

В. И. РОЗЕНГАРТ, С. А. КИБАРДИН, Е. И. БЕРНАРДЕЛЛИ
и П. А. ФИНОГЕНОВ

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКООЧИЩЕННОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭСТЕРАЗЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 2 XI 1951)

Немногочисленные литературные данные об очистке печеночной эстеразы свидетельствуют о весьма низкой эффективности попыток получения этого фермента в чистом виде. В большинстве случаев не удавалось сконцентрировать фермент более, чем в 20—35 раз по отношению к исходному материалу. Сведения о получении кристаллической эстеразы (1) дальнейшими исследованиями не подтвердились, так как оказалось, что кристаллические препараты обладали очень низкой эстеразной активностью, которая при перекристаллизации полностью исчезала.

В последнее время в литературе появилось сообщение о получении эстеразы из лошадиной печени (2). Авторы применяли довольно сложный метод фракционирования охлажденным ацетоном, в результате чего им удалось получить ферментный препарат, обладающий высокой относительной активностью (концентрирование в 270 раз). Электрофоретический анализ лучших образцов этого препарата показал, что препарат не является однородным и содержит несколько белковых ингредиентов, хотя главная масса белка (около 70%) падает, повидимому, на долю эстеразы.

Способ очистки эстеразы, разработанный нами, основан на фракционированном осаждении сернокислым аммонием и позволяет при относительной простоте получать ферментные препараты высокой степени очистки. Исходным материалом служила свиная печень, из которой обычным способом готовился ацетоновый порошок. Отступление от общепринятой процедуры состояло лишь в том, что мы не применяли эфира для промывания порошка на последнем этапе, так как обработка эфиром, как показали опыты, значительно снижает активность фермента.

Активность эстеразы определялась титрометрически — по количеству мл 0,01 *N* щелочи, нужной для нейтрализации кислоты, образующейся при инкубации раствора фермента с этилбутиратом. В забуференных растворах активность определялась сталагмометрически с использованием трибутирина в качестве субстрата. На всех этапах производилось определение белкового азота по микрокельдалю, и степень чистоты препарата выражалась его удельной активностью, т. е. числом условных единиц активности фермента, соответствующим 1 мг белка.

Исходный ацетоновый порошок в наших условиях имел удельную активность 0,7.

Процедура получения очищенного ферментного препарата состоит в следующем. К 50 г ацетонового порошка прибавляют 400 мл 0,025 *N* аммиака и смесь помещают на 30 мин. в термостат при 35—37°, все время помешивая. Фильтруют через марлю. Экстрагирование в таких же

условиях повторяют 2—3 раза, прибавляя каждый раз новую порцию аммиака. Общий расход раствора аммиака составляет около 25 мл на 1 г порошка. Экстракты соединяют и получают 1200—1300 мл коричневой жидкости с рН 7,5—8,0. Удельная активность на этом этапе 13—14.

Экстракт подкисляют 0,5 *N* уксусной кислотой до рН 5,5—5,8 и оставляют на ночь при температуре +3—5°. Выпавший за ночь белковый осадок отсасывают на бюхнеровской воронке и отбрасывают.

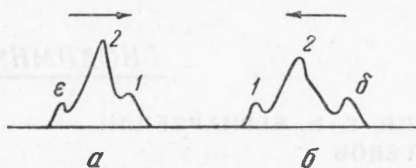


Рис. 1. Электрофорез очищенной эстеразы (2 часа). *a* — нисходящая ветвь, *b* — восходящая ветвь

К фильтрату снова прибавляют серноокислый аммоний (7,5 г на каждые 100 мл жидкости) и оставляют на ночь. Образуется обильный рыхлый осадок белка, который содержит основную массу фермента. Фильтруют и фильтрат отбрасывают. Осадок повторно (2—3 раза) экстрагируют 45% раствором серноокислого аммония, прибавляя каждый раз по 30—35 мл раствора соли и тщательно отфильтровывая. рН раствора при этом поддерживают на уровне 7,0—7,3. Последнее экстрагирование проводят таким образом, чтобы осадок с раствором соли оставить на фильтре на ночь при температуре около нуля. Для предохранения фермента от высыхания воронку накрывают влажным листом фильтровальной бумаги. Фильтрат отбрасывают, а оставшийся на фильтре осадок растворяют в 10—12 мл холодной дистиллированной воды при рН 7,0. Удельная активность препарата на этой стадии очистки составляет в среднем 90.

Раствор ставят на диализ против холодной дистиллированной воды на 48 час. Отфильтровывают выпавший осадок и получают около 20 мл прозрачного, слегка желтоватого раствора фермента с удельной активностью 210—220.

Таким образом, в лучших препаратах нам удалось добиться 300-кратной очистки фермента по сравнению с исходным ацетоновым порошком. Процедуру получения очищенной печеночной эстеразы мы повторили несколько раз, причем была показана хорошая воспроизводимость результатов.

Полученные препараты были исследованы методом электрофореза. 1% раствора эстеразы диализовался против вероналового буфера с рН 8,6 и ионной силой $t = 0,1$. Полнота диализа проверялась измерением электропроводности раствора и буфера. При этом расхождение в электропроводности не превышало 1%.

Опыты ставились на электрофоретическом аппарате с наблюдением по методу наклонной щели и цилиндрической линзы (3). Условия — обычные для электрофореза белков: температура термостата +1°, электрическое поле $F = 6$ в/см. Как видно из рис. 1 и 2, очищенная эстераза показывала в электрофоретическом аппарате два компонента. Границы более быстрого небольшого компонента держатся в течение всего опыта довольно устойчиво. Границы же более медленного большого компонен-

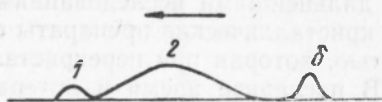


Рис. 2. Электрофорез очищенной эстеразы (7 час.). Восходящая ветвь

та при длительном электрофорезе сильно расплываются (подобно γ -глобулину сыворотки), указывая на его вероятную неоднородность. В опытах всегда отмечалась так называемая электрофоретическая аномалия, выражающаяся в различных подвижностях восходящей и нисходящей границ медленного компонента.

В виде примера приводим данные подвижностей одного из препаратов (в $\text{см}^2/\text{в} \cdot \text{сек}$): восходящая ветвь: 1 — $4,35 \cdot 10^{-5}$, 2 — $3,12 \cdot 10^{-5}$; нисходящая ветвь: 1 — $4,35 \cdot 10^{-5}$, 2 — $2,64 \cdot 10^{-5}$.

С целью выделения чистого фермента из имеющихся препаратов была произведена попытка препаративного разделения компонентов путем взятия соответствующих проб из электрофоретической кюветы после 8-часового электрофореза. На рис. 3 изображена схема препаративного электрофореза эстеразы.

Во всех пробах, а также в исходном растворе, который не подвергался электрофорезу и служил контролем, были определены ферментативная активность и содержание белка (см. табл. 1). Из таблицы видно, что первый (быстрый) компонент отличается весьма низким содержанием белка и совершенно не обладает ферментативной активностью. Во

всех остальных пробах эстеразная активность была обнаружена, однако она оказалась значительно ниже, чем в исходном растворе. Попытка снова соединить все пробы вместе и получить исходный раствор не увенчалась успехом. Активность такой смеси была близка к средней арифметической из активностей отдельных проб. Препаративный электрофорез эстеразы был повторен дважды и оба раза дал аналогичный результат. Таким образом, электрофоретическое разделение очищенных препаратов эстеразы не только не привело к выделению чистого фермента, но сопровождалось потерей значительной части исходной активности.

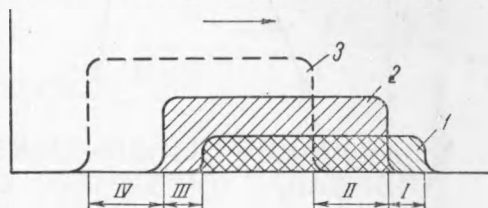


Рис. 3. Схема препаративного электрофореза. Ось абсцисс — развернутая длина U-образной кюветы. Ось ординат — концентрация раствора. 1, 2, 3 — компоненты. Под «третьим» компонентом подразумевается первоначальное положение раствора (или его неподвижная составляющая). I, II, III, IV — пробы, взятые для исследования

Таблица 1

Пробы	Компоненты	Разведение, в котором производилось измерение активности *	Активность (усл. ед.) в 1 мл разведения	Содержание белка в 1 мл неразведенной пробы в мг	Активность (усл. ед.) на 1 мг белка
Исходная		1:60	52	6,6	473
I	1	1:10 и 1:5	0	0,21	0
II	1 + 2	1:20	42	4,96	169
III	2 + 3	1:10	18	1,65	109
IV	3	1:10	27	3,81	71

* Предварительными опытами было установлено, что в выбранных разведениях между концентрацией фермента и активностью существует прямолинейная зависимость.

Этот результат, вероятнее всего, можно объяснить уходом (под действием электрического поля) протетической группы фермента, не отмеченным оптическим устройством электрофоретического аппарата. Такое

предположение подтверждается тем, что в отдельных опытах в начале электрофореза удавалось обнаружить в обеих ветвях совсем небольшие очень быстро движущиеся границы еще одного компонента (повидимому, липоидной природы) с подвижностью около $2,7 \cdot 10^{-4}$ см²/в · сек в виде

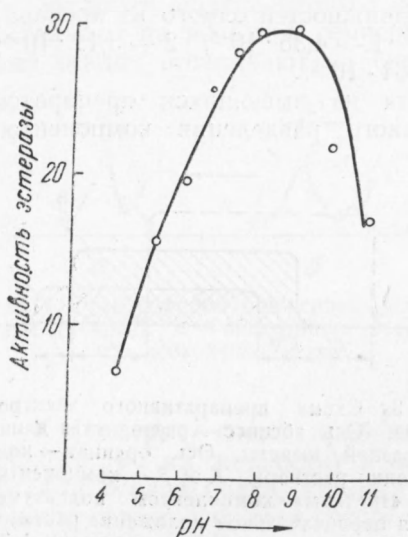


Рис. 4. Влияние pH на активность очищенной эстеразы

перевернутых пиков (с коэффициентом преломления ниже, чем у буферной среды).

Для характеристики очищенных препаратов эстеразы было изучено влияние pH на ферментативную активность. В этих опытах инкубация фермента с трибутирином производилась в забуференных растворах с различной концентрацией водородных ионов. Для значений pH 8,5 и ниже применялся вероналовый буфер, а для pH выше 8,5 — гликоколовый.

Результаты этих опытов, представленные на рис. 4, показывают, что фермент проявляет максимальную активность при pH 8,0—8,5. Интересно отметить, что очистка печеночной эстеразы не влияет на ее отношение к реакции среды. Как показали наши исследования, неочищенные препараты фермента (экстракты из ацетонового порошка) характеризуются тем же оптимальным pH.

Поступило
12 VII 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. S. Mohamed, Acta chim. Scand., 3, 56 (1949). ² W. M. Connors, A. Phil. A. L. Dounce and E. Stotz, Journ. Biol. Chem., 184, 29 (1950).
³ С. Е. Бреслер и П. А. Финогенов, Биохимия, 15, 145 (1950).