

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КОЛЛАГЕНА МЕТОДАМИ ИНФРА-КРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

A STUDY OF COLLAGEN STRUCTURAL STABILITY BY MEANS OF INFRA-RED SPECTROSCOPY AND ELECTRON MICROSCOPY

Изменения в тонкой структуре белка можно установить методом инфракрасной спектроскопии и электронной микроскопии. Полная интерпретация полученных инфракрасных спектров молекул большинства белков вообще и коллагена, в частности, значительно усложнена отсутствием исчерпывающих данных о последовательности чередования аминокислотных остатков в первичной структуре коллагена. Колебательные эффекты нескольких групп часто падают на один и тот же интервал или приводят к некоторому смещению спектров поглощения, усилению или снижению интенсивности их в данном диапазоне волн. Однако при рассмотрении сравнительно небольшого количества полос можно получить ценные сведения о структуре молекулы и изменениях в ней.

В настоящее время имеются литературные данные по инфракрасному спектру нативного и кислоторастворимого коллагена /3, 4, 5, 6/. Нами проведены сравнительные исследования инфракрасного спектра необработанного и обработанного коллагена. Данные исследования в совокупности с электронной микроскопией и рентгеноструктурным анализом /2/ позволят произвести качественную оценку изменений третичной структуры коллагена, обусловленных кислотной обработкой исходного сырья.

Инфракрасный спектр коллагена изучали с помощью спектрофотометра УР-10 в диапазоне волн от 400 до 700 см^{-1} (квч), от 700 до 2000 см^{-1} (NaCl) и от 2000 до 4000 см^{-1} (LiF). При подготовке проб к исследованию воздушно-сухие образцы замораживали в жидком азоте и измельчали на шаровой мельнице в течение 5-10 секунд. Затем перед снятием спектров прессовали в виде таблеток с галогенидами щелочных металлов. Результаты исследований необработанного и технологически обработанного коллагена представлены на рис. 1 и 2.

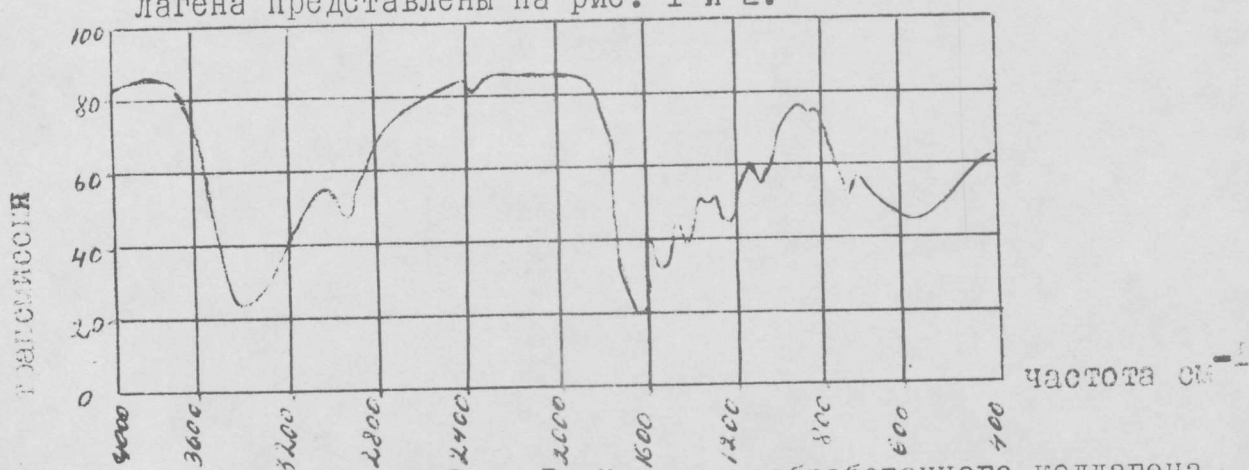


Рис. 1. Спектр необработанного коллагена

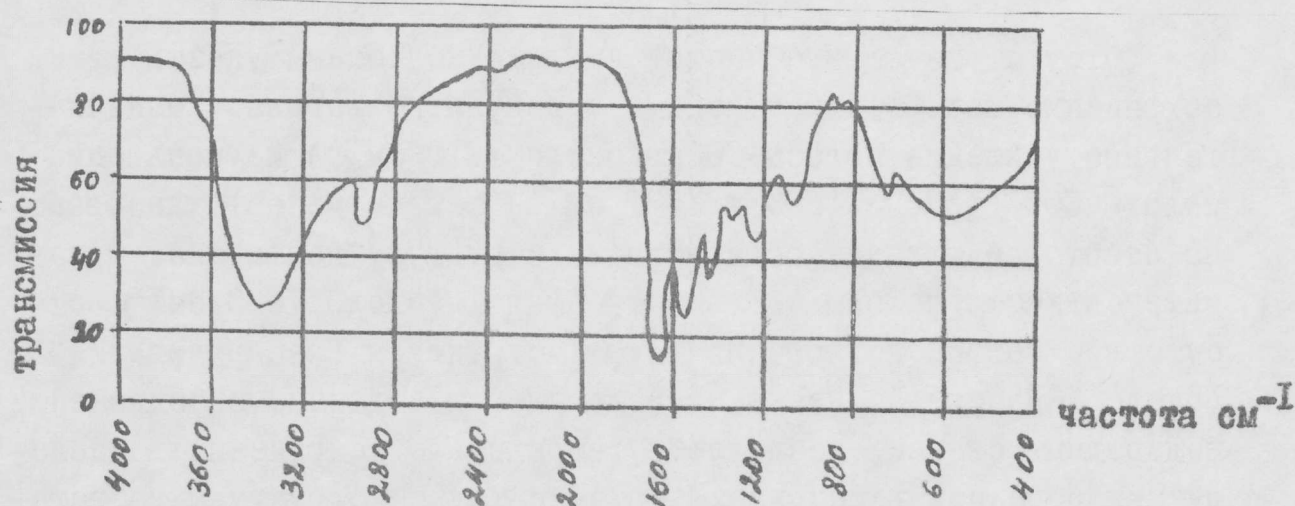


Рис. 2. Спектр обработанного коллагена

Полученные спектры оценивали с учетом литературных данных [4, 6]. Особенностью поглощения аминокислот и пептидов в твердом состоянии является наличие интенсивных полос поглощения в области $3000\text{--}3500\text{ см}^{-1}$, обусловленных валентными колебаниями NH_2^+ или NH_3^+ и в области 1600 и 1400 см^{-1} , соответствующим двум основным колебаниям карбоксильной группы COO^- . Перечисленные колебания являются достаточно характеристическими и практически не зависят от природы боковых цепей.

Характерным признаком амидных колебаний является сдвиг частот вследствие разрыва водородной связи $\text{NH}\dots\text{O}=\text{C}$. Валентное колебание Н в пептидной группе без водородной связи будет иметь более высокую частоту (около 3450 см^{-1}), чем с водородной связью (около 3330 см^{-1}). Полоса Амид I, обусловленная колебанием, при котором сильно изменяется длина связи $\text{C}=\text{O}$, без водородной связи будет иметь соответственно более высокую частоту (на $40\text{--}50\text{ см}^{-1}$). Частоты деформационных колебаний Амид II и Амид III сдвигаются при разрыве водородной связи в сторону низких частот. При наличии водородной связи полосы поглощения шире и интенсивнее.

Сравнительное изучение полос поглощения необработанного и обработанного коллагена показало, что их валентные колебания Н в пептидной группе полосы Амид I и Амид II инфракрасного спектра практически идентичны.

Отсутствие сдвига частот амидных колебаний указывает на сохранение водородных связей в молекуле коллагена. Незначительное усиление полосы COOH (около 1710 см^{-1}) и уменьшение полосы COO^- (около 1560 и 1407 см^{-1}) тем не менее указывает на некоторое влияние обработки на структуру коллагена. Однако интенсивность полосы поглощения Амид I (около 1650 см^{-1}), отсутствие полосы поглощения Амид I структуры "раскручивания" (около 1635 см^{-1}), как и приведенные выше данные о сохранении водородных связей, позволяют утверждать о сохранении в исследуемых образцах в основных чертах нативной структуры коллагена.

Данные выводы о значительной структурной стабильности коллагена нами были подтверждены при непосредственном наблюдении макроструктуры необработанного и технологически обработанного коллагена. Исследования проводили на растровом электронном микроскопе Стереоскан фирмы "Кембридж Сайентифик Инструмент, Лтд.". Специфической особенностью электронной микроскопии является большая вероятность возникновения артефактов вследствие фиксации, высушивания и контрастирования объекта. В растровом электронном микроскопе можно исследовать образцы, не разрушая их, без приготовления реплик.

Исследования проводили следующим образом. На держателе микроскопа монтировали изучаемые образцы диаметром до 12 мм и толщиной до 5 мм . Значительная глубина фокуса прибора позволила получить объемные картины объекта (рис. 3, 4, 5).

Изучение микрофотографий исходного сырья (рис. 3, 4) позволило отметить разнообразную степень организации, упаковки макроструктуры коллагена от субфибрилл до волокон и их пучков. Особый интерес представляет полученная на растровом микроскопе микрофотография обработанного сырья (рис. 5). Различается шероховатая, складчатая поверхность волокна, характерная для макромолекулярной упаковки структуры коллагена.

Исследования инфракрасного спектра и электронно-микроскопические исследования на растровом микроскопе необработанного и технологически обработанного коллагенсодержащего сырья позволили отметить значительную структурную стабильность коллагена.

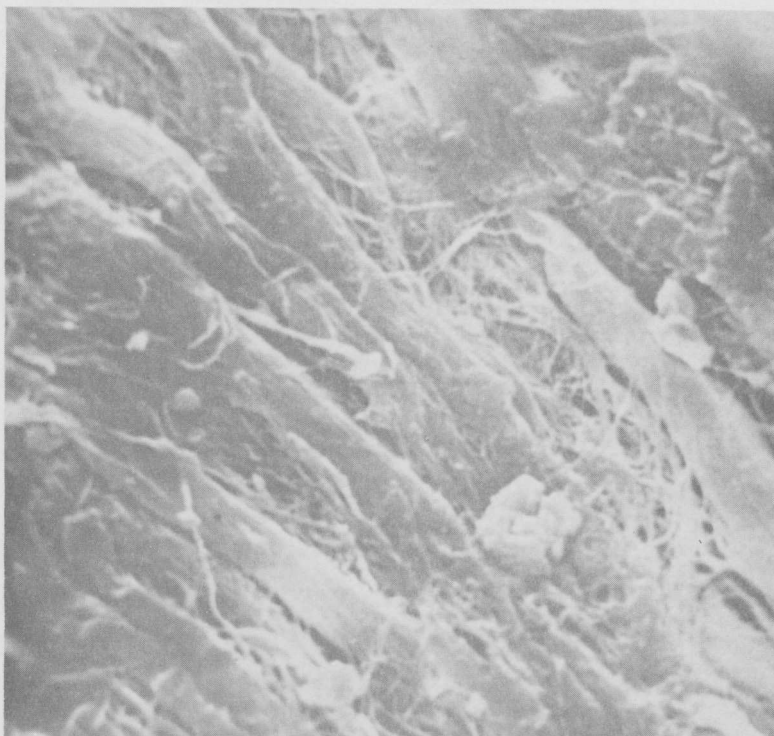


Рис. 3. Микрофотография необработанного коллагена
(увеличение $\times 2000$)



Рис. 4. Микрофотография необработанного коллагена
(увеличение $\times 5000$)



Рис. 5. Микрофотография обработанного коллагена
(увеличение $\times 2000$)

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Б е л л а м и Л. Инфракрасные спектры молекул. М., 1957.
2. К а с п а р ь я н ц С.А., Б а л о д Л.Р. XVI Европ. конгр. работн. НИИ мясн. пром-сти, Болгария, 1970.
3. Ч и р г а д з е Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. М., 1965.
4. A m b r o s e E.I., E l i o t t A. Proc.Roy.Soc.London, Sev., A208, 75, 1951.
5. B e e r M., S u t h e r l a n d G., T a n n e r K.N., W o o d D.L. Proc.Roy.Soc.London, A249, 147, 1959.
6. S.Communications. Biochem.Biophys.Acta, 154, 408-410, 1968.

LIST OF FIGURES

FIG.1. Spectrum of non-treated collagen

трансмиссия - transmission

частота cm^{-1} - frequency, cm^{-1}

FIG.2. Spectrum of treated collagen

трансмиссия - transmission

частота cm^{-1} - frequency, cm^{-1}

FIG.3. Microphotogram of non-treated collagen

(x 2000)

FIG.4. Microphotogram of non-treated collagen

(x 5000)

FIG.5. Microphotogram of treated collagen

(x 2000)