

А. В. МАРКОВИЧ и А. А. ВОРОБЬЕВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРЕДЕЛЬНО ОЧИЩЕННОГО СТОЛБНЯЧНОГО АНАТОКСИНА ГРАФИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ КРИВЫХ ВЫСАЛИВАЕМОСТИ БЕЛОК — АНТИГЕН

(Представлено академиком К. М. Быковым 15 X 1952)

Если белок обладает каким-либо специфическим действием (ферментативным, гормональным, токсическим, антигенным), то для определения его предельной активности необходимо предварительное выделение белка в чистом виде, что представляет значительные трудности и достигнуто лишь для относительно немногих белков. Однако в некоторых случаях различная растворимость белков в концентрированных растворах нейтральных солей позволяет определить содержание того или иного белка и его предельную активность без предварительного выделения этого белка из смеси с другими.

Пусть в растворе имеется один белок, обладающий специфическим свойством. При высаливании этого белка возрастающими концентрациями электролита накопление специфической активности в осадке будет прямо пропорционально количеству осажденного белка. Следовательно, в этом случае на графике высаливаемости белок — специфическое свойство (рис. 1) получим прямую ON .

Допустим, что в растворе имеется три белка — А, Б и В, из которых белок Б обладает специфическим свойством. Предположим, что эти белки различаются по своей растворимости: при некоторой концентрации электролита c_K белок А осажден полностью, а белок Б еще не начинает высаливаться; при концентрации c_L ($c_L > c_K$) полностью осажден белок Б, в то время как белок В еще не начинает высаливаться. Для рассматриваемого случая график высаливаемости белок — специфическое свойство изобразится линией $OKLN$ (рис. 1). Ординаты QP , PL и LN дают относительное содержание в растворе белков А, Б и В, соответственно. Для активности F предельно очищенного

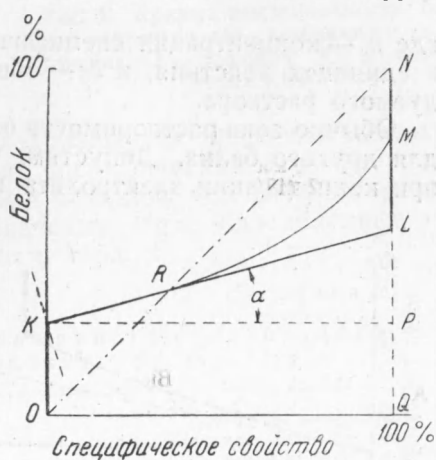


Рис. 1. Схематический график высаливаемости белок — специфическое свойство

Высаливание белков и антигена столбнячного анатоксина сернокислым аммонием

Высоленная фракция, объемн. % насыщен- ного раствора (NH ₄) ₂ SO ₄	Препарат анатоксина									
	K1		KK1		K13		K2		KK15	
	Количество белкового азота (б.Н) и антигена (ф.е) высаленной фракции в % их концентрации в анатоксине									
	б.Н	ф.е.	б.Н	ф.е.	б.Н	ф.е.	б.Н	ф.е.	б.Н	ф.е.
0—35	24,6	1,2	23,9	7,1	41,1	3,2	34,5	0,1	15,0	30,0
0—36	—	—	—	—	19,5	35,4	—	—	—	—
0—37	30,9	27,8	34,9	28,5	25,5	58,0	40,4	33,4	26,0	60,0
0—38,5	—	—	—	—	34,8	77,4	—	—	—	—
0—40	35,0	65,6	56,0	71,4	39,0	91,9	50,7	75,7	39,7	82,5
0—43	41,3	84,3	72,5	85,7	46,6	91,9	59,6	86,0	53,4	90,0
0—45	44,6	94,2	75,3	89,3	50,9	91,9	65,9	90,0	57,5	90,0
0—47	48,0	94,2	—	—	—	—	69,1	90,0	—	—
0—50	49,2	94,2	80,7	89,3	55,1	91,9	70,4	90,0	—	—

белка Б из треугольника *PKL* имеем:

$$F = \operatorname{ctg} \alpha \frac{c_a}{c_b}, \quad (1)$$

где c_a — концентрация специфического вещества в 1 мл, выраженная в единицах действия, и c_b — общая концентрация белка в 1 мл исследуемого раствора.

Обычно зона растворимости одного белка накладывается на таковую для другого белка. Допустим, что белок В начинает высаливаться при концентрации электролита меньшей, чем c_L , т. е. когда белок Б

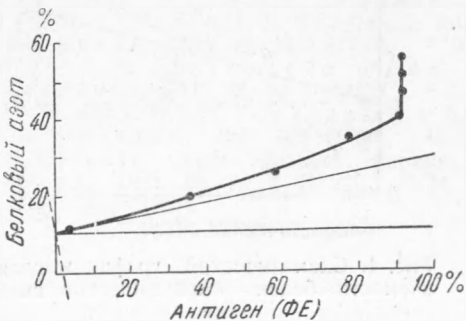


Рис. 2. Кривая высаливаемости белок — антиген для столбнячного анатоксина (препарат K13)

еще не осажден полностью. Тогда график высаливаемости белок — специфическое свойство будет иметь, например, вид кривой *OKRMN* (рис. 1). В этом случае, как видно из построения, проводя касательную к кривой *MRK* в точке *K*, получим прямую *KL*, отвечающую высаливанию белка Б, если бы не было соосаждения с ним белка В. Активность предельно очищенного белка Б попрежнему будет выражаться уравнением (1).

Указанные выше соображения были применены для определения предельной активности столбнячного анатоксина, который еще не выделен в чистом виде. Исследовались различные препараты столбнячного анатоксина, в значительной степени очищенные от балластных азотистых веществ.

В ряд пробирок отмеривалось a мл столбнячного анатоксина и затем последовательно добавлялись x мл дистиллированной воды и y мл насыщенного раствора сернокислого аммония, причем $a + x + y = \text{const}$. Насыщенный раствор (NH₄)₂SO₄ добавлялся медленно по каплям, при постоянном размешивании, для лучшего разделения

белковых компонентов (1). Через 12—14 час. после высаливания осадок отделялся центрифугированием и затем растворялся. Концентрация антигена определялась по реакции флокуляции (выражена в флокуляционных единицах ф. е.), белковый азот — по микро-кьюльдалю (после осаждения 5% раствором CCl_3COOH). Полученные результаты приведены в табл. 1.

По данным табл. 1 на рис. 2, 3 и 4 построены кривые высаливаемости белок — антиген, т. е. кривые, показывающие зависимость количества осаждаемого белка в отдельных фракциях от содержания антигена в тех же фракциях. Кривые белок — антиген экстраполировались до пересечения с осью ординат. Через полученную точку проводилась касательная к кривой* и линия, параллельная оси абсцисс.

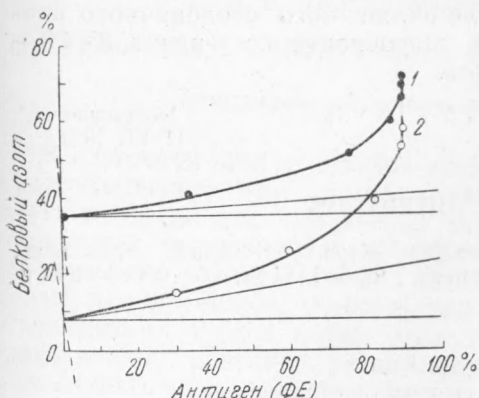


Рис. 3. Кривые высаливаемости белок — антиген для столбнячного анатоксина. 1 — препарат К2; 2 — препарат КК15

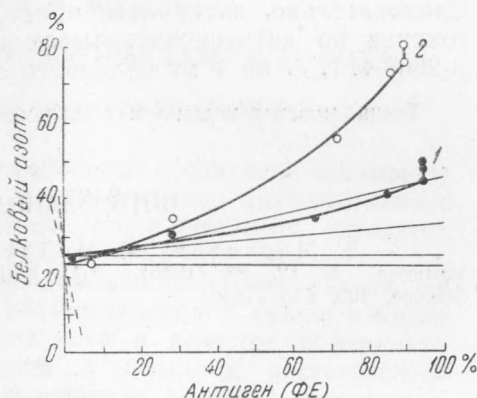


Рис. 4. Кривые высаливаемости белок — антиген для столбнячного анатоксина. 1 — препарат КК1; 2 — препарат КК1

Из рис. 2, 3 и 4 видно, что исследовавшиеся препараты анатоксина содержат не менее трех белков: специфический антиген и два другие белка, обладающие меньшей и большей, чем антиген, растворимостью в растворах $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Значения $\text{ctg } \alpha$, определенные графически по рис. 2, 3 и 4, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Активность предельно очищенного столбнячного анатоксина

Препарат анатоксина	Концентрация антигена (c_e) ф. е./мл	Белковый азот (c_0) мг/мл	$\text{ctg } \alpha$	Активность предельно очищенного анатоксина в ф. е. на 1 мг белк. азота
К1	70,4	0,240	12,50	3660
КК1	450,0	0,520	4,21	3640
К13	136,0	0,236	5,38	3100
К2	44,0	0,223	16,66	3290
КК15	352,0	0,580	6,45	3920
Среднее . . .				3520 ± 260

Данные табл. 2 показывают, что вычисленная по уравнению (1) активность предельно очищенного столбнячного анатоксина $F = 3520 \pm$

* Построение касательной к кривой в заданной точке производилось при помощи зеркала.

± 260 ф. е. на 1 мг белкового азота, или 1 ф. е. столбнячного антигена содержит $0,28 \pm 0,02$ г азота. Полученный результат хорошо согласуется с данными ⁽²⁾ по активности кристаллического столбнячного токсина, который содержит 3500—4000 ф. е. на 1 мг азота.

Концентрацию антигена в столбнячных анатоксинах выражают в ф. е. и в антиоксинсвязывающих единицах (а. с. е.). Последние определяются на белых мышах. Так как ф. е. представляет количество анатоксина в миллиметрах, дающее инициальную флокуляцию с одной антиоксической единицей (а. е.) противостолбнячной сыворотки, а а. с. е. — количество анатоксина, связывающее 0,1 а. е., то следовало ожидать, что 1 ф. е. = 10 а. с. е. Параллельное определение концентрации антигена обоими методами подтвердило это соотношение. Следовательно, активность предельно очищенного столбнячного анатоксина по антиоксинсвязывающей способности составляет 35000 ± 2600 а. с. е. на 1 мг белкового азота.

Военно-морская медицинская академия

Поступило
1 VII 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. В. Маркович, И. М. Хаустова, Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол., № 12, 83 (1945). ² L. Pillemer, R. Wittler, B. Grossberg Science, 103, 615 (1946).