
— мол. вес 463
— содержание меди 461
— — серы 461
— спектры поглощения 464
Гемэритрин 464—466
— крови *Sipunculus*, спектр поглощения 465
— распространенность 407
— содержание железа 465
— соединение с кислородом 465
Генопротеид Т 91
Гепарин и предотвращение коагуляции крови 302
Гетерохроматин и синтез РНК и белков в цитоплазме 111
Гиалуронидазы 676, 677
Гиалуроновая кислота 676
Гидроксамовая кислота и глутаминовая кислота 269
Гидроксиламин и азотный обмен у растений 225
— и аэробное связывание азота 257
— и глутамин 270
Гипергликемический-гликогенолитический фактор, см. Глюкаген
Гипнотоксин, действие 647
Гиппуровая кислота, синтез 285
Гистамин пчелиного яда 650
— *Urtica dioica* 262
Гистидин альбумина гороха 210
— арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— вителлина 775
— вицилина 210
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
Гистидин β-лактоглобулина коровьего молока 723
— левитина 775
— легумина 210
— миоглобина лошади 450
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в глобине 414
— — в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
— яичного альбумина 746
Гистоны, аминокислотный состав 93—95
— выделение 93
— история открытия 88
— отделение от нуклеогистонов 95, 96
— свойства 93
Глиадин, аминокислотный состав 210
— константа диффузии 196
— — седиментации 196
— содержание азота 198
— *Triticum vulgare*, молекулярные константы 196
— элементарный состав 191
Гликопротеид кислый 373, 375
Гликопротеиды 371
α-Глицеролметилфосфат, гидролиз 72, 73
Глицилбетаин 271
Глицин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— инсулина 609, 612
— казеина коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14,120
— фосвитина 775
— эдестина 210
Глицинин сои 204, 205

Глицинин сои, константа седиментации 202
— — и легумин гороха 205
Глобин 414—418
— денатурированный, соединение с гемином 415
— нативный, денатурация 414
— и оксигемоглобин 414
— и протогемин 414
— содержание гистидина 414
Глобин-гемохромоген, образование 412, 415
Глобулин антипневмококковый, выделение 352, 353
— железосодержащий, см. Трансферрин
— зародыша зерна пшеницы 218
— иммунный 690, 691, 709
— — аминокислотный состав 723
— — и γ-глобулин сыворотки крови 728
— кокосового ореха 199
— молозива 708—712
— — аминокислотный состав 723
— — диализ 709
— — мол. вес 710
— молочной сыворотки, диализ 708
— — — получение 707, 708
— семян клещевины, кристаллизация 201
— — свеклы, константа диффузии 202
— — — — седиментации 202
— — — мол. вес 202
— — тыквы, аминокислотный состав 210
α-Глобулин сыворотки крови и глобулин молозива 691, 692
— *Hordeum vulgare*, молекулярные константы 196
β-Глобулин *Hordeum vulgare*, молекулярные константы 196
— ячменя, аминокислотный состав 210
γ-Глобулин кролика, гидролиз 36, 37
— плазмы человека, состав 360
— появление в крови при кормлении молозивом 708
— сыворотки крови и иммунный глобулин 728
— *Fricticum vulgare*, молекулярные константы 196
— *Hordeum vulgare*, молекулярные константы 196
— человека, состав 350
γ_1-Глобулин плазмы 349
γ_2-Глобулин быка, состав 350
— плазмы 349
Т-Глобулин, см. также γ_1-Глобулин
— быка, состав 350
— лошади, состав 350
Глобулиновая фракция семян ячменя 195—197
Глобулиновые системы в семенах бобовых растений 203—205
Глобулины арахиса 203, 204
— белка яиц 738, 741, 771, 772
— гороха 203
— семян двудольных, молекулярные константы 202
— — деполимеризация 206
— — злаков 195—197
— — — константы диффузии 196
— — — — седиментации 196
— — состав 12
— — устойчивость 205, 206
— — сои 204, 205
γ-Глобулины и антитела 348—352, 354, 357—360
— отделение от других белков плазмы осаждением цинком 356
— — — — — — электрофоретическим методом 354, 355
— плазмы человека, свойства 357
— поверхностная денатурация 360
— реакционная способность 360,361
— состав 350, 359
— устойчивость 359
γ_2-Глобулины плазмы, выделение 356
γ-Глутамилпептидные связи в гемоглобине 417
Глутамин и аспарагин 226, 227
— и глиадин 269
— небелковой фракции картофеля 281
Глутаминовая кислота и азотный и белковый обмен в растениях 225
— — альбумина гороха 210
— — арахина 210
— — белка спермы иглокожих 94
— — — — моллюска 94
— — белковой фракции 281
— — вителлина 775
— — вицилина 210
— — гемоглобина лошади 416
— — гипофизарного гормона роста 584
— — гистонов 94
— — глиадина 210
— — глобулина коровьего молозива 723
— — — семян тыквы 210

Глутаминовая кислота β-глобулина ячменя 210
— — зеина 210
— — казеина женского молока 723
— — — коровьего молока 723
— — лактогенного гормона 577
— — β-лактоглобулина коровьего молока 723
— — легумина 210
— — ливетина 775
— — миоглобина лошади 450
— — небелковой фракции картофеля 281
— — протаминов 94
— — содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— — фосвитина 775
— — эдестина 210
— — яичного альбумина 746
Глутамотрансфераза 269
Глутатион как индуцирующее лизис средство 171
— в растениях 258
Глюкаген, аминокислотный состав 618
— биологическая активность 618
— выделение 618
— единица активности 618
— физиологическое действие 617
— элементарный анализ 618
о-β-Глюкозидотирозин и желатина 12
— и инсулин 12
Глютелин, изменение содержания в период прорастания 208
Глютенин, содержание в семенах в период созревания 207
Гомосерин 258
Гонадотропин сыворотки жеребой кобылы 593—595
— — — — аминокислотный состав 594
— — — — выделение 593, 594
— — — — инактивация 595
— — — — место образования 570
— — — — свойства 595
— — — — содержание углеводов 594
— — — — физиологическое действие 570
— — — — элементарный анализ 594
— хориальной ткани женщины 590—592
— — — — выделение 590, 591
— — — — место образования 570
— — — — мол. вес 591
— — — — отличие от гипофизарных гонадотропинов 592
Гонадотропин хориальной ткани женщины, свойства 592
— — — — содержание углеводов 594
— — — — физиологическое действие 570
— — — — элементарный анализ 592
Гонадотролины мочи и сыворотки 590—595
Гонадотропные гормоны, см. Гормоны гонадотропные
Гордеин, изменение содержания в семени 199
— — — — — в период прорастания 208
— — — — — — — созревания семян 206
— константа диффузии 196
— — седиментация 196
— *Hordeum vulgare*, молекулярные константы 196
— элементарный состав 191
Гормон адренокортикотропный 586—590
— — активные группы 24
— — выделение 588, 589
— — гидролиз 33
— — группы, обусловливающие биологическую активность 24
— — место образования 570
— — методы определения адренокортикотропной активности 586, 587
— — физиологическое действие 570
— лактогенный 576—578
— — аминокислотный состав 577, 578
— — выделение 576—578
— — группы, обусловливающие биологическую активность 24
— — интернациональная единица 576
— — место образования 570
— — мол. вес 577, 578
— — тесты для определения лактогенной способности 576
— — физиологическое действие 570, 572
— паратироидный, группы, обусловливающие биологическую активность 24
— ростовой 581—586
— — аминокислотный состав 584
— — ассоциация молекул 583
— — выделение 582
— — инактивация 582, 585

Гормон ростовой, константа диффузии 583
— — — седиментации 583
— — место образования 570
— — мол. вес 583, 584
— — распределение азота 584, 585
— — физиологическое действие 570, 581
— стимулирующий интерстициальные клетки 572—574
— — — — выделение 573
— — — — группы, обусловливающие биологическую активность 24
— — — — инактивация 574
— — — — место образования 570
— — — — мол. вес 573
— — — — овцы, содержание углеводов 594
— — — — свиньи, содержание углеводов 594
— — — — физиологическое действие 570
— тиреотропный 578—581
— — выделение 579, 580
— — инактивация 581
— — константа седиментации 581
— — методы определения тиреостимулирующей активности 579
— — место образования 570
— — мол. вес 581
— — физиологическое действие 570
— — элементарный анализ 581
— фолликулостимулирующий 574—576
— — аминокислотный состав 575
— — влияние ферментов 575
— — выделение 574, 575
— — группы, обусловливающие биологическую активность 24
— — место образования 570
— — мол. вес 575
— — овцы, содержание углеводов 594
— — физиологическое действие 570
— — элементарный анализ 575
Гормоны белковые 569 и сл.
— гонадотропные 571—578
— задней доли гипофиза 595—605
— — — — биологическое определение 596, 597
— — — — международная единица активности 597
— — — — приготовление неочищенных экстрактов 597
— — — — частичное разделение окситоцина и вазопрессина 597—599
Гормоны метаболические 571, 578—590
— передней доли гипофиза 571—590
— плазмы 370, 371
— частичный гидролиз 32, 33
— щитовидной железы 619—627
— — — методы определения 619
Гофмана компоненты 345
Грамицидин, разложение на компоненты 21
Гуаниловая кислота, коэффициент молярной экстинкции 68
Гуанин ДНК *E. coli* 70
— — зародыша семени пшеницы 70
— — — цыпленка 70
— — зобной железы теленка 70
— — икры сельди 70
— — — полиэдрового вируса непарного шелкопряда 70
— — саранчи 70
— — саркомы мыши 70
— — селезенки быка 70
— — человека 70
— — черепахи 70
— коэффициент молярной экстинкции 68
— РНК вируса желтой мозаики репы 69
— — — карликовой кустистости томата 69
— — — мозаики табака 69
— — дрожжей 69
— — карциномы печени 69
— — нуклеотропомиозина рыб 69
— — печени овцы 69
— — поджелудочной железы быка 69
— — — — свиньи 69
— — саркомы кур 69
— тритиконуклеиновой кислоты 56
— — цитоплазмы зобной железы теленка 69

Д

Дальнодействующие силы и взаимодействие между белками 43—45
Дауэкс-50 и гидролиз адениловой кислоты 64, 65
Дегидраза триозофосфата 9,17
2-Дезокси-*d*-рибоза 61
Дезоксирибонуклеаза, расщепление дезоксирибонуклеиновых кислот 79,80, 81

Дезоксирибонуклеиновая кислота бактериофагов 156—158, 164—167
— — в вирусе вакцины 140
— — и гаплоидный набор хромосом 106—108
— — зобной железы, константа диффузии 84
— — — — — седиментации 84
— — — — мол. вес 84
— — и передача генетической специфичности 108, 109
— — содержание в клеточных ядрах 106
Дезоксирибонуклеиновые кислоты, двойная спиралевидная структура 85, 86
— — двойное лучепреломление в потоке 82
— — методы анализа 68, 69
— — и нуклеопротеиды 97
— — и реакция Фёльгена 101, 102
— — рентгенографические исследования 85, 86
— — связь с генетическим механизмом 105—108
— — состав 70
— — ферментативный распад 79, 80
— — электрометрическое титрование 84
Дейтеропорфирин, образование 411
Денатурация и биологическая активность белка 15—18, 45
Дженколиновая кислота 258
Диализ, применение для очистки вирусов 117
α,γ-Диаминомасляная кислота 258
α,ε-Диаминопимелиновая кислота 233
Дибромтирозин 233
Дидезоксиаденциловая кислота и расщепление дезоксирибонуклеиновых кислот 80
Диизопропилфторфосфат, инактивирующее действие 27, 47
3,5-Дииодтирозин 624
Динитрофенилинсулин, гидролиз 612
Динитрофеноловый метод 352
Диоксиацетонофосфат 727
2,6-Диоксипиримидин, см. Урацил
Диоксифенилаланин 258
Дипиколиновая кислота 258
Дифференциальное центрифугирование, применение для очистки вирусов 116, 118, 125, 127, 131, 141, 143, 144, 151, 157
Дрозофила, наследственная чувствительность к CO_2 175, 176

Ж

Желатина как антиген 482
— и *о*-β-глюкозидотирозин 12
— и фенилизотиоцианат 12
Железо, влияние на синтез белков 290
— комплекс с кональбумином 755—759
— и рост дифтерийной палочки 656
— содержание в лактопероксидазе 725
Желток яичный 772, 773
— — белковый состав 780, 781
— — состав 736
Желтуха тутового шелкопряда, возбудитель 145

З

Зародыш зерна пшеницы, содержание дезоксирибонуклеиновых кислот 70
Зеин, аминокислотный состав 210
— константа диффузии 196
— — седиментация 196
— *Zea mays*, молекулярные константы 196
Змеи аспидовые, виды 648
— гадюковые, виды 648
— гремучниковые, виды 648

И

Изолейцин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723

Изолейцин протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14,120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Изотопы и изучение обмена веществ в растениях 223
Иминокислоты, встречающиеся в гидролизатах белков 257
— — в растениях, но не в гидролизатах белков 257, 258
Иммунизация активная 644
— пассивная 644
Иммунитет 477, 478
Ингибитор трипсина из молозива 710—712
— — — — выделение 711
— — — — и ингибитор трипсина из сока поджелудочной железы 711
— — — — функция 712
— — яичного белка 764
Ингибиторы дегидразы 670, 671
β-Индолилацетонитрил 246
Индолилуксусная кислота 245, 246, 271
Инсулин 605—618
— активные группы 22—25, 616, 617
— аминокислотный состав 609, 613
— ассоциация молекул 610, 611
— быка, фракция А, аминокислотный состав 615
— — фракция В, аминокислотный состав 615
— выделение 606, 607
— гидролиз 32
— группы, обусловливающие биологическую активность 24
— из желез животных различных видов 614, 615
— изоэлектрическая точка 607
— инактивация 616, 617
— интернациональная единица активности 606
— концевые группы 611, 612
— место образования 570
— методы определения 606
— — — эффективности 606
— молекулярный вес 610, 611
— образование фибрилл 608
— овцы, аминокислотный состав 615
— окисленный, фракции 612—614
— разложение на компоненты 21
— растворимость 607
— реактивация 608
— свиньи, аминокислотный состав 615
Инсулин, содержание цинка 607
— структура молекулы 614
— фибриллы 608
— физиологическое действие 570
— формула 610
— фракции 607, 608
— элементарный анализ 608, 609
Инфекционные частицы 149, 150
Иод, инактивация рицина 652
— и определение остатков тирозина сывороточного альбумина 331, 332
— содержание в гормонах щитовидной железы 619, 620
— и специфическая активность антител 361
Иодгоргоновая кислота 233
Ионообменные колонки и разделение уридин-2′- и 3′-фосфатов 66
Иприт, влияние на иммунологические свойства белков 490
Ихтулиновая кислота 782

К

Кадаверин 262
Казеин 692 и сл.
— влияние кальция на константу седиментации к. 698
— — полярных групп на абсорбцию водяного пара 701
— выделение 692
— гетерогенность 693, 694
— женского молока, аминокислотный состав 723, 724
— — — элементарный состав 693
— коагуляция нагреванием 704
— константа седиментации 690
— коровьего молока, аминокислотный состав 723, 724
— — — элементарный состав 693
— метод разделения, основанный на применении растворов мочевины 696
— — — — на растворимости в воде 694
— — — спиртовый 694—696
— молозива 690, 691
— молока различных млекопитающих 707
— нефракционированный, изменение объема при растворении 702
— — истинная вязкость 700, 701
— — мол. вес 697
— — отношение осей молекул 700
— — плотность 702
— образование комплексов 696, 697

Казеин, плотность и уменьшение объема при растворении 701—704
— «регрессивного» молока 690
— свертывание сычужным ферментом 705—707
— содержание в молоке 687, 689, 692, 693
— физические свойства 698—701
— форма молекул в растворе 700
— фосфопептоны 704, 705
α-Казеин 690, 691, 694, 698, 705, 707, 724
— взаимодействие с β-казеином 697
— выделение из молока 694—696
— дефосфорилирование 697
— изменение объема при растворении 702
— истинная вязкость 700, 701
— кривая титрования 699
— отношение осей молекул 700
— плотность 702
— подвижность 689
— и протеаза 725
— свертывание сычужным ферментом 706
— содержание в казеине 694, 698
— соединительная емкость 699, 700
β-Казеин 690, 691, 694, 697, 698, 705, 707, 724
— выделение из молока 694—696
— изменение объема при растворении 702
— истинная вязкость 700, 701
— кривая титрования 699
— отношение осей молекул 700
— плотность 702
— подвижность 689
— свертывание сычужным ферментом 706
— содержание в казеине 694, 698
— соединительная емкость 699, 700
γ-Казеин 694, 698, 707
— выделение из молока 694—696
— действие сычужного фермента 706
— изменение объема при растворении 702
— истинная вязкость 700, 701
— кривая титрования 699
— плотность 702
— подвижность 689
— отношение осей молекул 700
— содержание в казеине 694, 698
— соединительная емкость 700
Калий, влияние на синтез белков 288, 289
Кальций, влияние на константу седиментации казеина 698
— — на синтез белков 288
— и коагуляция молока 706
Канавании 258
Капилляры, проницаемость 311, 312
«Каппа»-фактор 60, 174, 175
«Каппа»-частицы 174, 175
Карбгемоглобин 433, 434
Карбиламингемоглобины 438
N-Карбобензокси- S-бензил-*l*-цистеинил-*l*-тирозин-*l*-изолейцил-*l*-глютаминил-*l*-аспарагинил-S-бензил-*l*-цистеинил-*l*-пролил-*l*-лейцилглицинамид, см. Окситоцин, синтез
Карбоксигемоглобин 434—437
— диамагнитная восприимчивость 457
— и метгемоглобин 436
— мол. вес 434, 435
— мономолекулярные пленки 420
— окисление феррицианидом 436
— отличие от оксигемоглобина 434
— растворимость 409
— спектры поглощения 422—424, 435
— сходство с оксигемоглобином 434
Карбонилгемоглобин, см. Карбоксигемоглобин
Каталаза 727
— яичного белка 772, 779
Катгемоглобин 415
Кенапсовая кислота 340 — 342
— — и лецитин 342
— — получение 342
— — устойчивость 342
— — и холестерин 340, 342
α-Кетоглутарат аммония, превращение в глутамин 268
α-Кетоглутаровая кислота 236
— — и глутаминовая кислота 225
Кетокислоты и связь между азотным и углеводным обменом 225, 227
Кефалин, гидролиз 657, 660
Клейковина, седиментационный анализ 198
Клетки листа и включения в них 242, 243
Коагулянты 671—673
— змеиных ядов 673
Кокозин, см. Глобулин кокосового ореха
Коллагеназа *Cl. histoliticum* 674, 675
— *Cl. welchii* 674, 675
Комплемент 554—556
— количественное определение 556, 557

Комплемент, связывание 503, 504, 556
— — теория 557—559
Компоненты свертывания крови 362 и сл.
Кона метод 338, 339, 342, 356, 369, 381—395
Кональбумин 738, 740—743, 779
— комплекс с железом 755—759
— — — — электрофореграмма 755
— — с медью 757—759
— — с цинком 756—758
— константа диффузии 748
— — седиментации 748
— модификация в кислой среде 759, 760
— мол. вес 748, 757
— отделение от яичного альбумина 755, 756
— получение 754—756
— связывание железа 7
— — металла 757—759
— содержание углеводов 757
— и сывороточный глобулин крови 758
— удельный парциальный объем 748
— физические свойства 756, 757
Конарахин и вицилин 204
— диссоциация 204
— константа диффузии 202
— — седиментации 202
— мол. вес 202
Конглютинин 477
Конджестина, действие 647
Копропорфирин, образование 413
— и протопорфирин 413
Кортикоиды, место образования 571
— физиологическое действие 571
Кортикотропин, см. Гормон адренокортикотропный
Кортикотропин В 589
Коэффициент молярной экстинкции нуклеиновых кислот 82, 83
— образования инфицированных участков 150
Кребса цикл 270, 276—280
Кровь дефибринированная 302
— предотвращение коагуляции 302
Кроталотоксин 649
Кротин 651, 652
Кротоксин 658, 659
— группы, обусловливающие биологическую активность 24
— инактивация цистеином 658, 659, 669
— свойства 640, 658, 659
Ксантиноксидаза 726
— константа седиментации 726
Ксантиноксидаза, мол. вес 726
— очистка 726
Кулея болезнь 446
Кульминационный период развития плода 220
Кумбса проба 505
Курицин 651

Л

Лактаза 726
Лактальбумин 709
— получение 713
α-Лактальбумин 713—715
— получение 714
— свойства 715
— электрофоретическая подвижность 689
— элементарный состав 715
Лактенин, см. Молоко, антибактериальный фактор
Лактогенный гормон, см. Гормон лактогенный
Лактоглобулин, см. Глобулин иммунный
β-Лактоглобулин 690, 713, 714
— аминокислотный состав 723, 724
— влияние относительной влажности на плотность кристаллов 703, 704
— гетерогенность 719, 720
— гомогенный 720
— денатурация 721, 722
— диссоциация 719, 720
— изменение объема при растворении 702
— мол. вес 715, 716
— плотность 702
— получение 715
— растворимость 715, 719
— и сахароза 717—719
— содержание воды в кристаллах 702, 703, 716—719
— электрофореграмма 729
— электрофоретическая подвижность 689
β-Лактоглобулина додецилсульфат 721, 722
Лактопероксидаза 725
— мол. вес 725
— получение 725
— содержание железа 725
Лангерганса островки 605
Леггемоглобин 446, 447
— содержание железа 446
Легумин, аминокислотный состав 210

Легумин гороха, константа диффузии 202
— — — седиментации 202
— — мол. вес 202, 203
— — распад в период прорастания 209
— — содержание триптофана 203
— изменение содержания в период созревания 207
— элементарный состав 191
Легхолеглобин 446
Лейценол 258, 262
Лейцин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— ливетина 775
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Лектин 508
Лецитин, гидролиз 657, 660
— содержание в кенапсовой кислоте 342
Лецитиназа 659, 660
Ливетин 773—775, 778—782
— аминокислотный состав 775
— и вителлин 778
— выделение 779
— гетерогенность 778
Лизин альбумина гороха 210
— арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
Лизин белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— вицилина 210
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— левитина 775
— легумина 210
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 120
— яичного альбумина 746
Лизокефалин 658
Лизолецитин 658, 675
Лизоцим 738, 740—742, 772, 779
— активные группы 22, 23, 25
— инактивация 763
— константа диффузии 748
— — седиментации 748
— кристаллы 761, 763
— мол. вес 748, 763
— парциальный удельный объем 748, 763
— получение 760, 761, 768
— свойства 762, 763
— состав 761, 762
Лизоцима хлорид 763
Липаза 726
Липиды плазмы 339 и сл.
— транспортная функция 345
Липовителленин 774, 776, 780, 781
Липовителлин 773—776, 778, 780, 781
α_2-Липопротеид 345
β_1-Липопротеид, см. Х-Белок
Липопротеиды плазмы 339—354
— — состав 341

α-Липопротеиды 344, 345
Лихениформин *a*, мол. вес 14
Лихениформин *b*, мол. вес 14
Лихениформины 14, 15
Лэнгмюра уравнение 540, 548, 549
Лютеотропин, см. Гормон лактогенный

М

Магний, влияние на константу седиментации фосвитина 777
— — на синтез белков 288
Малахитовый зеленый как ингибитор образования мозаики табака 253
Малоновая кислота и инактивация сукциндегидразы 25
Марганец, влияние на синтез белков 289
Медь в вирусе вакцины 140
— влияние на синтез белков 290
— в гемоцианинах 461, 462
— комплекс с кональбумином 757—759
— в молоке 727
— содержание в плазме 338, 339
Мезопорфирин, образование 411
Метаболические гормоны, см. Гормоны метаболические
Метапротеин щелочной в вирусе вакцины 140
Метгемоглобин 439—441
— и глобин 414
— денатурация 440
— и карбоксигемоглобин 436
— константа диссоциации 440
— мол. вес 439
— и оксигемоглобин 431
— парамагнитная восприимчивость 457, 458
— равновесие между кислыми и щелочными растворами 440
— спектры поглощения 423
— теплота денатурации 415
Метгемоглобинемия идиопатическая 439
γ-Метиленглутаминовая кислота 258, 259
γ-Метиленглутаминовой кислоты амид 258, 259
— — моноамид 265
О-Метилизомочевина и определение ε-аминогрупп лизина сывороточного альбумина 330, 331
Метиловый зеленый и обнаружение рибонуклеиновых кислот в клетке 59
Метиловый зеленый, поглощение дезоксирибонуклеиновой кислотой 102, 111
N-Метилтирамин 262
5-Метилурацил, см. Тимин
5-Метилцитозин 62, 63
— ДНК *E. coli* 70
— — зародыша зерна пшеницы 70
— — — цыпленка 70
— — зобной железы теленка 70
— — икры сельди 70
— — полиэдрового вируса непарного шелкопряда 70
— — саранчи 70
— — саркомы мыши 70
— — селезенки быка 70
— — человека 70
— — черепахи 70
— коэффициент молярной экстинкции 68
— распределение в цепях 80
— содержание в РНК организмов различных видов 107
Метионин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Метмиоглобин 450, 451
Метод 6 фракционирования плазмы 384—389
Метод 9 фракционирования плазмы 389—395

α-Метод определения времени осаждения смесей антитело — антиген 542
β-Метод определения времени осаждения смесей антитело — антиген 542
Миллона реакция 109, 158
Миоглобин 448—451
— и гемоглобин 448—450
— денатурация щелочью 450
— лошади, аминокислотный состав 450
— — концевая аминокислота 19
— — мол. вес 19, 448
— окисление феррицианидом 450, 451
— превращение в метмиоглобин 450, 451
— распространенность 408
— содержание железа 448
— — в мышцах 448
— спектр поглощения 449
— сродство к кислороду 449
— — к окиси углерода 449, 450
Миозин, соединение с актином 9
Митохондрии и ферментативная активность 247
Многократность инфекции 150
Молибден, влияние на синтез белков 289
Молиша реакция 151
Молозиво 708
— значение в питании 709
— содержание белка 708
Молоко, антибактериальный фактор 728
— женское, состав 687
— коровье, состав 687
— млекопитающих, средний состав 687
— свертывание сычужным ферментом 705, 706
Моноиодгистидин 624
Моноиодтирозин 624
Мочевина в растениях 264, 265
Мукопротеид, мол. вес 312

Н

β-Нафтохиносульфонат, влияние на иммунологические свойства белков 490
Недостаток азота и баланс растворимого и белкового азота в листьях 274
— калия и баланс растворимого и белкового азота в листьях 274
Недостаток фосфора и баланс растворимого и белкового азота в листьях 274, 275
Нейротоксин бациллы ботулизма 653, 654, 665, 666
— — — типа А, аминокислотный состав 665
— — — — — действие 665
— — — — — свойства 640
— — — типа В, мол. вес 665, 666
— — — типа D, токсичность 666
— гремучниковых 667, 668
— *Crotalus terrificus*, см. также Кротоксин
— — — действие 667
— палочки Шига 667
— — — и дифтерийный токсин 667
— — — свойства 640
— — — R-формы 667
— — — S-формы 667
— столбнячный 654, 666
— — аминокислотный состав 666
— — действие 666
— — свойства 640
— — токсоидирование 642
Нейротоксины 665—669
— аспидовых 668, 669
— змеиных ядов 667—669
Никотиновой кислоты амид 271
Нингидрин 258, 259, 261
— действие на антитело кролика 361
Нитрат как источник азота 257
Нитрит как источник азота 257
о-Нитробензоат, соединение с антителом 29
Нитрогемоглобин, спектр поглощения 422
Нитрозобензолгемоглобин 438
Нитроксигемоглобин 441
— образование 437
— спектр поглощения 422, 438
Норадреналин, место образования 570
— физиологическое действие 570
Нуклеиновая кислота, биологические функции 105—112
— — вируса желтой мозаики репы 130, 131
— — — карликовой кустистости томата 125
— — — мозаики табака 120, 121
— — дрожжевая 56—59
— — — молекулярный вес 121
Нуклеиновые кислоты, деградация и структура 71—80
— — методы анализа 65—69
— — — — непрямые 65

Нуклеиновая кислота, методы анализа прямые 65
— — нуклеозиды 62, 63
— — нуклеотиды 63
— — пиримидины 62
— — продукты распада 63
— — пурины 62
— — в синтезе белка 110—112
— — соединение со специфическими белками 100, 101
— — состав 61—63
— — углеводные компоненты 61
— — удельный объем 82
— — ультрафиолетовая спектрофотометрия 103, 111
— — физические свойства 82—86
— — хроматографический анализ 66
— — электрометрическое титрование 83, 84
Нуклеозид-2′, 3′-моногидрофосфат и гидролиз нуклеотидов 73—75
Нуклеозид-5′-фосфаты и ферментативный распад дезоксирибонуклеиновых кислот 79—81
Нуклеозиды 62, 63
Нуклеопротеид зобной железы теленка, экстрагирование 88, 89, 91
Нуклеопротеиды 60, 61
— биологическая функция 105—112
— выделение 88—97
— — отделение составных веществ ядра от компонентов цитоплазмы 89
— из зобной железы, состав 97
— история открытия 87, 88
— из клеточных ядер 91
— природа 97—101
— связь со структурой клеточных ядер 101—104
— в синтезе белка 110—112
— химический состав 97, 98
— цитоплазмы 98—101
— экстрагирование растворами солей 88—91
Нуклеотиды 63
— выделение и деполимеризация 64, 65
Нуклеотропомиозин, содержание рибонуклеиновой кислоты 101

О

Овомукоид 738, 740, 741, 743—755, 779
— активные группы 24
— влияние нагревания 766
Овомукоид, гетерогенность 765, 766
— группы, обусловливающие биологическую активность 24
— динитрофенилпроизводные 765
— инактивация 766, 767
— константа диффузии 748
— — седиментации 748
— мол. вес 748, 766
— получение 764, 765
— углеводный состав 765
Овомуцин 738, 740, 741, 769—771
— выделение 769—771
— состав 771
2-Окси-6-аминопиримидин, см. Цитозин
Оксигемоглобин и геликорубин 466
— действие феррицианида 439
— денатурация 415
— диамагнитная восприимчивость 457
— и карбоксигемоглобин 434—437
— и катгемоглобин 415
— лягушки, кривые диссоциации 426
— моллюска Planorbis, кривая диссоциации 426
— окисление 409
— превращение в метгемоглобин 431, 439
— приготовление и очистка 408—410
— и протогемин 411
— спектры поглощения 422—424
— форма кристаллов 409
— и холеглобин 441
— человека, кривые диссоциации 426, 427
Оксигемоцианин краба, диссоциация 463
Оксидаза *l*-аминокислот змеиного яда, обратимая инактивация 16, 31, 32
— — — — природа активного центра 31, 32
— полифеноловая 273, 275, 278
— — и дыхание растений 278
Оксиминоянтарная кислота и аспарагиновая кислота 225
Оксилизин 233
5-Оксиметилцитозин дезоксирибонуклеиновых кислот бактериофагов Т 158
Оксимиоглобин, спектр поглощения 449
Окситирамин 262
Окситоцин, аминокислотный состав 600, 603

Окситоцин, выделение 600
— десульфурированный 601
— изоэлектрическая точка 600
— место образования 571
— мол. вес 600
— окисление надмуравьиной кислотой 600, 601
— синтез 628
— строение 627
— физиологическое действие 571, 595
— элементарный анализ 600, 603
Окситоцин — вазопрессин, частичное разделение 597—599
Опсонины 507
Орнитин 258
Осмометрический метод 419
Офиотоксин 649

П

Пантотеновая кислота 262
Папаин и вирус мозаики табака 119
— и гидролиз овальбумина 35
— группы, обусловливающие биологическую активность 23
Парагематины 453
Параказеин 706
Парамецин 174, 175
Паратироидный гормон, см. Гормон паратироидный
Пектин-тирозил-глобулин 678
Пектин-тирозил-желатина 678
Пепсин, гидролиз адренокортикотропного гормона 33
— — дифтерийного антитоксина 36
— — цитохрома с 34
— денатурация 15
Пептидаза яичного белка 772, 779
Пептиды в растениях 258
— синтез 284, 285
— специфичность 494
Перекись водорода как индуцирующее лизис средство 171
— — комплекс с пероксидазой хрена 42
Периферическое кровообращение 310, 311
Пермутит по Фолину 599
Пероксидаза хрена, образование комплекса с H_2O_2 42
Пиннаглобин 467
— содержание марганца 467
Пипеколиновая кислота 258, 263, 264
Пиримидины 62
Пиронин, поглощение рибонуклеиновой кислотой 102, 111
Питание и белковый обмен в листьях ячменя 274, 275
Питоцин, группы, обусловливающие биологическую активность 24
Плазма, ионный состав 304
—лиофилизация 303
— получение 303
— систематические методы фракционирования 379—395
— человека, электрофореграмма 378
Плазмагены и вирусы 173—176
Плазмин 369
Плазминоген 369
— превращение в плазмин 674
— устойчивость 369
— и фибрин 369
Плакальбумин 752—754
— образование 752, 753
— — из яичного альбумина 487, 490
— отличие от яичного альбумина 753
Поджелудочная железа, функции в организме 606
Полистиролы сульфированные 481
Полифеноловая оксидаза, см. Оксидаза полифеноловая
Полицетемия истинная, продолжительность существования гема 414
Порфирин из сульфгемоглобина 438
Порфирины 410—414
«Постзона» агглютинации 537, 538
Почки, функция 311, 312
«Презона» агглютинации 537, 538
Преципитины 502
Пробактериофаг 170—172
Прогемин хлористый, см. Тейхмана кристаллы
Прогестерон, место образования 571
— физиологическое действие 571, 572
Пролактин, см. Гормон лактогенный
Пролин белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— β-глобулина ячменя 210
Пролан, группы, обусловливающие биологическую активность 24
Пролин зеина 210
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723

Пролин лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— ливетина 775
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 210
Протамины, аминокислотный состав 92—94
— выделение 92
— история открытия 87
— и нуклеопротеиды 97
— распространенность 92
Протеаза 724, 725
— выделение из α-казеина 725
Протеоза 650
Протогемин бромистый 410
— иодистый 410
— получение из оксигемоглобина 411
Протопорфирин, образование 411
— структура 410
Протромбин 367, 368
— быка, физико-химические свойства 368
— выделение 367, 368
— и коагулянты ядов 672—674
— и тромбин 367, 368
Псевдогемоглобины 442
Псевдоглобулин 708, 709
— электрофоретическая подвижность 689, 710
Пурины 62
Путресцин 258, 262

Р

Реагины, см. Антитела аллергические
d-Рибоза 61
Рибонуклеаза и вирус мозаики табака 119
— группы, обусловливающие биологическую активность 23
— молекулярный вес 9
— разложение на компоненты 21
— и расщепление рибонуклеиновых кислот 69, 72—79
— ядов гремучих змей 675
Рибонуклеиновая кислота бактериофагов 157
Рибонуклеиновая кислота вируса желтой мозаики репы, спектр поглощения 83
— — — мозаики табака, константа седиментации 84
— — — энцефаломиелита лошади 144, 145
— — связь с частицами цитоплазмы 98—101
— — и синтез цитоплазматических белков 110, 111
Рибонуклеиновые кислоты, анализ 66—68
— — двойное лучепреломление в потоке 82
— — константы седиментации 84
— — методы анализа 66—69
— — номенклатура для описания структуры 76, 77
— — образование боковых цепей 78, 79
— — расщепление рибонуклеазой 69, 72—79
— — реакция с основными красителями 59
— — и синтез белков цитоплазмы 110—112
— — состав 69
Рибофлавин 271
Рицин 651, 652
— из бобов клещевины 501
— влияние протеолитических ферментов 651, 652
— гемоагглютинирующая активность 652
— действие иода 652
— свойства 640
— токсическое действие 652
Рицинин 259
Ричардса проба на белок 312
Робин 651
Ростовой гормон, см. Гормон ростовой
Ртуть и димеризация сывороточного альбумина 328—330

С

Сали метод определения гемоглобина 451
Сапонин и бактериальные гемолизины 664
Саркозин 233, 271
Сахароза и β-лактоглобулин 717—719
Светорассеяния метод 347

Седиментационный метод анализа белков семян 192, 193, 195, 198, 204, 207
Секретин, место образования 570
— физиологическое действие 570
Семена двудольных растений белковый состав 199—201
— — — физико-химический анализ 202—206
— однодольных злаковых растений, белковый состав 194, 195
— — — — физико-химический анализ 195—199
Сера, влияние на синтез белков 287, 288
Сера-35 в бактериофаге T_2 157, 158, 167
— применение для изучения белкового обмена 223, 239
Серебро, ингибирующее действие на уреазу 8, 26
Серин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— казеина женского молока 723
— — кровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14,120
— фосвитина 775
— эдестина 210
Серомукоид 372, 373
— и альбумин, содержащий углевод 372
Серповидная анемия 446, 500
— — продолжительность существования гема 414
Сидерофилин 452
Соланин, группы, обусловливающие биологическую активность 23
Соматотропин, см. Гормон ростовой
Сорэ полосы поглощения 423, 424
Стафилокиназа 674
Стафилокоагуляза 671—673
Стахидрин 259, 271
Стрептокиназа 674
Стрептолизин О 662—664
Стрептолизин S 662, 663
— — образование 662
Сульфгемоглобин 438
— и вердоглобин 438
— действие соляной кислоты 438
— образование 447
о-Сульфобензоат, соединение с антителом 29
Сульфонамиды и образование сульфгемоглобина *in vivo* 438
Сфингомиелин, гидролиз 657, 658, 660
Сыворотка молочная, получение 707
— «регрессивного» молока, электрофореграммы 729
Сывороточная болезнь 480
Сычужный фермент, см. Фермент сычужный

Т

Таурин 262
Тейхмана кристаллы 410
Тетаноспазмин, см. Нейротоксин столбнячный
3,5,3′, 5′-Тетраиод-*l*-тиронин, см. Тироксин, строение
1,3,5,8-Тетраметил-2-формил-4-винилпорфин-6,7-дипропионовая кислота 460
Тетрануклеотидная гипотеза 57, 58
Тетронэритрин 467
Тимин ДНК *E. coli* 70
— — зародыша зерна пшеницы 70
— — — цыпленка 70
— — зобной железы теленка 70
— — икры сельди 70
— — полиэдрового вируса непарного шелкопряда 70
— — саранчи 70
— — саркомы мыши 70
— — селезенки быка 70
— — человека 70
— — черепахи 70
— коэффициент молярной экстинкции 68
Тиогликолевая кислота как индуцирующее лизис средство 171
Тиоурацил как ингибитор образования мозаики табака 253, 254
Тиояблочная кислота как индуцирующее лизис средство 171

Тиреоглобулин 619—622
— выделение 620
— денатурация 621, 622
— денатурированный, свойства 622
— место образования 570
— мол. вес 620
— свиньи, состав 621
— — физико-химические свойства 621
— содержание иода 620
— физиологическое действие 570
Тиреотропный гормон, см. Гормон тиреотропный
Тироглобулин, «валентность» 497
— мол. вес 497
Тирозин альбумина гороха 210
—арахина 210
— бактериофага T_2 158
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— вицилина 210
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— легумина 210
— ливетина 775
— миоглобулина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Тироксин 619, 622—625
— выделение 622
— — из иодированных белков 625, 626
— место образования 570
— механизм образования 626, 627
— свойства 623
— синтез 623
— строение 622, 623
Тироксин, физиологическое действие 570
— щитовидной железы 233
d-Тироксин 624
l-Тироксин 623—625
— Биологическая активность 624, 625
Токсин дифтерийный 653, 655—657
— — активные группы 24
— — «валентность» 497
— — группы, обусловливающие биологическую активность 24
— — действие на шелкопряды *Sania Cecropia* 656
— — денатурация 15
— — мол. вес 497
— — роль железа 656
— — свойства 640
— — токсоидирование 642
Токсин дифтерийный /антитоксин лошади в осадках 540
Токсин скарлатины, группы, обусловливающие биологическую активность 24
α-Токсин Cl. welchii 641, 654, 660, 661
— — — нейтрализация ферментативной активности 644
— — — лизис эритроцитов 642
Токсины 501
— бактериальные 653, 654
— полимолекулярные 677, 678
Транспептидация 269
Трансферрин 336, 337
— и кональбумин 336
Треонин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723

Треонин миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 774
— эдестина 12, 210
Трибутириназа яичного белка 772
Триглутамин в *Pelvetia* 258
Тригонеллин 259, 271
3,5,3′-Триодтиронин как гормон 331
l-Триодтиронин 624, 625
Трипсин и вирус карликовой кустистости томата 125
— и вирус мозаики табака 121
— группы, обусловливающие биологическую активность 23
— обратимая денатурация 16
Триптамин 262
Триптофан альбумина гороха 210
— бактериофага T_2 158
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— вителлина 775
— вицилина 203, 210
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— легумина 203, 210
— ливетина 775
— миоглобина лошади 450
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— и сывороточный альбумин 323, 324
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Тритиконуклеиновая кислота 56, 59
Тромбин и коагулянты ядов 671, 673, 674
— получение 367
Тромбин, превращение фибриногена в фибрин 366, 367
Тропомиозин из мышц карпа 101
Туберкулин, состав 645
— чувствительность к т. больных и здоровых животных 645

У

Углеводы и роль дыхания 228, 277
Углерод-14, применение для изучения белкового обмена 223, 279, 309
Ультрацентрифугирование, применение для характеристики белков 244, 246, 247, 248, 303, 319, 347, 407, 418, 419, 688—690
Урацил РНК вируса желтой мозаики репы 69
— — — карликовой кустистости томата 69
— — — мозаики табака 69
— — дрожжей 69
— — кардиномы печени 69
— — нуклеотропомиозина рыб 69
— — печени овцы 69
— — поджелудочной железы быка 69
— — — — свиньи 69
— — саркомы кур 69
— — цитоплазмы зобной железы теленка 69
Уреаза, денатурация спиртом 10
— инактивация 17
— ингибирующее действие серебра 8
— молекулярный вес 8, 9
— мономолекулярные слои 17
— сульфгидрильные группы 26
Уридиловая кислота, коэффициент молярной экстинкции 68
Уропорфирины, образование 413

Ф

Факторы распространения 676, 677
— трансформации бактерий 108—110
Фаллоидин 651
Фёльгина реакция 101—104, 143, 145, 151, 175
Фенацитина производные и образование сульфгемоглобина *in vivo* 438
Фенилаланин орахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— белковой фракции картофеля 281

Фенилаланин вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина 210
— гормона роста 584, 586
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— левитина 775
— миоглобина лошади 450
— небелковой фракции картофеля 281
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Фенилаланиноль, выделение из овомукоида 765
Фенилгидантоин фенилаланина из инсулина 611
Фенилглицин 258
Фенилизоцианат, влияние на иммунологические свойства белков 490
Фермент сычужный, получение 705, 706
— — свертывание молока и казеина 705—707
Ферментативный распад дезоксирибонуклеиновых кислот 79—81
Ферменты адаптивные, образование 38—41
— замещение групп в ф. 29—32, 46
— изодинамические 643
— исследование природы биологической активности 42
— молока 724—728
— образование 37, 38
— плазмы 370
— частичный гидролиз 34, 35
Ферригемоглобин, см. Метгемоглобин
Ферритин 452
Фетуин 375—377
Фибрин и плазминоген 369
Фибриноген 363—367
Фибриноген быка, внутренняя вязкость 365
— — длина молекулы 365
— — константа вращательной диффузии 365
— — — диффузии 365
— — — седиментации 365
— — мол. вес 365
— — — парциальный удельный объем 365
— выделение 363, 364
— и коагулянты ядов 671, 672, 673, 674
— превращение в фибрин 366, 367
— устойчивость 366
— физические константы 365
— человека, внутренняя вязкость 365
— — длина молекулы 365
— — константа вращательной диффузии 365
— — — диффузии 365
— — — седиментации 365
— — мол. вес 365
— — парциальный удельный объем 365
— — состав 360
Фибринолизин стрептококковый, см. Стрептокиназа
— *Cl. welchii* 674
Фибринолизины бактериальные 674
Фитотоксины 650—652
Флавинаденинди нуклеотид в вирусе вакцины 140
Фолина реагент 751
Фолликулостимулирующий гормон, см. Гормон фолликулостимулирующий
Формальдегид, влияние на иммунологические свойства белков 487, 488
Фосвитин 774, 777, 778, 780, 781
— аминокислотный состав 775, 777
— и вителлиновая кислота 778
— влияние магния на константу седиментации 777
— выделение 777
— дефосфорилирование 778
— растворимость 777
Фосфатаза, группы, обусловливающие биологическую активность 23
— молока 726, 727
Фосфатидаза А 658—660
— — гемолизина яда кобры 664
— — кротоксина 658, 659, 667, 669
— — лизис эритроцитов 658
— — пчелиного яда 650

Фосфатидаза А, содержание серы 659
Фосфатидаза С 660, 661
Фосфатидазы, гидролиз кефалина 657
— — лецитина 657
— — сфингомиелина 658
Фосфоглицероальдегид 727
— —как естественный восстановитель 439
Фосфодиэстераза змеиного яда и разветвленность цепи рибонуклеиновых кислот 79
— — — расщепление дезоксирибонуклеиновых кислот 79, 81
— — — расщепление полинуклеотида 76
Фосфолипиды плазмы 340 и сл.
Фосфопептон из казеина, состав 704
Фосфопептона бариевая соль 704, 705
Фосфопептоны из казеина 704, 705
Фосфор, влияние на синтез белков 286, 287
Фосфор-32 в бактериофаге T_2 157, 158, 167
— включение в рибонуклеиновую кислоту 112
— применение для изучения белкового обмена 167, 223, 768, 780
Фосфосерилглутаминовая кислота 704
Фосфосерин из казеина 704
Фракционированное осаждение, применение для характеристики белков 244
Фрейндлиха уравнение 540, 548
Фруктозо-1,6-дифосфат, расщепление альдолазой 727
Фторметгемоглобин 440
Фумаровая кислота и инактивация сукциндегидразы 25

X

Халаза, состав 771
Химотрипсин, группы, обусловливающие биологическую активность 23
— обратимая денатурация 16
α-Химотрипсин, молекулярный вес 34
β-Химотрипсин 34
γ-Химотрипсин 34
δ-Химотрипсин 34
π-Химотрипсин 34
Химотрипсиноген, активация 34
Хлорокруорин 459, 460
— и гемоглобин 460
Хлорокруорин и гемоглобины беспозвоночных 419
— распространенность 406, 407
— содержание железа 459
— сродство к кислороду 460
Хлоропласт, содержание белка 248
— — липида 248
Хлорофилл а 248
Хлорофилл b 248
Холегемохромоген 441
Холеглобин 441
Холестерин вируса энцефаломиелита лошади 145
— ингибирующее действие на бактериальные гемолизины 663
— и кенапсовая кислота 340, 342
— в α-липопротеидах 344, 345
Холин 271
Холинэстераза, зависимость концентрации в крови от содержания в молоке 686
— концентрация в молозиве 729
— яда аспидовых 669
Хроматография на бумаге 222, 223, 227, 233, 236—239, 255, 258—261, 264
— на колонках 222, 236—238
Хроматографический метод анализа НК 66, 72
Хромозин, выделение 90
Хромозомин, выделение 96
Хромонематы 103
Хромосомы слюнных желез дрозофилы и ДНК 103, 104

Ц

Целлобиуроновая кислота и капсулярный полисахарид пневмококков 28
Церулоплазмин 338, 339
— и лакказа 339
— содержание меди 338
Цианидгемоглобин 438, 441
Цианиды как ингибиторы образования мозаики табака 253
Цианметгемоглобин 440
— восстановление дитионитом 441
Цианогематин 452
Цинк, влияние на образование ауксина 289
— — на синтез белков 290
— инактивация пчелиного и змеиного ядов 671
— комплекс с кональбумином 756—758

Цинк и определение имидазольных групп сывороточного альбумина 330
— и осаждение γ-глобулинов 356
— содержание в змеиных ядах 649, 671
— — в инсулине 607
— — в плазме 338
Цистеин гемоглобина лошади 416
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
Цистин арахина 210
— белка спермы иглокожих 94
— — — моллюска 94
— вителлина 775
— гемоглобина лошади 416
— гипофизарного гормона роста 584
— гистонов 94
— глиадина 210
— глобулина коровьего молозива 723
— — семян тыквы 210
— β-глобулина ячменя 210
— зеина 210
— иммунного глобулина коровьего молока 723
— казеина женского молока 723
— — коровьего молока 723
— лактогенного гормона 577
— β-лактоглобулина коровьего молока 723
— ливетина 775
— миоглобина лошади 450
— протаминов 94
— семян 12
— содержание в штаммах вируса мозаики табака 14, 120
— фосвитина 775
— эдестина 12, 210
Цистин — метионин, соотношение в белках 239, 240
— — — в дрожжах 239
— — — в злаковых 239
— — — в листьях люцерны 239
— — — в *Chlorella* 239
Цитидиловая кислота, коэффициент молярной экстинкции 68
Цитозин ДНК *E. coli* 70
— — зародыша зерна пшеницы 70
— — — цыпленка 70
— — зобной железы теленка 70
— — икры сельди 70
— — полиэдрового вируса непарного шелкопряда 70
— — саранчи 70
— — саркомы мыши 70
— — селезенки быка 70
Цитозин ДНК человека 70
— — черепахи 70
— коэффициент молярной экстинкции 68
— РНК вируса желтой мозаики репы 69
— — — карликовой кустистости томата 69
— — — мозаики табака 69
— — дрожжей 69
— — карциномы печени 69
— — нуклеотропомиозина рыб 69
— — печени овцы 69
— — поджелудочной железы быка 69
— — — — свиньи 69
— — саркомы кур 69
— — цитоплазмы зобной железы теленка 69
Цитолизины бактериальные 671, 675
— змеиных ядов 675
Цитохромы b 656, 657, 667, 668
Цитохром c 448, 668
— гидролиз 34
Цитраты и выделение дезоксирибонуклеопротеидов 91
Цитруллин 258

Щ

Щавелевоуксусная кислота и аспарагиновая кислота 225
— — и синтез белка в корнях 236

Э

Эдестан, константа седиментации 205
Эдестин, аминокислотный состав 210
— конопли, денатурация 205
— — константа диффузии 202
— — — седиментации 202
— — мол. вес 202
— семян клещевины, кристаллизация 201
— элементарный состав 191
Экстинкция, способ выражения 82
— удельная 421
Эксцельсин бразильского ореха, константа диффузии 202
— — — — седиментации 202
— — — мол. вес 202
— семян клещевины, кристаллизация 201
— элементарный состав 191

Электрометрическое титрование нуклеиновых кислот 83, 84
Электрофоретический анализ, применение для характеристики белков 192, 195, 199, 223, 244, 245, 247—251, 253, 255, 314, 315, 354, 355, 275, 377—379, 687—689, 737, 741, 748, 759, 766, 778, 781
Эритрокруорин 419
Эстрогены, место образования 571
— физиологическое действие 571, 572
Этаноламин этиолированных сеянцев пшеницы 262
Этиловый спирт, влияние на растворимость альбумина 321
Эуглобулин 708, 709
— и гемоцианин 461
— подвижность 689, 710

Я

Яд пчелиный 650
— — действие 650
— — инактивация цинком 671
Яды животных 646—650
— змеиные 647—649
— — антикоагулянты 674
— — аспидовых, патологическое действие 649, 669
— — гадюковых, патологическое действие 649
— — гемморагины 675
— — гремучниковых, патологическое действие 649
— — инактивация цинком 671
— — коагулянты 673
— — нейротоксины 667—669
— — содержание цинка 649
— — цитолизины 675
Янтарная кислота и инактивация сукциндегидразы 25

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 5

Р. Портер

Химическое строение и биологическая активность белков

1. Введение 7

2. Методы исследования 10
   А. Активность и общие структурные особенности 10
   Б. Сравнительное изучение структуры и активности 18
   В. Блокирование активных групп 21
   Г. Замещение определенных групп в белках и многообразие небелковых реагентов 27
   Д. Частичный гидролиз белков и поиски активных фрагментов. . . 32
   Е. Исследования механизма образования биологически активных белков 37
   Ж. Исследование природы биологической активности белка 41

3. Заключение 45
Литература 48

Н. Р. Маркхэм и *Дж. Смит*

Нуклеопротеиды и вирусы

I. Нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды

1. Введение 54
   А. Тетрануклеотидная гипотеза 57
   Б. Распределение двух типов нуклеиновых кислот 58
   В. Нуклеопротеиды 60

2. Химические свойства нуклеиновых кислот 61
   А. Состав нуклеиновых кислот 61
   Б. Выделение и деполимеризация нуклеотидов 64
   В. Методы анализа 65
   Г. Деградация нуклеиновых кислот в связи с их структурой . . . 71

3. Физические свойства нуклеиновых кислот 82

4. Нуклеопротеиды 86
А. Выделение нуклеопротеидов 88
Б. Природа нуклеопротеидов 97
В. Связь нуклеопротеидов со структурой клеточных ядер 101
Г. Биологическая функция нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов 105

II. Вирусы

1. Введение 112

2. Растительные вирусы 115
А. Общие методы очистки 115
Б. Вирус мозаики табака 117
В. Х-вирус картофеля 124
Г. Вирус карликовой кустистости томата 124
Д. Вирус желтой мозаики репы 127
Е. Вирус южной мозаики фасоли 131
Ж. Вирусы некроза табака 132
З. Вирус кольцеобразной пятнистости табака 135
И. Вирус мозаики люцерны 137
К. Вирус пятнистости конских бобов 137
Л. Другие растительные вирусы 138

3. Животные вирусы 139
А. Вирус вакцины 139
Б. Вирус гриппа 141
В. Вирус папилломы кролика 143
Г. Вирус энцефаломиелита лошади 144
Д. Полиэдровые и другие вирусы насекомых 145

4. Бактериофаги 146
А. Введение 146
Б. Изучение инфекционных частиц 149
В. Выделение и очистка бактериофагов 151
Г. Физические свойства 152
Д. Химический состав 156
Е. Размножение бактериофагов 159
Ж. Образование фага внутри бактериальной клетки 164
З. Генетика бактериофагов и размножение вирусов 167
И. Лизогенные бактерии 169
К. Плазмагены и вирусы 172

Литература 176

III. С. Брохульт и *Э. Сандегрен*

Белки семян

1. Введение 188

2. Экстрагирование 189

3. Характеристика белков семян 191
А. Химический анализ 191
Б. Физико-химические методы анализа 192

4. Примеры некоторых белков семян 193
А. Однодольные 195
Б. Двудольные 199

5. Белки семян в период созревания и прорастания 206
А. Созревание 206
Б. Хранение 208
В. Прорастание 208

6. Аминокислотный состав 209

Литература 211

IV. Ф. Стьюард и *Дж. Томпсон*

Белки и белковый обмен в растениях

1. Введение. Некоторые общие понятия 216
А. Общая экономия азота в организме растения 216
Б. Азотный обмен и дыхание 222
В. Современное развитие методов исследования 222

2. Белковый обмен. Исторический обзор 223
А. Классический период 224
Б. Новый период 225

3. Белки и белковый обмен в организме растения 228
А. Белковый и небелковый азот в растущих клетках и клетках, находящихся в покое 228
Б. Синтез белков во время роста путем клеточного деления и посредством увеличения размеров клеток 230
В. Синтез белков в листьях и его связь с развитием растения . . . 231

4. Аминокислотный состав белковой фракции в целом 232
А. Введение 232
Б. Данные некоторых анализов общего белка из растений разных семейств 234

В. Некоторые данные хроматографического анализа общей белковой фракции 236
Г. Соотношение между цистином и метионином в белках 239
Д. Результаты анализов общего белка растений различных отделов растительного мира 240
5. Белковые фракции листьев растений и растительных вирусов . . . 242
А. Белки листа 242
Б. Растительные вирусы как белки 250

6. Связь небелкового азота растений с белковым обменом 256
А. Классы соединений, образующих растворимую азотсодержащую фракцию 257
Б. История открытия растворимых соединений азота в растениях 259
В. Развитие метода распределительной хроматографии 259
Г. Значение вновь открытых соединений небелковой азотсодержащей фракции 261
Д. Соотношения между аспарагином и глутамином в белковом обмене 265
Е. Другие компоненты небелковой азотсодержащей фракции 270

7. Факторы, влияющие на белковую и растворимую фракции в растениях 271
А. Количественное отношение растворимого азота к белковому . . 271
Б. Связь между питанием и белковым обменом в листьях ячменя . . 274
В. Связь белкового обмена с другими процессами обмена веществ 275
Г. Синтез белков *in vivo* 280

8. Некоторые общие воздействия внешней среды и питания на белки и другие соединения азота 286
А. Влияние макроэлементов питания 286
Б. Влияние микроэлементов 289
В. Выводы 291
Литература 291

У. У. Юз

Белки плазмы крови и лимфы

1. Происхождение и общие свойства белков плазмы 301
А. Пределы свободной диффузии 301
Б. Описание крови, клеток крови и плазмы 301
В. Необходимые условия для циркуляторной функции 304
Г. Распределение белков в плазме, экстраваскулярной жидкости и клетках 306
Д. Обмен белков плазмы 309

2. Постоянство объема сосудистой системы 310

А. Физиология периферического кровообращения 310
Б. Проницаемость капилляров и функция почек 311
В. Осмотические свойства белков плазмы 313
Г. Сывороточный альбумин 314

3. Белки как переносчики метаболитов 336
А. Железосодержащий глобулин—трансферрин 336
Б. Компоненты плазмы, содержащие цинк и медь. Церулоплазмин 338
В. Липопротеиды 339

4. Защитные (противоинфекционные) функции; антитела 345
А. Определение антител 346
Б. Гетерогенность 348
В. Получение антител в чистом состоянии 352
Г. Физические и химические свойства 357

5. Компоненты свертывания крови 362
А. Фибриноген 363
Б. Протромбин 367
В. Плазминоген 369
6. Ферменты 370

7. Гормоны 370

8. Компоненты, функция которых не известна 371
А. Альбумин, содержащий углевод 372
Б. Серомукоид 372
В. Кислый гликопротеид 373
Г. Фетуин 375
Д. Электрофоретические компоненты; теневая диаграмма 377

9. Приложение: систематические методы фракционирования плазмы . . 379
А. Метод 6 384
Б. Метод 9 389
Литература 395

VI. Ф. Гауровитц и *Р. Хардин*

Дыхательные белки

1. Распространенность дыхательных белков 406

2. Гемоглобин 408
А. Приготовление и очистка гемоглобина и оксигемоглобина . . . 408
Б. Простетическая группа 410
В. Глобин 414
Г. Величина и форма молекул гемоглобина 418
Д. Спектры поглощения гемоглобина и его производных 421

Е. Соединение гемоглобина с кислородом 425
Ж. Электрохимические свойства гемоглобина 432
З. Карбоксигемоглобин (карбонилгемоглобин) 434
И. Другие производные гемоглобина, содержащие двухвалентное железо 437
К. Метгемоглобин и его производные 439
Л. Холеглобин, вердоглобины, или псевдогемоглобины 441
М. Специфичность гемоглобинов 442
Н. Каталитические свойства гемоглобина 447
О. Миоглобин (мышечный гемоглобин) 448
П. Количественное определение гемоглобина 451
Р. Взаимодействие между гемом и глобином 453
3. Хлорокруорин 459

4. Гемоцианин 460

5. Гемэритрин 464

6. Другие дыхательные белки 466
Литература 467

VII. В. Бойд

Белки в реакциях иммунитета

1. Иммунитет 477

2. Антигены 478
А. Условия антигенности 480
Б. Природа антигенных детерминантов 483
В. Число антигенных детерминантов, приходящихся на одну молекулу белка 496
Г. Специфичность нативных белков 498

3. Антитела 501
А. Множественность функций антител 502
Б. Химические свойства антител 508
В. Природа детерминантов антител 522
Г. Очистка антител 524
Д. Количественное определение антител 526
Е. Образование антител 526

4. Соединение антитело—антиген 531
А. Первая стадия: соединение 531
Б. Вторая стадия: преципитация, агглютинация, нейтрализация и т. п. 536

5. Комплемент и связывание комплемента 554
А. Связывание комплемента 556

Б Количественное определение комплемента 556
В. Теория связывания комплемента 557
Литература 559

VIII. Чоу Хао Ли

Белковые гормоны

1. Введение 569

2. Гормоны передней доли гипофиза 571
А. Гонадотропные гормоны 572
Б. Метаболические гормоны 578

3. Гонадотропины мочи и сыворотки 590
А. Гонадотропин хориальной ткани женщин 590
Б. Гонадотропный гормон сыворотки жеребой кобылы 593

4. Гормоны задней доли гипофиза 595
А. Биологическое определение 596
Б. Приготовление неочищенных экстрактов 597
В. Частичное разделение окситоцина и вазопрессина 597
Г. Выделение и свойства окситоцина 600
Д. Выделение и свойства вазопрессина 601
Е. Выделение белка с постоянной окситоцической, прессорной и антидиуретической активностями 603

5. Инсулин 605
А. Методы определения 606
Б. Выделение инсулина 606
В. Физико-химические свойства 607
Г. Химический состав 608
Д. Молекулярный вес 610
Е. Концевые группы 611
Ж. Фракции А и В окисленного инсулина 612
З. Различия в свойствах препаратов инсулина, полученных из желез животных различных видов 614
И. Группы, существенные для активности 616
К. Гипергликемический—гликогенолитический фактор (ГГФ, глюкаген) 617

6. Гормоны щитовидной железы 619
А. Методы определения гормона щитовидной железы 619
Б. Тиреоглобулин 620
В. Тироксин 622
Г. Иодированные белки, обладающие тиреоидной активностью . . 625
Дополнение 627
Литература 628

IX. В. Ван-Хайнинген

Токсичные белки

1. Введение 639
А. Факторы, влияющие на токсичность 641
Б. Иммунологические свойства 644

2. Распространение токсичных белков 646
А. Яды животных 646
Б. Фитотоксины 650
В. Бактериальные токсины 653

3. Свойства и механизм действия токсичных белков 655
А. Дифтерийный токсин 655
Б. Гемолизины 657
В. Нейротоксины 665
Г. Ингибиторы дегидразы 670
Д. Коагулянты 671
Е. Антикоагулянты 674
Ж. Цитолизины и геморрагины 674
З. Вещества, вызывающие шок 675
И. Фактор распространения 676
К. Полимолекулярные токсины 677
Литература 678

X. Т. Мак-Микин

Белки молока

1. Биологическое значение 686

2. Распределение белков в молоке. 687
А. Распределение белков в среднем смешанном молоке 687
Б. Изменения в распределении белков молока в течение цикла лактации 690

3. Разделение и свойства белков молока 692
А. Казеин 692
Б. Белки молочной сыворотки 707

4. Аминокислотный состав белков молока 722

5. Ферменты, содержащиеся в молоке 724

6. Антибактериальный фактор молока 728

7. Взаимосвязь белков молока с белками сыворотки крови 728
Литература 730

XI. Р. Уорнер

Белки яиц

1. Введение 735

2. Яичный белок 736
А. Яичный альбумин 742
Б. Кональбумин 754
В. Лизоцим 760
Г. Овомукоид 764
Д. Авидин 767
Е. Овомуцин 769
Ж. Глобулины 771
З. Ферменты 772

3. Яичный желток 772
А. Липовителлин и вителлин 773
Б. Липовителленин и вителленин 776
В. Фосвитин 777
Г. Ливетин 778
Д. Ферменты и другие компоненты, содержащиеся в незначительных количествах 779
Е. Белковый состав желтка 780

4. Видовые изменения в белковом составе яйца 781
Литература 783
Дополнительная литература редактора 788
Именной указатель 792
Предметный указатель 804

БЕЛКИ том III

Редактор *З. Ф. ХОДЕЦКАЯ*

Переплет художника *Н. М. Лобанова*

Технические редакторы *В. У. Жукова* и *Н. А. Иовлева*

Сдано в производство 10/I 1958 г.
Подписано к печати 20/V 1958 г.
Бумага 60×92¹/₁₆. 26,5 бум. л. 53,0 печ. л.
Уч.-изд. л. 57,6. Изд. № 3/3398.
Цена 42 р. 30 к. Зак. 19.

ИЗДАТЕЛЬСТВО
ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ,
Москва, Ново-Алексеевская, 52.

16-я типография Московского городского
Совнархоза, Москва,
Трехпрудный пер., 9.

КНИГИ ПО ХИМИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИНОСТРАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

в 1958 г. выпускает книги:

А. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Дж. Риддик, Э. Тупс. ОРГАНИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ, перевод с английского.

Книга представляет собой перевод весьма ценного справочного руководства, в котором собраны физические и химические константы, а также способы очистки и сушки практически всех встречающихся органических растворителей.

Содержит подробную классификацию растворителей; эмпирические и теоретические уравнения, выражающие температурную зависимость плотности, показателя преломления, поверхностного натяжения, вязкости, теплоты испарения, а также данные по критическим температурам и критическим давлениям, температурам замерзания, электрическим и оптическим свойствам; таблицы физических констант и отдельные таблицы температур кипения и замерзания, диэлектрических постоянных и дипольных моментов для 254 растворителей. Кроме того, в книге приведены критерии чистоты, методы осушки и определения влажности растворителей и собраны наиболее надежные из описанных в литературе методов очистки растворителей; снабжена обширной библиографией, состоящей из ссылок более чем на 2000 книг и журнальных статей.

Предназначена для широкого круга химиков, исследователей и инженеров, а также для преподавателей, аспирантов и студентов высшей школы в качестве справочного руководства по органическим растворителям.

Хюккель В., ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, т. II, перевод с немецкого.

Второй том известного двухтомного труда видного немецкого ученого Хюккеля представляет собой обстоятельную монографию по теории органической химии.

Во втором томе подробно рассмотрена зависимость физических свойств и реакционной способности органических соединений от химического строения. В книге изложены вопросы теоретического рассмотрения физических свойств органических соединений; рассмотрены электрические свойства молекул и поведение органических соединений в переменном электромагнитном поле, связь между сцеплением и строением молекул, упорядоченные состояния органических веществ и коллоидно-химические проблемы в органической химии; кроме того, в книге изложены теории химической связи и теория скоростей реакций, а также рассмотрена зависимость констант скорости реакции от строения органических соединений и др.

Книга предназначена для широкого круга химиков-органиков, преподавателей высшей школы, аспирантов и студентов.

Издательство просит читателей делать предварительные заявки на книги по химии через местные магазины Книготорга, что позволит выпускать книги в достаточном количестве и удовлетворять все запросы.

Вышедшие из печати книги можно приобрести в магазинах Книготорга, а также выписать через отдел «Книга—почтой» магазинов Москниготорга № 95 (Москва, Б-150, ул. Подбельского, д. 7/20) и № 8 (Москва, К-9, ул. Петровка, д. 15).