



УДК 547.962.02+547.466.04

**ПРОСТОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ
ИОДАМИНОКИСЛОТ В ИОДИРОВАННЫХ БЕЛКАХ***Гуссаковский Е. Е., Бабаев Т. А., Туракулов Я. Х.**Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

Предлагается метод количественного определения содержания моноидтирозина, дииодтирозина и тироксина в иодированных белках по спектру их коэффициента молярной экстинкции. Для определения количества иодаминокислот с ошибкой не более 1 моль на моль белка необходимо измерение коэффициента молярной экстинкции с ошибкой не более $4,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. При измерении спектров поглощения необходимо учитывать вклад светорассеяния. Иодаминокислотный состав intactного и дополнительно иодированного бычьего тиреоглобулина, определенный предлагаемым методом, соответствует литературным данным.

В настоящее время для измерения количественного содержания моно- и дииодтирозинов и тироксина в белках используются метод спектрофотометрического титрования [1, 2] и хроматографический метод [3, 4]. Недостатками этих методов является неопределенность, связанная с отсутствием учета вклада светорассеяния в измеряемое поглощение в методе спектрофотометрического титрования и с возможным деиодированием белка при его гидролизе в хроматографическом методе, а также их относительная трудоемкость. Кроме того, в обоих методах трудно поддается определению ошибка измерения. В то же время определяемые производные имеют интенсивные полосы поглощения в области длин волн выше 300 нм как в растворе, так и в иодированных белках. Поэтому существует принципиальная возможность количественного нахождения этих иодаминокислот по спектру коэффициента молярной экстинкции белка. Настоящая работа посвящена конкретной реализации этой возможности.

Поскольку коэффициент молярной экстинкции ϵ_0 при каждой длине волны λ является суммой

$$\epsilon_0^\lambda = \sum_i \epsilon_i^\lambda C_i \quad (1)$$

(ϵ_i^λ — коэффициент молярной экстинкции i -й иодаминокислоты, C_i — количество молей этой иодаминокислоты на 1 моль белка), то, очевидно, зная величины ϵ_i^λ , измеряя ϵ_0^λ и решая систему линейных уравнений (1), можно находить значения C_i .

Спектры поглощения тирозина, моно-, дииодтирозинов и тироксина существенным образом зависят от pH раствора. При депротонировании их

Сокращения: Туг(I) — 3-моноидтирозин, Туг(I₂) — 3,5-дииодтирозин, Тхх — 3, 5, 3', 5'-тетраидтиронин (тироксин).

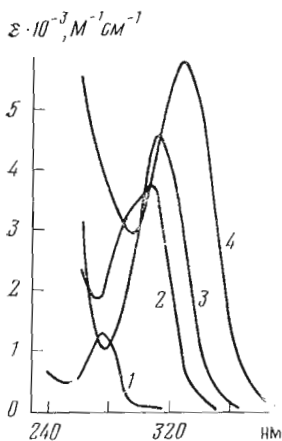


Рис. 1

Рис. 1. Спектры коэффициентов молярной экстинкции тирозина (1), 3-моноидотирозина (2), 3,5-диодотирозина (3) и тироксина (4) в 8 М мочеине при pH 9,2 (буфер — 0,1 М трис-HCl)

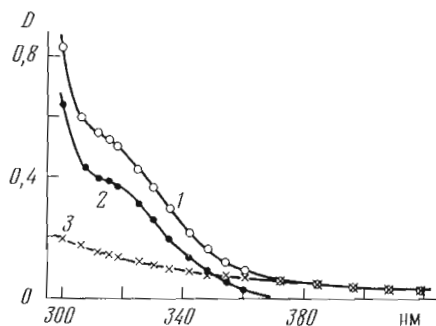


Рис. 2

Рис. 2. Измеренный (1) и истинный (2) спектр поглощения раствора бычьего тиреоглобулина (c_0 6,88 μ М), а также спектр «кажущейся» оптической плотности светорассеяния (3). Условия см. подпись к рис. 1

гидроксидов наблюдаются сильные спектральные сдвиги в длинноволновую область и увеличение коэффициентов молярной экстинкции в максимуме [5–8]. Принимая pK диссоциации гидроксидов равными 10,0 (Тур), 8,2 (Тур (1)), 6,4 (Тур (1₂)) и 6,7 (тироксин) [1], получаем, что при pH 9,1–9,3 гидроксильные группы иодаминокислот должны быть депротонированы, а гидроксил тирозина — протонированным. В области длин волн выше 315 нм в 8 М мочеине при pH 9,2 существенным поглощением обладают лишь иодпроизводные тирозина (рис. 1). Полученные спектры в целом соответствуют ранее опубликованным [6, 7]. Наличие плеча в спектре поглощения моноидотирозина в области 290–300 нм и слабая полоса в спектре поглощения тирозина в области 295–310 нм указывают на то, что моноидотирозинное не полностью находится в депротонированной форме, а тирозин — не полностью в протонированной.

Поскольку ϵ_0^λ являются экспериментально наблюдаемыми величинами, измеряемыми с ошибками, которые при операциях сложения, вычитания и умножения складываются, для решения системы (1) с наименьшей ошибкой необходимо пользоваться методом Гаусса [9], а сама система (1) должна иметь минимальную размерность, что обеспечивает минимальное количество арифметических действий. В области длин волн длиннее 315 нм система линейных уравнений имеет размерность 3:

$$\begin{cases} \epsilon_0^{315} = 3510 C_{\text{Тур}(I)} + 4450 C_{\text{Тур}(I_2)} + 4670 C_{\text{Тхх}} \\ \epsilon_0^{325} = 1500 C_{\text{Тур}(I)} + 3840 C_{\text{Тур}(I_2)} + 5600 C_{\text{Тхх}} \\ \epsilon_0^{335} = 550 C_{\text{Тур}(I)} + 1760 C_{\text{Тур}(I_2)} + 5550 C_{\text{Тхх}} \end{cases} \quad (2)$$

(где коэффициентами при C_i служат коэффициенты молярной экстинкции иодаминокислот при выбранных длинах волн), поскольку в этой области другие аминокислоты (триптофан, фенилаланин, гистидин, цистеин, цистин) свет не поглощают [5]. Решая систему (2) методом Гаусса, нетрудно получить рекуррентное правило:

$$\begin{aligned} C_{\text{Тур}(I)} &= 0,875 \cdot \epsilon_0^{325} - 0,271 \cdot \epsilon_0^{315} - 0,654 \epsilon_0^{335} \\ C_{\text{Тур}(I)} &= 0,328 \cdot \epsilon_0^{315} - 0,276 \cdot \epsilon_0^{335} - 0,974 C_{\text{Тур}(I_2)}, \\ C_{\text{Тхх}} &= 0,178 \cdot \epsilon_0^{325} - 0,269 \cdot C_{\text{Тур}(I)} - 0,686 C_{\text{Тур}(I_2)} \end{aligned} \quad (3)$$

позволяющее быстро вычислять значения $C_{\text{Тур}(I_2)}$, $C_{\text{Тур}(I)}$ и $C_{\text{Тх}}$ по молярному поглощению белка $\epsilon_0 \cdot 10^{-3}$ при 315, 325 и 335 нм.

Очевидно, относительная ошибка при определении величин C_i с помощью правила (3) равна относительной ошибке измерения ϵ_0^λ для раствора белка, а абсолютная ошибка ΔC — сумме абсолютных ошибок $\Delta \epsilon_0$ измерения ϵ_0 с коэффициентами, приведенными в правиле (3). Нетрудно видеть, что $\Delta C_{\text{Тур}(I_2)} = 1,800 \Delta \epsilon_0$, $\Delta C_{\text{Тур}(I)} = 2,357 \Delta \epsilon_0$ и $\Delta C_{\text{Тх}} = 2,047 \Delta \epsilon_0$. Наибольшая абсолютная ошибка наблюдается при измерении содержания моноидтирозина. Поскольку $\Delta \epsilon_0 = \Delta D \cdot c_0^{-1}$, где ΔD — абсолютная ошибка измерения поглощения при всех длинах волн, определяемая чувствительностью спектрофотометра, а c_0 — концентрация белка, то для того, чтобы $\Delta C_{\text{Тур}(I)}$ равнялась 1 моль на 1 моль белка, необходимо, чтобы $\Delta \epsilon_0 = 0,42 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, что соответствует концентрации белка $c_0 = 2,36 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ при $\Delta D = 0,001$.

При измерении ϵ_0^λ кроме поддержания величины pH 9,1—9,3 следует соблюдать два условия. Во-первых, необходимо, чтобы все подаминокислотные остатки в белке имели депротонированный гидроксил. По-видимому, присутствие 8 М мочевины в растворе обеспечивает это условие, поскольку при таких концентрациях мочевины достаточно полно «разворачивает» белковую молекулу [10]. Во-вторых, следует учитывать вклад кажущейся оптической плотности светорассеяния в измеренный спектр поглощения, которая может иметь существенную величину [11].

Тиреоглобулин, являясь природноидированным белком, имеет в своем составе как подтирозиновые, так подтирониновые остатки [12]. На рис. 2 и в таблице приведены спектр поглощения и коэффициенты молярной экстинкции растворов интактного и дополнительно иодированного бычьего тиреоглобулина в 8 М мочевины при pH 9,2. Несмотря на умеренную концентрацию (4,61 мг/мл для интактного и 2,82 мг/мл для иодированного белка), вклад светорассеяния в измеренный спектр поглощения весьма значителен и составляет 15—75% от величины измеренного поглощения при 300—360 нм. Наблюдается отчетливая полоса поглощения подаминокислот при длинах волн выше 310 нм. Приведенный в таблице подаминокислотный состав интактного и дополнительно иодированного тиреоглобулина, полученный по правилу (3), вполне соответствует известному из литературы, учитывая, что содержание вода в интактном тиреоглобулине варьирует в широких пределах и зависит от физиологического состояния щитовидной железы, условий и режима питания организма [12]. Как и следует ожидать, дополнительное иодирование ведет к повышению количества подаминокислотных остатков также в соответствии с литературными данными [12].

Таким образом, предлагаемый спектрофотометрический метод позволяет быстро и с легко измеряемой точностью определять количество подтирозиновых и тироксिनных остатков в иодированных белках.

Экспериментальная часть

В работе использовали коммерческие препараты тирозина («Союзреактив»), 3,5-дидитрозина (Chemapol, СССР) и тироксина (Reanal, Венгрия). 3-Моноидтирозин получали иодированием тирозина в 0,1 н. КОН раствором 0,48 М KI + 0,04 М I₂. Контроль производили по спектру поглощения согласно данным Херриотта [8]. Бычий тиреоглобулин был получен гель-фильтрацией солевого экстракта щитовидной железы через колонку с сефадексом G-200 [12, 13] и любезно предоставлен А. А. Налбандян (Институт биохимии АН УзССР). Препараты тиреоглобулина были гомогенны при аналитическом ультрацентрифугировании. Используемая в работе мочевины («Союзреактив») была перекристаллизована из 70%-ного этанола с фильтрованием.

Иодирование раствора тиреоглобулина в фосфатном буфере, pH 8,1, производили по методу Эдельхоха [1] раствором KI + I₂ при 20°С в тече-

**Коэффициенты молярной экстинкции ($10^3 \cdot M^{-1} \text{ см}^{-1}$) и
иодаминокислотный состав (моль/моль белка) бычьего тиреоглобулина**

Характеристика	Тиреоглобулин	
	интактный	подоированный
$\epsilon_0 \cdot 10^{-3}$ при 315 м 325 нм 335 нм	55,03±0,17	104,45±0,28
	45,16±0,17	79,45±0,28
	27,83±0,17	41,88±0,28
Содержание Туг(I)	4,13±0,40	9,24±0,66
	5,4 [15]	9,25 [12]
	5,1 [16]	
	5,47±0,05 [4]	
	7,3±0,8 [17]	
Содержание Туг(I ₂)	6,40±0,30	13,82±0,50
	9,4 [15]	10,4 [12]
	3,6 [16]	
	4,93±0,05 [4]	
	11,1±1,3 [17]	
Содержание Тнх	2,54±0,35	2,18±0,57
	2,0 [15]	3,67 [12]
	1,8 [16]	
	2,35±0,03 [4]	
	1,6±0,6 [17]	

ние 30 мин при постоянном перемешивании. Уровень добавленного иода составил 200 моль I₂ на 1 моль белка. Избыток иода удаляли диализом против дистиллированной воды в течение 23–24 ч. Концентрацию белка измеряли по методу Лоури [14]. При определении коэффициента молярной экстинкции раствора тиреоглобулина использовали значение молекулярного веса $6,7 \cdot 10^5$ [12].

Спектры поглощения растворов тиреоглобулина и иодаминокислот измеряли на регистрирующем спектрофотометре EPS-3T (Hitachi, Япония). Для увеличения точности измерения малых значений оптической плотности измеряли спектр пропускания $T(\lambda)$ с последующим пересчетом в $D(\lambda)$, применяя четырехзначную таблицу. Ошибка в измерении пропускания составляла $\Delta T=0,002$, что соответствует ошибке $\Delta D=0,0012-0,0014$. При определении поглощения растворов тиреоглобулина учитывали вклад рассеянного света [11]. При этом экстраполяцию производили из области длин волн 370–420 нм, применяя метод наименьших квадратов для линейной функции $\lg D = \lg a - n \lg \lambda$, где a и n – параметры закона Релея $D = a\lambda^{-n}$. В работе использовали кюветы из плавленого кварца с длиной оптического пути 10 мм.

Авторы благодарны А. А. Налбандян за предоставление препаратов тиреоглобулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Edelhoch H. (1962) J. Biol. Chem., 237, 2778–2787.
2. Covelly H., Zyl van A., Edelhoch H. (1971) Anal. Biochem., 42, 82–90.
3. Rolland M., Aquaron R., Lissitzky S. (1970) Anal. Biochem., 33, 307–317.
4. Sorimachi K., Ui N. (1974) J. Biochem., 76, 39–45.
5. Окулов В. И. (1971) в кн.: Успехи биологической химии, т. 42, с. 28–61, «Наука», М.
6. Gemmill C. L. (1955) Arch. Biochem. and Biophys., 54, 359–365.
7. Gemmill C. L. (1956) Arch. Biochem. and Biophys., 65, 177–183.
8. Herriott R. M. (1947) J. Gen. Physiol., 31, 19–24.
9. Корн Г., Корн Т. (1968) в кн.: Справочник по математике для научных работников и инженеров, с. 576, «Мир», М.
10. Жюли М. (1968) в кн.: Физическая химия денатурация белков, с. 38–41, «Мир», М.
11. Winder A. F., Gent W. L. G. (1971) Biopolymers, 10, 1243–1251.

12. Туракулов Я. Х., Бабаев Т. А., Саатов Т. (1974) в кн.: Иодпротеины щитовидной железы, с. 6-42, «ФАН», Ташкент.
13. Бабаев Т. А., Аванесова А. А., Гуссаковский Е. Е., Усманов Т. (1972) Биохимия, 37, 1306-1309.
14. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Т. А. (1975) в кн.: Практикум по биохимии, с. 76-77, «Просвещение», М.
15. Саатов Т. (1965) Докл. АН УзССР, № 12, 38-41.
16. Sorimachi K., Ui N. (1974) Biochim. et biophys. acta, 342, 30-40.
17. Etling N., Gehin F. (1977) Biol. Neonate, 31, 294-300.

Поступила в редакцию
3.VII.1978

SIMPLE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF IODOAMINO ACIDS IN IODINATED PROTEINS

GUSSAKOVSKY E. E., BABAEV T. A., TURAKULOV Ya. Kh.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

A method is proposed for the quantitative determination of monoiodotyrosine, diiodotyrosine and thyroxine in iodinated proteins by means of their molar extinction coefficients. In order to determine the number of iodoamino acid residues with accuracy about 1 mole per mole of protein, the error in measuring the molar extinction coefficient should not exceed $4,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. At the measurement of absorption spectra it is necessary to take into account the light scattering. The iodoamino acid content of intact and iodinated bovine thyroglobulin determined by the proposed method corresponds to the literature data.