

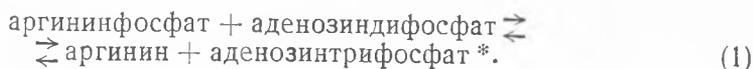
Э. Т. СОРЕНИ, П. Д. ДВОРНИКОВА и Р. Г. ДЕГТЯРЬ

ИЗОЛИРОВАНИЕ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ВИДЕ И ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТА АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ- АРГИНИН-ФЕРАЗЫ

(Представлено академиком А. В. Палладиным 21 IV 1949)

Как известно, в химизме мышечного сокращения позвоночных и беспозвоночных имеется большое различие: в то время как для мышц всех позвоночных характерно присутствие креатинфосфорной кислоты, в мышцах большинства беспозвоночных имеется аргининфосфорная кислота. В начале 20-х годов текущего столетия рядом лабораторий было подробно изучено превращение обеих гуанидинфосфорных кислот в изолированной мышце при работе и отдыхе, а также в мышечных кашах и экстрактах. Однако о ферментах, катализирующих превращение гуанидинфосфатов, до последнего времени почти ничего не известно.

В настоящем сообщении мы описываем изолирование в кристаллическом виде, а также некоторые свойства фермента, катализирующего реакцию равновесия:



Метод выделения аденозинтрифосфат- аргинин-феразы

В настоящее время в кристаллическом виде изолировано уже около 30 ферментов. Однако большинство описанных методов выделения очень сложно. Разработанный нами метод предельно прост и может быть проведен на студенческих занятиях.

Свежеотпрепарированные мышцы хвоста и клешней речных раков хорошо охлаждают и пропускают через охлажденную мясорубку типа Латапи. Измельченные мышцы экстрагируют двукратным объемом ледяной дистиллированной воды на холоду в течение 40 мин., помещивая время от времени. Затем отжимают через ткань и центрифугируют. Розоватый, слегка опалесцирующий центрифугат (рН около 7,0) охлаждают, добавляют при размешивании перекристаллизованный, тонко размельченный сульфат аммония, 43,2 г на каждые 100 мл фильтрата (0,6 насыщение), и тотчас фильтруют через складчатый фильтр при комнатной температуре.

В бесцветном, вначале совершенно прозрачном фильтрате (рН около 6,0) при комнатной температуре через 20—30 мин. появляется опалесцирующее облачко, которое постепенно увеличивается до образования шелковистого кристаллического осадка. На следующее утро в кристаллическом осадке наблюдается два вида кристаллов (рис. 1; увеличение в 225 раз на всех снимках): бипирамидальной (кри-

* Реакция (1) была открыта Ломаном (1) в экстрактах из мышц раков и восьминогих.

сталлы А) и кубической (кристаллы Б) формы. Количественно форма А значительно превалирует над формой Б. Рост кристаллов заканчивается при хранении на холоду через 5—10 дней, после чего бипирамиды, достигая большого размера, постепенно распадаются. До наступления распада кристаллический осадок центрифугируют и сохраняют в небольшом объеме раствора 0,7 насыщенного сульфата аммония. Выход кристаллического белка 1,36 г на 1 кг мышц.

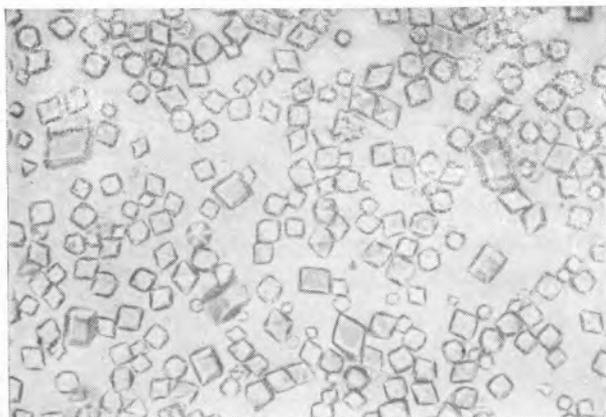


Рис. 1. Смесь кристаллов А и Б

Разделение кристаллов А и Б. Бипирамиды (форма А) при 0° при вышеописанных условиях не проявляют тенденции к кристаллизации; кубические формы, наоборот, легко кристаллизуются

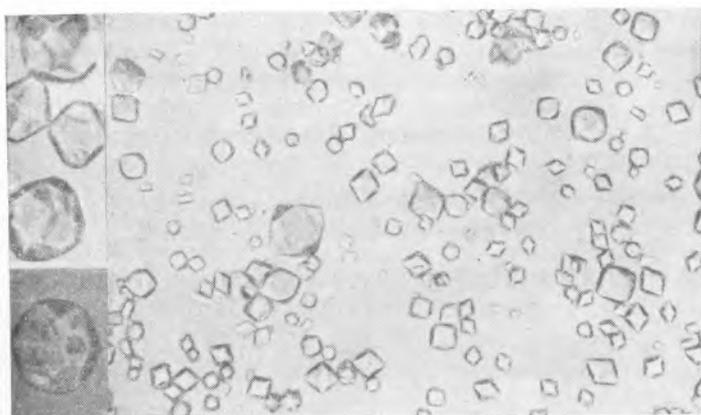


Рис. 2. Кристаллы А (АТФ-аргинин-фераз)

как при 0°, так и при 20°. На основании этих свойств обоих белков можно получить легко и почти в совершенно чистом виде обе формы кристаллов следующим образом. Все этапы кристаллизации, в том числе и фильтрация, производятся на холоду.

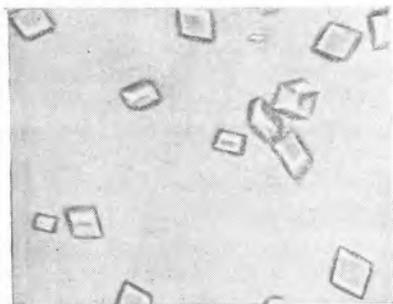


Рис. 3. Кристаллы Б

Полученный фильтрат (маточный раствор) выдерживают при 0° до завершения кристаллизации формы Б (40—48 час.). Затем кристаллический осадок, состоящий только из кристаллов Б (рис. 3), отделяют центрифугированием. Центрифугат отфильтровывают от единичных, мелких, неотцентрифугированных кристаллов кубической формы и оставляют на несколько часов при комнатной температуре (затравку давать не обязательно). Помешивание ускоряет кристал-

лизацию. Образовавшийся осадок содержит только кристаллы А (рис. 2).

Перекристаллизация. Легко перекристаллизовывается белок Б, значительно труднее ферментный белок А. После перекристаллизации энзиматическая активность кристаллов А не увеличивается.

Некоторые свойства кристаллов А

Кинетика фосфоферазной реакции. Растворы кристаллов А катализируют реакцию равновесия (1). Опытная проба содержит: 0,2 мл раствора АТФ (около $2,5 \mu\text{M}$); 0,1 мл раствора аргинина ($15,2 \mu\text{M}$); 0,1—0,2 мл раствора фермента (25—100 μg белка) и гликоколового буфера, $\text{pH} = 9,1$, до 1 мл.

Активность фермента справа налево мы выражаем количеством образовавшегося фосфора аргининфосфата в процентах от терминального фосфора добавленного АТФ (a). Зависимость величины a от времени изображена на рис. 4. Кривые имеют логарифмический характер и показывают быстрое падение скорости реакции во времени с приближением равновесия. Константа скорости мономолекулярной реакции

$$K = 1000 \frac{1}{t} \lg \frac{80}{80 - a}$$

при прочих равных условиях является постоянной величиной и может служить для вычисления единиц фосфоферазы на 1 мг белка.

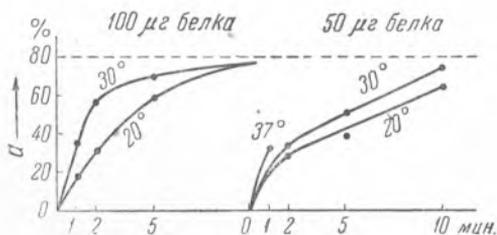


Рис. 4. АТФ-аргинин-феразная активность кристаллического фермента при $\text{pH} = 9,1$

Табл. 1 показывает, что кристаллы А содержат 2700—3000 Е фосфоферазы на 1 мг белка (30° и 50 μg белка в 1 мл пробы); активность смешанных кристаллов на 15—20% ниже (2300—2400 Е), что приблизительно соответствует содержанию в смеси ферментных кристаллов А.

Число переходов при $\text{pH} = 9,1$ и 20° равняется около 1500.

Оптimum pH . Действие фермента справа налево имеет ярко выраженный optimum при $\text{pH} = 9,1$.

Лабильность фермента и стабилизирующее действие аргинина. Ферментный белок А очень лабилен. 10 мин. нагревания при 50° инактивирует его. При диализе против дистиллированной воды быстро выпадает нерастворимый и неактивный осадок; диализ против 0,5—1% KCl приводит к частичной денатурации. Ферментный белок хорошо выдерживает диализ против сульфата аммония (0,15 насыщенный сульфат аммония, подщелоченный аммиаком до $\text{pH} = 8,5-9$). Кофермент при этом не отщепляется (активность фермента после диализа не изменяется). Хорошо стабилизирует ферментный белок аргинин; например, в присутствии 0,015 М аргинина фермент выдерживает 10-минутное нагревание при 50° .

Изоэлектрическая точка раствора кристаллов А лежит около $\text{pH} = 3,5$, т. е. белок имеет явно выраженный кислый характер, необычный для ферментных белков, за исключением пепсина. Изоэлектрическая точка определялась с помощью стандартного ацетатного ряда. Приближаясь к изоэлектрической точке, белок выпадает сразу при прибавлении его к буферной смеси (комнатная температура).

Константа равновесия фосфоферазной реакции

$$K = \frac{[\text{арг.}]\cdot[\text{АДФ}]}{[\text{ф. арг.}]\cdot[\text{АТФ}]}$$

Таблица I

Фосфоферазная активность кристаллического фермента

Форма белковых кристаллов	Колич. белка в пробе в $\mu\text{г}$	Продолжительность опыта в мин.	Т-ра опыта в $^{\circ}\text{C}$	Добавлено АТФ в $\mu\text{г}$ Р 7 мин	Образовалось аргинифосфата в %	Колич. перелесенного фосфора в % $\sigma = 100 \frac{P_{\text{ф. арг}}}{P_{\text{ф. Р 7 мин}}}$	$K = 100 \frac{1}{T} \lg \frac{8}{80} \rightarrow a$	Единиц фермента на 1 мг белка $E = \frac{K}{K}$ мг белка
Кристаллы А	29	10	30	124	45	72,6	103,4	3565
	29	10	30	120	43	71,7	98,4	3393
Кристаллы А	50	1	20	138	15	21,7	137,4	2748
	50	2	20	138	21	30,4	104,0	2080
	50	1	30	138	15	21,7	137,0	2747
	50	2	30	138	23	33,4	117,4	2347
Кристаллы А	50	1	37	138	23	33,4	234,7	4694
	50	1	45	138	20	29,0	195,5	3910
	50	1	20	131	15	22,9	146,5	2930
	50	2	20	131	20	30,6	105	2100
	100	1	30	131	20	30,6	210	2100
	100	2	30	131	40	61,1	313	3130
	100	5	30	131	48	73,3	216	2160
	100	2	37	131	40	61,1	313	3130
Смесь кристаллов А + Б	50	1	20	152	13	17,1	105	2100
	50	2	20	152	25	32,9	115	2300
	200	2	20	152	40	52,6	233	1165
	50	1	30	152	15	19,8	124	2480
То же	50	2	30	152	26	34,2	121	2420
	200	2	30	152	76	60,5	307	1504

при рН = 9,1 равняется около 6. При рН = 6,1 она возрастает до 500. При рН = 9,1 0,01 М Mg увеличивает константу в два раза, 0,01 М Са — в 4 раза и 0,01 М Mn — в 9 раз. Таким образом, аргинин-феразная реакция отличается от креатин-феразной реакции в отношении влияния ионов щелочноземельных металлов (2).

Анализ минерального состава показал, что смесь кристаллов А и Б содержит 0,267% марганца. Кроме того, спектральным анализом было обнаружено присутствие магния и кремния*. Анализ чистого ферментного белка А пока не произведен; таким образом, предположение, что фермент является протеидом марганца с молекулярным весом около 20 600, требует дальнейшей проверки.

Свойства кристаллов Б

Изоэлектрическая точка раствора кристаллов Б лежит при рН = 5,8. При определении изоэлектрической точки с помощью стандартного буферного ацетатного ряда белок выпадает (в отличие от ферментного белка А) только при нагревании.

Раствор белка Б не обладает фосфоферазной активностью в вышеуказанном тесте. При прибавлении 0,01 М Mg или 0,005 М Mn белок приобретает фосфоферазную активность, которая, однако, значительно ниже таковой ферментного белка А и при трехкратной перекристаллизации почти полностью исчезает. Ферментативная природа кристаллов Б, таким образом, еще не выяснена.

Институт биохимии
Академии наук УССР

Поступило
12 III 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ K. Lohmann, Biochem. Z., 282, 109 (1935); 286, 28 (1936). ² Э. Т. Сорени и Р. Г. Дегтярь, Укр. биох. журн., 20, 234 (1948).

* Выражаем благодарность заведующему кафедрой неорганической химии КГУ чл.-корр. АН УССР А. К. Бабко и доценту А. Т. Пилипенко за любезно произведенный анализ.