

Н. С. ДРОЗДОВ и В. Д. КОПЫЛОВА
КАТАЛАЗА ЭРИТРОЦИТОВ БЫКА

(Представлено академиком В. М. Родионовым 27 VI 1953)

Зеваг и Майвег (1) описали получение очищенного препарата каталазы из эритроцитов кролика. Полученный ими раствор каталазы обладал высокой каталазной активностью, не давал реакции осаждения с сульфосалициловой кислотой, а при диализе раствора активность каталазы уменьшалась. В результате 7-дневного диализа при $+3^{\circ}$ наблюдалось падение активности в 3 раза. Такое падение активности авторы объясняли устранением при диализе из раствора каталазы фосфатного буфера.

Зеваг и Майвег показали, что каталазная активность полученного ими раствора сильно ингибируется при действии некоторых оксимов (диметилглиоксим), однако только после обработки последних нагреванием в кислых водных растворах. Это ингибирующее действие приписывалось ими необратимому окислению энзима в присутствии особо активной формы оксима, образующейся после обработки кислотами. Однако Кейлин и Хартри (2) высказали мнение, что в условиях опытов Зеваг и Майвег имело место типичное ингибирование каталазы гидроксиламином, образующимся при гидролизе оксимов.

В настоящей работе мы применили для получения очищенной каталазы из эритроцитов быка способ, описанный Зеваг и Майвег, и изучили некоторые свойства полученной каталазы.

Для получения очищенного энзимного препарата 50 мл дефибрированной крови крупного рогатого скота центрифугируют и эритроциты отделяют от сыворотки. Эритроциты 3—4 раза промываются физиологическим раствором, который каждый раз отделяется центрифугированием. Промывание эритроцитов ведут до тех пор, пока жидкость не сделается совершенно прозрачной.

После этого к промытым эритроцитам добавляют 500 мл дистиллированной воды. Раствор, полученный после гемолиза, хорошо встряхивают в течение 3 час. с 20 мл хлороформа. Выпавший осадок отделяют центрифугированием, а к темнокрасному раствору добавляют 5 мл хлороформа и оставляют при $+5^{\circ}$ на 5—6 суток. После такого хранения при $+5^{\circ}$ к 200 мл раствора добавляют 1,425 г Na_2HPO_4 и 0,7262 г KH_2PO_4 и после растворения при той же температуре получают раствор, содержащий фосфатный буфер с $\text{pH} \sim 7,0$. При этом пигменты почти полностью переходят в осадок и красная окраска исчезает, жидкость становится светложелтой. Осадок отделяют центрифугированием, а к раствору добавляют 30 мл хлороформа и энергично встряхивают около 60 мин. Выпавший небольшой осадок удаляют центрифугированием, после чего получают совершенно прозрачный и бесцветный раствор, содержащий каталазу.

Полученный раствор обнаруживает высокую каталазную активность, которая не изменяется в течение 4-месячного хранения раствора при $+5^{\circ}$.

Пробы на присутствие белка с трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами, с реактивом Эсбаха, а также биуретовая проба и проба с нингидрином дают с раствором каталазы отрицательный результат. При диализе полученного раствора через коллодийную мембрану против

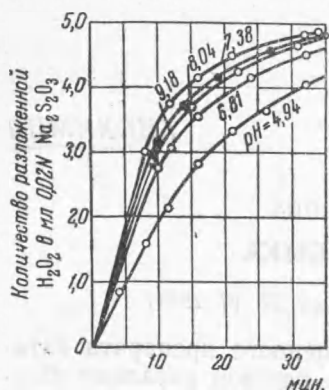


Рис. 1

дистиллированной воды наблюдается уменьшение каталазной активности в диализируемом растворе. Однако при этом в воде, служащей для диализа, обнаруживается каталазная активность, соответствующая потерянной в диализируемом растворе. Катализа, следовательно, диффундирует через коллодийную мембрану. Способность диффундировать через коллодийную мембрану и отрицательные пробы на присутствие белка позволяют заключить, что полученная катализа не относится к белковым веществам.

Для определения зависимости активности каталазы от $[H^+]$ были поставлены опыты в буферных смесях при различных рН. Раствор каталазы для этих опытов предварительно разбавлялся в отношении 1:30

фосфатным буфером М/15 с рН, соответствующим данному опыту (от 4,94 до 9,18). В коническую колбу на 200 мл вносят 10 мл раствора каталазы, разбавленного 1:30 фосфатным буфером, затем 20 мл воды, 50 мл фосфатного буфера М/15 с рН, соответствующим данному опыту, и наконец при 18° вносят 20 мл 0,1 N раствора H_2O_2 . Смесь перемешивают (общий объем 100 мл) и оставляют в термостате при 18°.

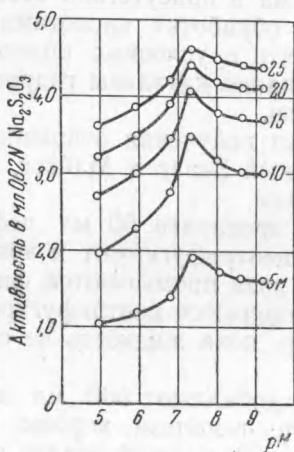


Рис. 2

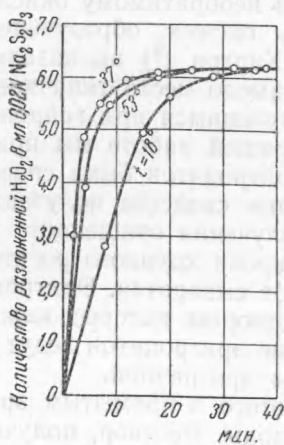


Рис. 3

Через определенные промежутки времени берут 10 мл смеси и переносят в колбу на 100 мл, в которую предварительно помещено 4 мл 5% H_2SO_4 . Добавляют 3 мл 0,05 N КJ, и через 30 мин. выделившийся иод оттитровывается 0,02 N тиосульфатом.

Параллельно ставится слепой опыт, в котором вместо раствора каталазы берут дистиллированную воду и из которого также отбирается проба 10 мл и также оттитровывается выделившийся иод.

По разности находится число миллилитров 0,02 N $Na_2S_2O_3$, эквивалентное количеству разложенной каталазой H_2O_2 . Результаты нескольких таких опытов при рН 4,94; 6,81; 7,38; 8,04 и 9,18 графически представлены на рис. 1.

По найденным кривым, выражающим зависимость: количество разложенной H_2O_2 — время, построены кривые рис. 2, изображающие зависимость активности каталазы от рН для различной продолжительности опыта (от 5 до 25 мин.) при 18° . Из этих кривых видно, что оптимальная активность каталазы наблюдается при $\text{pH} = 7,4$, однако и при других рН активность каталазы значительна.

Далее, по описанному методу при $\text{pH} = 7,4$ поставлены с одним исходным раствором каталазы параллельные опыты при $18, 37$ и 53° . В этих опытах раствор каталазы в смеси с буфером до внесения раствора H_2O_2 выдерживался 30 мин. при соответствующей температуре и только после этого вносился раствор H_2O_2 .

Результаты указанных опытов изображены графически на рис. 3, из кривых которого видно, что при 30 мин. нагревания каталазы при 53° происходит очень небольшое снижение активности и кривая количество разложенной H_2O_2 — время для опыта при 53° идет несколько ниже, чем для опыта при 37° . При снижении температуры реакции до 18° наблюдается заметное снижение скорости реакции, однако и при этой температуре разложение H_2O_2 каталазой протекает энергично.

В дальнейших опытах для выяснения угнетающего действия гидроксиламина на каталазную реакцию к 10 мл раствора каталазы, разбавленного 1:30 фосфатным буфером $M/15$ с $\text{pH} = 7,4$, добавлялось 50 мл $M/15$ буфера с тем же рН и 10 мл раствора, содержащего от $1 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ моля гидрохлорида гидроксиламина. Через 15 мин. при 18° вносилось 10 мл воды и 20 мл $0,1 N \text{H}_2\text{O}_2$. Далее отбирались пробы, в которых иодометрически определялось количество неразложенной H_2O_2 , как это указано раньше, и параллельно — слепой опыт. Результаты этих опытов показывают, что уже при концентрации $1 \cdot 10^{-6} M$ гидроксиламин оказывает некоторое ингибирующее действие, которое делается заметным при концентрации $1 \cdot 10^{-5} M$ и резко выраженным при $1 \cdot 10^{-4} M$ гидроксиламина в растворе.

В условиях аналогичных опытов с тиомочевинной никакого влияния на активность каталазы не обнаружено.

Поступило
18 VI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Sevag, L. Maiweg, Naturwiss., **22**, 561 (1934); Biochem. Z., **288**, 41 (1936). ² D. Keilin, E. Hartree, Nature, **134**, 933 (1934).