

БИОХИМИЯ

И. А. СМОРОДИНЦЕВ и А. М. ФЕЛЬДТ
КРИТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ТИРЕО-
ГЛОБУЛИНА

(Представлено академиком А. А. Рихтером 31 XII 1936)

По литературным данным, в состав щитовидной железы входят главным образом два белка, тиреоглобулин и нуклеопроteid, причем первый в значительно большем количестве. Важнейшие методы выделения тиреоглобулина можно сгруппировать в четыре рубрики*: 1) высаливание при насыщении сернокислым аммонием (1); 2) осаждение уксусной кислотой (2); 3) осаждение спиртом (3); 4) высаливание сернокислым аммонием из филтратата после предварительного осаждения уксусной кислотой (4).

Мы решили провести сравнительное изучение этих методов на одном и том же материале и оценить содержание тиреоглобулина в получаемых препаратах по количеству иода (5), а содержание нуклеопротеида по количеству фосфора (6).

Приготовление препарата тиреоглобулина № 1

1 кг щитовидных желез, взятых от только что убитых баранов, был освобожден от жира и соединительной ткани, промыт ледяной водой от крови, измельчен в мясорубке и масса разделена на две порции А и В.

Порция А в течение двух суток извлекалась 2 объемами физиологического раствора хлористого натрия, при двукратной смене растворителя. Соединенные вытяжки были смешаны с равным объемом насыщенного $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, осадок растворен в воде и раствор осажден 4 объемами свежеперегнанного ацетона при -5° . Осадок был отфильтрован, промыт на фильтре 5 раз ацетоном и 5 раз эфиром и после этого извлекался эфиром в аппарате Сокслета в течение 20 час. Затем остаток был растворен в воде с добавлением 0.01 *n* NaOH до слабо щелочной реакции, раствор осажден ацетоном при -5° , осадок высушен в эксикаторе, освобожден промыванием водой от $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и вновь высушен в эксикаторе (препарат № 1).

Приготовление препарата № 2

Порция В бараньих щитовидных желез в течение двух суток извлекалась 2 объемами 0.1 нормального раствора уксуснокислого натрия при двукратной смене растворителя и экстракт был разделен пополам. Часть

* Подробнее о методах выделения тиреоглобулина см. диссертацию А. М. Фельдт.

экстракта была осаждена 3 объемами 95° спирта. Осадок был промыт спиртом и эфиром и извлекался эфиром в аппарате Сокслета в течение 20 час. (препарат № 2).

Получение препарата № 3

Другая часть экстракта (препарат № 2), полученная при помощи уксуснокислого натрия, была осаждена уксусной кислотой при $pH=4.4$, после установления оптимальной концентрации ионов водорода в отдельной пробе. После 2—3 час. стояния осадок был отфильтрован и растворен в 0.1 нормальном растворе уксуснокислого натрия с добавлением 0.01 *n* NaOH до нейтральной реакции. Этот раствор был вновь осажден уксусной кислотой при $pH=4.4$ после предварительной пробы, осадок был промыт спиртом и эфиром, извлечен эфиром в течение 20 час. в аппарате Сокслета и высушен (препарат № 3).

Для анализа все три препарата тиреоглобулина из бараньих щитовидных желез были высушены до постоянного веса при 105° и в них было определено количество азота по методу Кьельдаля, фосфора по Бриггсу⁽⁶⁾ и иода по Groak'у⁽⁵⁾. Средние данные из ряда анализов приведены в табл. 1.

Таблица 1
Сравнительный химический состав препаратов тиреоглобулина из бараньих щитовидных желез (в %)

Препараты	Азот	Иод	Фосфор
№ 1 (высаливание серно-кислым аммонием)	15.48	0.81	0.21
№ 2 (осаждение спиртом)	15.23	0.62	0.32
№ 3 (осаждение уксусной кислотой)	15.15	0.47	0.65

Судя по содержанию иода и фосфора, наиболее чистый препарат тиреоглобулина (№ 1) с минимальной примесью нуклеопротеида получен при помощи высаливания серно-кислым аммонием: почти вдвое больше иода и в три раза меньше фосфора по сравнению с препаратом № 3. Осаждение спиртом нельзя признать специфическим для тиреоглобулина, потому что спирт осаждает все белки (препарат № 2). В осадок от уксусной кислоты (препарат № 3) попало наименьшее количество тиреоглобулина, зато максимум нуклеопротеида (0.65% Р). Эти градации в содержании J и P указывают путь разделения двух белков щитовидной железы: после удаления из вытяжки нуклеопротеида уксусной кислотой последующее высаливание $(NH_4)_2SO_4$ должно дать тиреоглобулин с максимальным содержанием J и минимальным P, т. е. с меньшей примесью нуклеопротеида. Это предположение было проверено при исследовании тиреоглобулинов из щитовидных желез крупного рогатого скота.

Приготовление препарата тиреоглобулина № 4

2 кг свежих щитовидных желез крупного рогатого скота были отпрепарированы от жира и соединительной ткани, отмыты ледяной водой от крови, измельчены в мясорубке, после чего пульпа была смешана с 500 см³ воды и через 2 часа отжата через марлю. Полученная таким образом плазма с $pH=6.85$ хранилась под толуолом в леднике. Часть этой плазмы была осаждена уксусной кислотой при $pH=4.5$ после предварительного испытания в пробе. Осадок был растворен в воде с добавлением 0.01 *n* NaOH

до нейтральной реакции и вновь осажден на следующее утро уксусной кислотой уже при $pH=4.8$, согласно предварительной пробе. Осадок был растворен в воде с добавлением $0.01 n$ $NaOH$ до нейтральной реакции и раствор осажден 4 объемами ацетона при -5° , осадок был промыт ацетоном и эфиром и высушен (препарат № 4).

Приготовление препарата тиреоглобулина № 5

После вторичного осаждения уксусной кислотой при $pH=4.8$ (препарат № 4) часть осадка еще два раза была подвергнута той же процедуре, причем pH сместился до 4.95 , соответственно 5.12 . После 4-кратного осаждения уксусной кислотой осадок был растворен при помощи $0.01 n$ $NaOH$, осажден 4 объемами ацетона, осадок промыт ацетоном и эфиром и высушен (препарат № 5).

Приготовление препарата тиреоглобулина № 6

500 см^3 плазмы щитовидных желез (препарат № 4) были осажжены равным объемом насыщенного $(NH_4)_2SO_4$. Отфильтрованный осадок после растворения в дистиллированной воде вновь осажжен равным объемом насыщенного $(NH_4)_2SO_4$. Операция осаждения сернокислым аммонием была повторена три раза, осадок отдиализирован, раствор осажжен 4 объемами ацетона при -5° , промыт ацетоном и эфиром и высушен (препарат № 6).

Приготовление препарата тиреоглобулина № 7

Плазма щитовидных желез (препарат № 4) была осажжена уксусной кислотой при оптимальном pH после десятикратного разведения дистиллированной водой. Фильтрат был нейтрализован $0.1 n$ $NaOH$ на лакмус и осажжен равным объемом $(NH_4)_2SO_4$. Осадок был растворен в дистиллированной воде, раствор осажжен 4 объемами ацетона, промыт эфиром и высушен. Этот осадок для освобождения от $(NH_4)_2SO_4$ многократно промывался водой до исчезновения реакции на SO_4 в промывной воде, после этого осадок был промыт ацетоном и эфиром и высушен (препарат № 7).

Препараты № 4—7 извлекались эфиром в аппарате Сокслета в течение 40 час., затем были высушены до постоянного веса при 105° и анализированы на содержание N , J и P . Средние данные анализов приведены в табл. 2.

Сравнение препаратов № 4 и 5 показывает нам, что при повторном осаждении уксусной кислотой понижается процент J и повышается процент P , т. е. происходит обогащение препарата нуклеопротеидом при понижении содержания тиреоглобулина. При сопоставлении препаратов № 6 и 7 мы убеждаемся в том, что действительно осаждение уксусной кислотой освобождает препарат от нуклеопротеида (уменьшение P до $0,07\%$ в препарате № 7), причем процент J повышается до максимума ($0,97\%$); при полунасыщенном $(NH_4)_2SO_4$ вместе с тиреоглобулином выпадает и нуклеопротеид.

При увеличении содержания иода вдвое, процент фосфора уменьшается в 11 раз (препараты № 5 и 7). Отсюда мы вправе заключить, что и в наиболее чистом препарате тиреоглобулина (№ 7) все еще содержится примесь нуклеопротеида. По всей вероятности, фосфор не входит в состав молекул тиреоглобулина, а принадлежит примеси нуклеопротеида. Простое и трехкратное высаливание сернокислым аммонием дает препараты с $0.26—0.21\%$ P , а после очищения уксусной кислотой содержание P уменьшается в 3—4 раза, тогда как иод повышается лишь на $15—20\%$. Даже после четырех-

Таблица 2

Сравнительный химический состав препаратов тиреоглобулина из щитовидных желез крупного рогатого скота (в %)

П р е п а р а т ы	Азот	Иод	Фосфор	Зола
№ 4 (двукратное осаждение уксусной кислотой)	—	0.65	0.65	—
№ 5 (четырёхкратное осаждение уксусной кислотой)	15.21	0.54	0.80	2.1
№ 6 (троекратное осаждение сернокислым аммонием)	—	0.72	0.26	—
№ 7 (высаливание сернокислым аммонием из фильтрата от уксусной кислоты)	15.55	0.97	0.07	0.00

кратного осаждения уксусной кислотой препарат № 5 содержит слишком много золы.

Таким образом исследование препаратов тиреоглобулина из щитовидных желез крупного рогатого скота полностью подтвердило наше предположение о том, что уксусная кислота осаждает не тиреоглобулин, а нуклеопротеид. Содержание иода в препарате № 5, хотя и меньше, чем в № 4, но все же еще очень велико. Это зависит от того, что при длительной обработке тиреоглобулин подвергается денатурации (смещение оптимума рН осаждения в щелочную сторону), а денатурированный тиреоглобулин, в отличие от нативного, осаждается уксусной кислотой. При быстрой работе, при быстром растворении и осаждении уксусной кислотой не происходит смещения оптимума рН в щелочную сторону.

Для получения более чистых препаратов тиреоглобулина мы предлагаем предварительно освобождать раствор от нуклеопротеидов осаждением уксусной кислотой при оптимальном рН и затем высаливать сернокислым аммонием тиреоглобулин.

В ы в о д ы

1. Наиболее чистые препараты тиреоглобулина дает высаливание сернокислым аммонием после предварительного осаждения нуклеопротеида уксусной кислотой.

2. Нативный тиреоглобулин не осаждается уксусной кислотой.

3. Денатурированный тиреоглобулин дает осадок с уксусной кислотой.

4. При денатурации тиреоглобулина оптимальный рН осаждения уксусной кислотой смещается в щелочную сторону.

5. Нуклеопротеид высаливается при полунасыщении сернокислым аммонием.

6. Осаждение спиртом не может дать чистых препаратов тиреоглобулина.

Кафедра биохимии
Московского Химико-технологического
института мясной промышленности

Поступило
31 XII 1936.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ A. Oswald, ZS. physiol. Chem., 27, 14 (1899). ² B. O. Barnes, Proc. soc. exp. biol., 29, 680 (1932). ³ B. O. Barnes a. Jones, Amer. Journ. Physiol., 105, 556 (1933). ⁴ M. Heidelberger a. Palmer, Journ. of Biol. Chem., 101, 433 (1933). ⁵ B. Groak, Bioch. ZS. 75, 455 (1926). ⁶ Briggs, цит. по Д. Г. И о у, Колориметрия, стр. 341, ОНТИ, Москва, 1935.