Доклады Академии Наук СССР
1949. Том LXIV, № 4

БИОХИМИЯ

Г. А. КРИТСКИЙ и Е. Б. КУВАЕВА

НОВЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ФОСФОРИЛАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 30 XI 1948)

Чрезвычайно широкое распространение и многообразное значение фосфорилазы в природе убедительно показаны многочисленными работами, вследствие чего изучение фосфорилазы представляет значительный интерес. Существенным препятствием для изучения этого фермента до сих пор являлась его трудная доступность в чистом состоянии в сколько-нибудь достаточном количестве; это отмечалось и в нашей предыдущей работе (1). Известный до сих пор метод Кори (2) для получения кристаллической фосфорилазы имел существенные недостатки, которые были следствием предположения о наличии в мышце специального энзима (PR-энзима), расщепляющего фосфорилазу.

Поскольку в нашей предыдущей работе (1) была показана ошибочность этого предположения, естественно возник вопрос о существенном видоизменении самого метода приготовления чистой кристаллической фосфорилазы.

Необходимость пересмотра метода получения кристаллической фосфорилазы следовала также и из некоторых других наших опытов. Так, если профильтрованный водный мышечный экстракт диализовать в течение 3 суток в рефрижераторе против сменяемой дестиллированной воды, то в выпавшем осадке можно наблюдать и кристаллы, характерные для фосфорилазы, и фосфорилазную активность; в то же время, если в фильтрат от этого осадка добавить 0,7 объема насыщенного раствора сульфата аммония, как это обычно делают для осаждения фосфорилазы, то никакого осадка в течение первых 2 суток не образуется; на 3-и сутки выпадает небольшой осадок, не имеющий фосфорилазной активности. Это поставило под вопрос необходимость стадии диализа, применяемого в методе Кори.

После некоторых предварительных опытов нами было найдено, что кристаллическую фосфорилазу *a* из мышц можно получать по методу, несколько упрощенному по сравнению с методом Кори, причем в количестве в 1,5—2 раза большем. Этот новый метод мы описываем ниже.

Взрослый кролик анестезируется введением в ушную вену свежеприготовленного водного раствора гексабарбитона. После декапитации кролик подвешивается над раковиной для стекания крови. Далее по возможности быстро кожа снимается, мышцы срезаются и кладутся в лед. Затем они 2 раза пропускаются через мясорубку и экстрагируются 2 раза ледяной дестиллированной водой, каждый раз в объеме, равном весу мышц. При каждой экстракции мышечная кашица помешивается в течение 10 мин. и затем отжимается через плотную материю. С по-

мощью холодной 0,03 *М* соляной кислоты экстракт доводится до pH = = 5,8 (этот pH соответствует слабому покраснению метилового красного, добавляемого в количестве 1 капли на 6—8 капель экстракта). Затем экстракт последовательно фильтруют: сначала через гигроскопическую вату, положенную в бюхнеровскую воронку, потом через обычную фильтровальную бумагу и, наконец, через ватмановскую фильтровальную бумагу. Фильтрование должно итти на холоду. В полученный фильтрат добавляют при помешивании порошок заранее приготовленного двухзамещенного сукцината натрия * в количестве 1,3 г на 100 мл экстракта.

Таким образом получается раствор с pH = 6,8—7,0. В него добавляют при помешивании 0,7 объема насыщенного раствора сульфата аммония, подщелоченного аммиаком до pH = 7,0. Смесь оставляют на ночь в рефрижераторе. Затем декантируют основную часть маточного раствора с осадка некристаллической фосфорилазы. Оставшуюся часть фильтруют или центрифугируют. Собранный таким образом осадок осушают между листами фильтровальной бумаги и затем растворяют в 8—9 мл цистеин-сукцинатного буфера, приготовленного следующим образом.

К 0,5 л 1% раствора двухзамещенного сукцината натрия добавляют 0,5 г цистеин-гидрохлорида и затем слабого раствора KOH до pH =

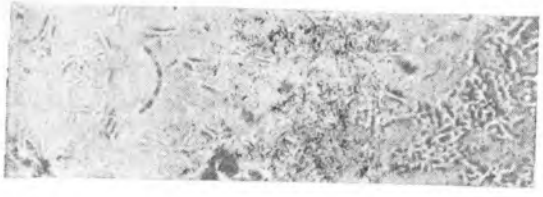

Рис. 1. Кристаллическая фосфорилаза

= 6,8—7,0. Если осадок белка не полностью растворился в 8—9 мл буфера, то добавляют при помешивании еще некоторое количество до полноты растворения белка; волокна бумаги, могущие быть в растворе, удаляют центрифугированием. Полученный желтоватый раствор выливают в диализационный мешочек и диализуют 1 час против ледяной водопроводной воды, а затем против цистеин-сукцинатного буфера вышеуказанного состава. При этом диализ ведут при 0° при смене диализующего буфера через каждые 3—6 час., причем каждый раз берут по 150 мл буфера. Через сутки выпадает обильный осадок игловидных кристаллов, характерных для фосфорилазы *а*. Эти кристаллы оседают на дно мешочка и занимают приблизительно половину содержимого мешочка. Кристаллы можно отцентрифугировать и промыть от маточного раствора холодным 0,03 *М* раствором хлористого калия, в который добавляется очень небольшое количество раствора едкого калия для доведения pH до 6,8—7,0 (обычный раствор хлористого калия в дестиллированной воде имеет слабо кислую реакцию, в которой фосфорилаза сравнительно неустойчива).

---

* Двухзамещенный сукцинат натрия готовят из янтарной кислоты следующим путем. Отвешенное количество янтарной кислоты разбалтывают в воде и добавляют при помешивании и охлаждении такое количество 25% раствора едкого натра, которое необходимо для доведения смеси до pH = 9,0. В полученный раствор двухзамещенного сукцината натрия добавляют трехкратный объем 95% этанола и смесь оставляют на ночь в рефрижераторе для полноты выкристаллизации сукцината. Затем сукцинат отфильтровывают и сушат между листами фильтровальной бумаги.

Полученные таким образом кристаллы (рис. 1) в процессе подготовки к фотографированию частично теряют свою правильную форму. Кристаллы давали интенсивную положительную реакцию на пентозу; их фосфорилазная активность показана в прилагаемом протоколе опыта (табл. 1).

Таблица 1

Определение фосфорилазной активности кристаллов

(В каждую колбочку для определения активности бралось 10 мг гликогена + 10 мг глюкозо-1-фосфата + 1 мл 2% сукцинатного буфера с pH = = 6,7 + 1 капля суспензии кристаллов с содержанием белка 0,4—0,6 мг. В одну из колбочек было добавлено 0,2 мг мышечной адениловой кислоты. $T = 15°$ С)

Время от начала опыта, в мин.	Накопление неорганического фосфора в мг в пересчете на всю реакционную смесь	
	в пробе без адениловой кислоты	в пробе с адениловой кислотой
0	0	0
3	0	0,23
6	—	0,41
30	0,21	—
38	0,39	—

Таким образом, в присутствии адениловой кислоты фосфорилазная активность кристаллов в 8—10 раз выше, чем без адениловой кислоты. Согласно нашим опытам, адениловая кислота в весьма различной степени активирует препараты фосфорилазы, приготовленные разными методами; все попытки получить фосфорилазу совершенно не активную без адениловой кислоты не увенчались успехом, адениловая кислота всегда выступала как активатор (увеличение активности до 150-кратной), но не как коэнзим фосфорилазы.

Сопоставляя вышеописанный метод получения кристаллической фосфорилазы с методом получения глобулина X, нам кажется вероятным, что фосфорилаза является одним из компонентов глобулина X.

Таким образом, вышеописанный усовершенствованный новый метод получения кристаллической фосфорилазы, составленный, исходя из предположения об отсутствии PR-энзима, в то же время сам является косвенным подтверждением этого предположения.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
30 XI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Г. А. Критский, ДАН, **61**, № 6 (1948). [2] A. A. Green and G. T. Cori, J. Biol. Chem., **151**, 21 (1943).