

И. А. СМОРОДИНЦЕВ и А. М. ФЕЛЬДТ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ТИРЕОГЛОБУЛИНА

(Представлено академиком А. А. Рихтером 27 IV 1937)

В предшествующем сообщении (1) мы установили, что нативный тиреоглобулин не осаждается уксусной кислотой, а сернокислым аммонием высаливается вместе с нуклеопротеидом. Желая иметь более чистый препарат тиреоглобулина для определения его изоэлектрической точки, мы освободили плазму щитовидной железы (1) крупного рогатого скота от нуклеопротеида осаждением уксусной кислотой и постарались установить более точно границы высаливания тиреоглобулина. Ряд опытов нам показал, что при 35% насыщения сернокислым аммонием осадка еще нет. Осадок появляется впервые при 37% насыщения и осаждение заканчивается при 52%, в этих границах высаливается весь тиреоглобулин и при дальнейшем добавлении сернокислоаго аммония никакого осадка не получается. Наши данные совпадают с результатами опытов Гейдельбергера и Пальмера (2), которые имели дело с чистым тиреоглобулином, но отличаются от данных Ostwald'a (3); последний установил более широкую зону осаждения, между 25—44% насыщения сернокислым аммонием, потому что предварительно не удалял нуклеопротеида.

Убедившись таким образом в однородности белка, содержащегося в очищенной плазме щитовидной железы, мы провели определение изоэлектрической точки тиреоглобулина четырьмя методами по 1) катафорезу, 2) вязкости, 3) осаждению спиртом, 4) установлению зависимости температуры коагуляции от pH среды. Опыты были повторены с раствором наиболее чистого препарата тиреоглобулина № 7 (1).

Таблица 1
Перенос тиреоглобулина
в электрическом поле

pH	Направление движения
6.2	К аноду
5.4	» »
5.2	» »
5.0	» »
4.8	» »
4.5	Переноса нет
4.2	К катоду

Таблица 2
 Определение изоэлектрической точки тиреоглобулина по изменению вязкости

рН	Относительная вязкость
3.4	1.2658
3.9	1.1919
4.2	1.1014
4.5	1.0535
6.0	1.0885
7.0	1.1070
7.8	1.1882

К а т а ф о р е з. Наблюдения над переносом тиреоглобулина в электрическом поле проводились по макрометоду Михаэлиса. Раствор белка смешивался с равным объемом *m*/30 фосфатного буфера и в качестве боковой жидкости применялась смесь с тем же рН. Напряжение тока 120 вольт. Опыт продолжался 1—2 часа. Граница между испытуемым раствором и боковой жидкостью была отчетливо видна. Скорость переноса достигала 2—8 мм в час и менялась в зависимости от рН, возрастающей по мере удаления от изоточки. Перенос белка контролировался при помощи биуретовой реакции на стороне переноса. Опыты переноса тиреоглобулина в *m*/60 ацетатном буфере качественно дали тот же результат. Один из типичных повторных опытов приведен в табл. 1.

В я з к о с т ь. Определения вязкости были проведены с 0.668% раствором препарата тиреоглобулина № 7 в вискозиметре Оствальда при 25°; рН устанавливался при помощи HCl. В табл. 2 взят пример из ряда аналогичных определений.

О с а ж д е н и е а л к о г о л е м. Раствор тиреоглобулина в ацетатном буфере при различных рН смешивался с определенным количеством алкоголя, причем максимум осаждения всегда наблюдался при рН=4.5. Минимум вязкости соответствует изоэлектрической точке тиреоглобулина при рН=4.5.

Т е м п е р а т у р а к о а г у л я ц и и. Раствор тиреоглобулина, свободного от нуклеопротеида (препарат № 7), или плазма щитовидной железы, соответственным образом обработанная (1), смешивалась с равным объемом *m*/30 фосфатного буфера, и рН смеси определялся электрометрически. Пробирка со смесью погружалась в большой стакан с водой, заранее подогретой на 2—3° ниже ожидаемой температуры коагуляции; последующее нагревание производилось быстро в течение 2—3 мин. при помешивании раствора в пробирке погруженным в нее термометром. Нижней границей свертывания мы называем температуру, при которой только что появляется сильная опалесценция; появление слабой опалесценции обычно замечается на 3—4° раньше. Верхней границей свертывания обозначен тот момент, когда коагуляция закончилась, образовались хлопья и жидкость над ними стала прозрачной. В табл. 3 дан типичный пример из ряда подобных наблюдений. Ионизация тиреоглобулина сообщает устойчивость его растворам в кислую сторону от изоточки быстрее, чем в щелочную; при изоточке ионизация минимальна, благодаря чему белок выпадает из раствора при самой низкой температуре $t=38^{\circ}$; при рН=3.7 и 6.2 устойчивость растворов тиреоглобулина настолько велика, что они не коагу-

Таблица 3
Зависимость температуры свертывания тиреоглобулина от рН среды

рН	Нижняя граница свертывания	Верхняя граница свертывания
6.2	Не свертывается	
5.7	100°	—
5.4	55°	72°
5.1	50°	64°
4.8	40°	58°
4.5	38°	55°
4.2	90°	100°
3.7	Не свертывается	

лируют и при температуре кипения. Минимум устойчивости раствора тиреоглобулина оказался одинаковым как на нижней, так и на верхней границе коагуляции.

Таким образом все четыре метода—прямой путем катафореза и косвенные по минимальной устойчивости растворов по отношению к коагулирующим агентам и по изменению вязкости—согласно дали одну и ту же величину рН для изоточки тиреоглобулина, равную 4.5.

Заслуживает быть отмеченным факт, что выделенный нами препарат тиреоглобулина имеет ту же изоэлектрическую точку, как и тиреоглобулин, находящийся в плазме щитовидной железы. Отсюда мы вправе заключить, что избранный нами способ выделения тиреоглобулина не вызывает денатурации этого белка. С другой стороны, мы убедились, что в плазме щитовидных желез крупного рогатого скота тиреоглобулин действительно является преобладающим белком.

В ы в о д ы

1. Границы высаливания тиреоглобулина лежат в тесных пределах 37—52% насыщения сернокислым аммонием.

2. Определение изоэлектрической точки растворов тиреоглобулина, произведенное различными методами—катафорез, вязкость, устойчивость по отношению к коагулирующим агентам,—дало одну и ту же величину рН=4.5.

3. Изоэлектрическая точка тиреоглобулина в плазме щитовидных желез, освобожденных от нуклеопротеида, и в растворах выделенного белка одна и та же.

4. Избранный нами метод выделения тиреоглобулина не сопровождается денатурацией белка.

Кафедра биохимии Химико-технического
института мясной промышленности.
Москва.

Поступило
27 IV 1937.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ И. А. Смородинцев и А. М. Фельдт, ДАН, XIV, 6, 365 (1937). ² M. Heidelberg u. Palmer, Journ. biol. Chem., 101, 433 (1933). ³ A. Ostwald, ZS. physiol. Chem., 27, 14 (1899).