

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXI, 27

SECTIO D

1966

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej. Wydział Lekarski
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr Janina Opieńska-Blauth

Zbigniew PRASAŁ

Otrzymywanie ceruloplazminy i badanie jej własności

The Isolation of Ceruloplasmin and Investigation of Its Properties

Ceruloplazminę, niebieski miedzioproteid surowicy krwi o własnościach oksydazowych, otrzymali po raz pierwszy z surowicy krwi ludzkiej i wieprzowej Holmberg i Laurell w 1948 roku (8). Odkrycie ceruloplazminy potwierdziło przypuszczenie sprzed 50 lat o występowaniu we krwi czynnika odpowiedzialnego za własności oksydazowe surowicy (1). Doniesienie o obniżeniu poziomu ceruloplazminy we krwi chorych (choroba Wilsona) zwróciło uwagę wielu autorów na jej rolę w fizjologii i patologii (2). Obok kierunku klinicznego w badaniach nad ceruloplazminą, metodyka otrzymywania i oczyszczania ceruloplazminy oraz badania nad jej strukturą i własnościami enzymatycznymi budzą obecnie zainteresowanie wielu autorów. Badania nasze polegały na izolacji ceruloplazminy z surowicy wieprzowej, ustaleniu jej jakościowego składu aminokwasowego, własności enzymatycznych, udziału miedzi w aktywności i współdziałania z serotoniną *in vitro*.

MATERIAŁ, ODCZYNNIKI, APARATURA I METODY

1. Materiał wyjściowy w preparatyce ceruloplazminy

Świeżą krew wieprzową poddano w chłodnym miejscu samoistnemu skrzepnięciu; oddzieloną surowicę (1—1,5 l) odwirowano w temp. 4°C przy 2000 obr/min.

2. Odczynniki specjalne i adsorbenty

Dwuetylobarbituran sodu (BDH, Anglia), kupryzon (Eastman Kodak, USA), dwuchlorowodorek p-fenylenodwuaminy (FOCH, Gliwice) przekryształizowany dwukrotnie z acetonu, kwas l-askorbinowy (Roche Products, Anglia), 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzen (Light Co, Anglia), krystaliczna α -chymotrypsyna (Boehringer i Soehne GNBH, Mannheim), systoks (Inst. Med. i Hig. Wsi, Lublin), wzorcowe aminokwasy

(Light Co, Anglia), wzorce DNP-aminokwasów (Mann Research Lab., New York), siarczan kompleksu kreatyniny z serotoniną (Merck AG, Darmstadt), proszek celulozowy (Whatman, Anglia), sefadeks G-25 (Pharmacia Fine Chem. Uppsala, Szwecja), żywica cheleks-100 (Bio. Rod. Lab., Los Angeles), żel krzemionkowy (Merck AG, Darmstadt), odczynnik Ehrlicha (aldehyd p-dwumetyloaminobenzoesowy, stęż. HCl, aceton w stosunku: 1 cz. 10% roztworu aldehydu w kwasie solnym i 4 cz. acetonu).

3. Aparatura

Wirówka chłodzona (MSE, Anglia), aparat do elektroforezy kolumnowej (LKB 3340, Szwecja), pehametr z elektrodą szklaną typ S-21 i kalomelową typ K-55 (Piezoelektronika, Tychy), fotokolorymetr mod. 581 (MFR, Chiny), aparat do elektroforezy bibułowej (MGF, Berlin) i żelowej (Inst. Wet. Puławy), aparat Warburga (VEB, Berlin), urządzenie do chromatografii cienkowarstwowej (Desaga, Heidelberg), wąż celofanowy (Visking Co, Chicago).

4. Metody

We frakcjach białkowych oznaczano: azot ogólny metodą kolorymetryczną wg Burcka (3), białko — metodą Lowry i wsp. (12), miedź — metodą Petersona i Bolliera (18), aktywność oksydazową — metodą Rice'a (19). Preparat końcowy analizowano elektroforetycznie metodą elektroforezy bibułowej w różnych pH, w gradiencie potencjału 5,5 V/cm, jak również metodą elektroforezy na żelu skrobiowym w buforze boranowym o pH 8,6 i 7,3 przy natężeniu prądu 30 mA. Technika manometryczna (21) do oznaczania szybkości początkowej i metody graficzne (11) posłużyły do wyznaczenia stałych Michaelisa względem p-fenylendwuaminy i askorbinianu oraz wykazania hamowania kompetycyjnego cytrynianu względem powyższych substratów ceruloplazminy. Skład aminokwasowy badano w hydrolizacie kwasowym ceruloplazminy (hydroliza preparatu 6 N HCl w temp. 105°C w czasie 18 godz.) techniką dwukierunkowej chromatografii wstępującej, dwukierunkowej chromatografii DNP — aminokwasów (22) oraz elektrochromatografii bibułowej (6). Hydrolizę enzymatyczną 1% roztworu ceruloplazminy α -chymotrypsyną przeprowadzono w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,5 w czasie 23, 30 i 56 godz. w temp. 37°C; aktywność proteolityczną α -chymotrypsyny hamowano systoksem a nie pirofosforanem czteroetylu (4). Współdziałanie *in vitro* ceruloplazminy z serotoniną określano chromatografią cienkowarstwową (15); związki indolowe na chromatogramach wykrywano odczynnikiem Ehrlicha. Aktywność oksydazową mieszaniny inkubacyjnej ceruloplazminy i serotoniny sprawdzano w czasie $t = 0$ i po 120 min.

WYNIKI BADAŃ WŁASNYCH

A. Preparatyka i oczyszczanie ceruloplazminy

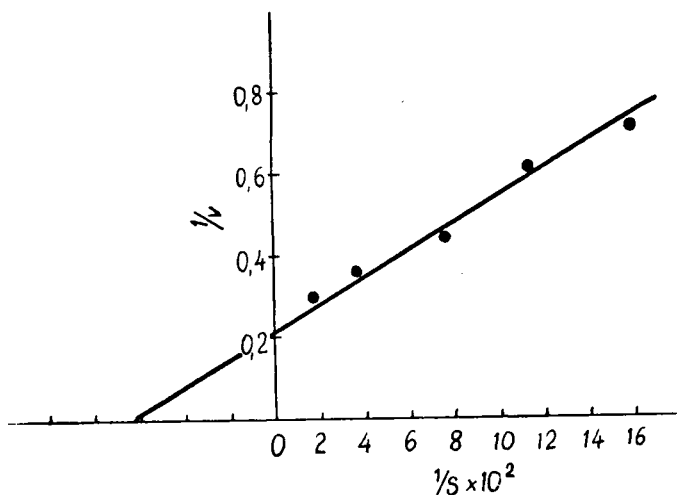
Preparatykę ceruloplazminy przeprowadzono w oparciu o metodę Holmberga i Laurella (8) i własne modyfikacje. Modyfikacje własne polegały na pominięciu w toku preparatyki: 1) izoelektrycznego frakcjonowania przy pH 6,2, 2) frakcjonowania mieszaniną etanolu i chlo-

reformu (9:1 obj/obj) przy pH 5,5 oraz na wprowadzeniu w ostatniej fazie oczyszczania, 3) wysokonapięciowej elektroforezy kolumnowej w aparacie LKB 3340, 4) oczyszczania śladów jonów miedzi na żywicy cheleks — 100 (14) i 5) zagęszczania roztworów ceruloplazminy na sefadeksie G-25 (7). Dzięki wysokonapięciowej elektroforezie kolumnowej obecność hemoglobiny w surowicy nie wpływa na jakość uzyskiwanego preparatu. Metoda ta pozwala na dalsze 5-krotne oczyszczenie frakcji ceruloplazminy od towarzyszących jej białek balastowych (175 mg białka wprowadzonego do kolumny daje po elektroforezie 43 mg jednorodnego białka ceruloplazminy).

B. Charakterystyka elektroforetyczna preparatu

W warunkach elektroforezy bibułowej przy pH 5,6, 7,0, 8,4 i elektroforezy na żelu skrobiowym przy pH 7,3 i pH 8,6 — preparat końcowy wykazał obecność tylko jednej smugi świadczącej o jego jednorodności.

C. Stałe Michaelisa

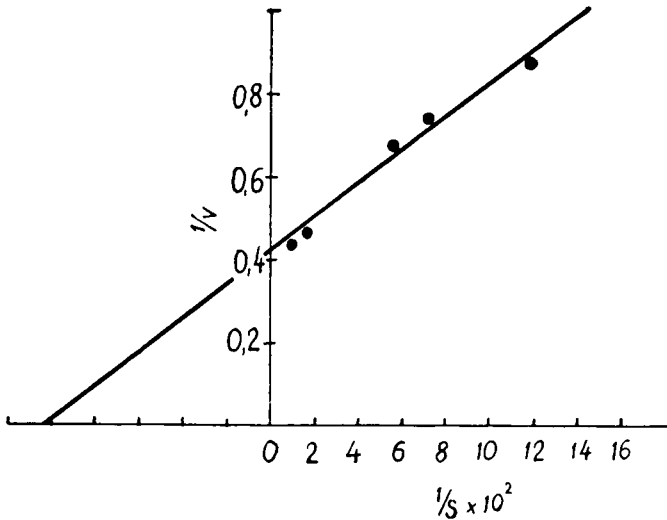


Ryc. 1. Krzywa enzymatyczna otrzymana metodą graficzną Lineweavera i Burka dla wyznaczenia stałej Michaelisa względem p-fenylendwuaminy. Mieszanina reakcyjna zawierała 200 μ M buforu octanowego o pH 5,2, 5 μ M chlorku sodu, 0,5 ml roztworu ceruloplazminy (0,122 μ g Cu/ml) i zmienne ilości p-fenylendwuaminy (S); ogólna objętość 3,2 ml. Szybkości początkowe reakcji (v) wyrażone w μ l O_2 /min w temp. 37°C

Enzymatic curve according to Lineweaver-Burk for the determination of the Michaelis constant for p-phenylenediamine. The reagent mixture contained; 200 μ moles of acetate buffer, pH 5.2, 5 μ moles of NaCl, 0.5 ml of ceruloplasmin (0.122 μ g Cu per ml) and variable amounts of p-phenylenediamine (S); total volume 3.2 ml. Initial velocities (v) are expressed in μ l O_2 per min. at 37°.

Stała Michaelisa dla ceruloplazminy względem p-fenyldwuaminy wyniosła $1,5 \cdot 10^{-3}$ M, a względem kwasu l-askorbinowego $9,5 \cdot 10^{-4}$ M przy pH 5,2 (ryc. 1 i 2).

Preparat ceruloplazminy wykazuje własności oksydazy również i dla kwasu askorbinowego. Kwas cytrynowy jest zarówno inhibitorem kompetycyjnym w stosunku do p-fenylenodwuaminy, jak i kwasu askorbinowego.

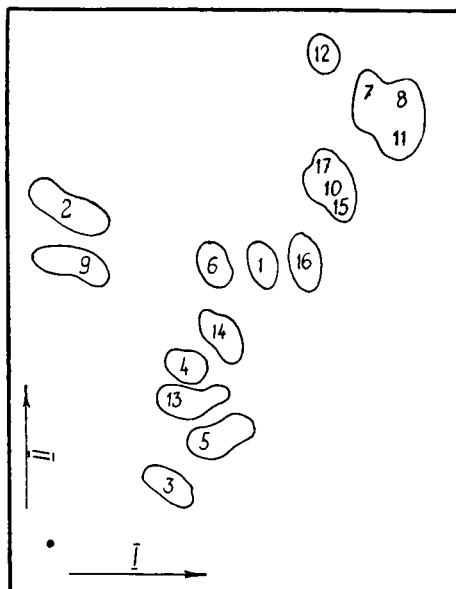


Ryc. 2. Krzywa enzymatyczna otrzymana metodą graficzną Lineweavera i Burka dla wyznaczenia stałej Michaelisa względem kwasu l-askorbinowego. Warunki, z wyjątkiem zmiennych ilości kwasu l-askorbinowego, jak w opisie ryc. 1
 Enzymatic curve according to Lineweaver-Burk for the determination of the Michaelis constant for l-ascorbic acid. Experimental conditions as described in Fig. 1. except for variable amounts of l-ascorbic acid.

D. Jakościowy skład aminokwasowy ceruloplazminy

W hydrolizacie kwasowym preparatu ceruloplazminy zidentyfikowano w wyniku przeprowadzenia dwukierunkowej chromatografii bibułowej, elektrochromatografii i dwukierunkowej chromatografii DNP-aminokwasów ogółem 18 aminokwasów: Ala, Arg, Asp, Cys, Gli, Glu, His, Fen, Ileu, Leu, Liz, Met, Pro, Ser, Tre, Try, Tyr i Wal. (ryc. 3). Aminokwasy nie rozdzielone metodą dwukierunkowej chromatografii wstępującej: Fen, Ileu, Leu, Met, Try i Wal zidentyfikowano dwukierunkową chromatografią DNP-aminokwasów i elektrochromatografią

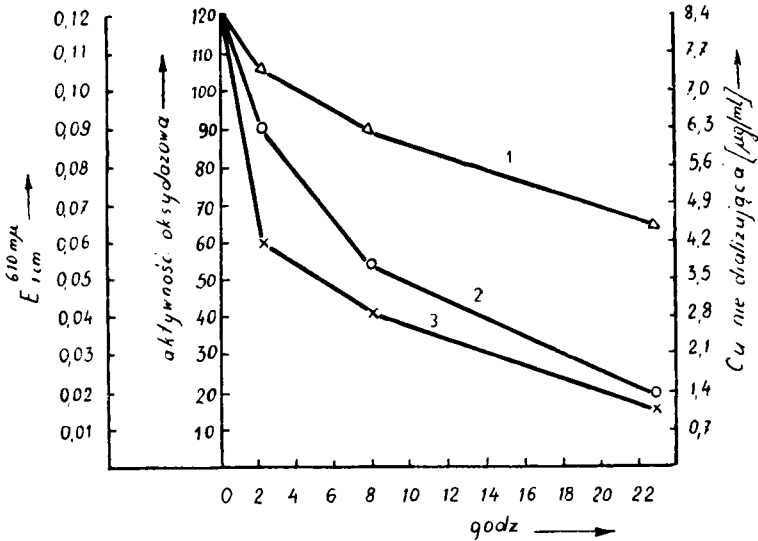
z zastosowaniem chromatografii w układzie: n-butanol — kwas octowy — woda (4:1:1 obj/obj). Cystynę wykryto w preparacie nie hydrolizowanym przez ogrzewanie z octanem ołowiwym w środowisku alkalicznym.



Ryc. 3. Chromatogram hydrolizatu ceruloplazminy otrzymany metodą dwukierunkowej chromatografii wstępującej w układach: I. propanol — woda (7:3) i II. fenol — woda (7:3). (1) Ala, (2) Arg, (3) Asp, (4) Gli, (5) Glu, (6) His, (7) Ileu, (8) Leu, (9) Liz, (10) Met, (11) Fen, (12) Pro, (13) Ser, (14) Tre, (15) Try, (16) Tyr, (17) Wal
 Chromatogram of the ceruloplasmin hydrolyzate obtained by two-dimensional ascending chromatography in the solvents: I. propan-1-ol-water (7:3 v/v) and II. phenol-water (7:3 v/v), (1) Ala, (2) Arg, (3) Asp, (4) Gly, (5) Glu, (6) His, (7) Ileu, (8) Leu, (9) Lys, (10) Met, (11) Phe, (12) Pro, (13) Ser, (14) Thr, (15) Trp, (16) Tyr, (17) Val

E. Udział miedzi w aktywności enzymatycznej ceruloplazminy

Przedłużone trawienie ceruloplazminy α -chymotrypsyną powodowało całkowity zanik niebieskiej barwy preparatu i aktywności oksydazowej. Miedź nie usunięta z trawionej ceruloplazminy na drodze dializy względem 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7 (tzw. miedź nie dializująca) stanowiła połowę zawartości miedzi przed trawieniem. Wyniki doświadczeń wskazują na niejednakowy sposób powiązania atomów miedzi w cząsteczce ceruloplazminy, a mianowicie, że z 8 atomów miedzi w ceruloplazminie 4 atomy są powiązane z tą częścią apoenzymu, która jest atakowana przez α -chymotrypsynę (ryc. 4).



Ryc. 4. Graficzna ilustracja hydrolizy enzymatycznej ceruloplazminy α -chymotrypsyną w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,5. Objasnienia: 1 — miedź nie dializująca w czasie trawienia, 2 — wartości ekstynkcji przy 610 m μ mieszaniny inkubacyjnej, 3 — aktywność oksydazowa ceruloplazminy

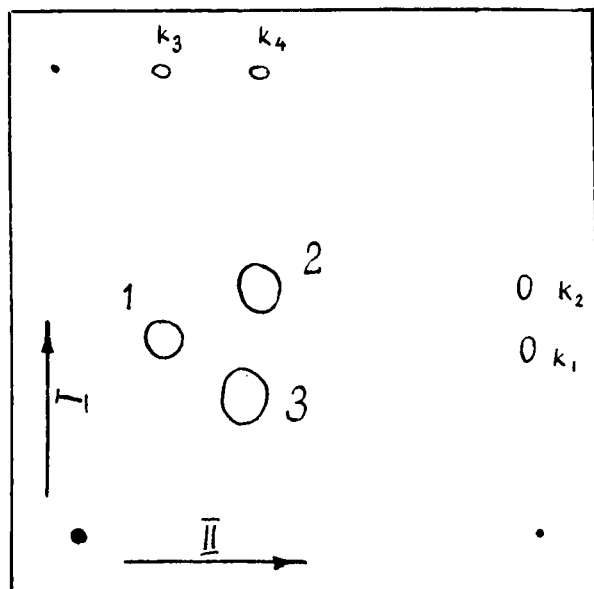
The pattern of enzymatic hydrolysis of ceruloplasmin by α -chymotrypsin in 0.05 M-K-phosphate buffer, pH 7.5. 1 — Non-dialyzable copper during digestion, 2 — Extinction values of incubation mixture at 610 m μ , 3 — Ceruloplasmin oxidase activity

F. Wzajemny wpływ ceruloplazminy i serotoniny

W wyniku doświadczeń ustalono, że ceruloplazmina powoduje przekształcenie serotoniny z wytworzeniem nowego związku indolowego wykrywalnego na chromatogramach w postaci plamki. W czasie inkubacji ceruloplazminy z serotoniną nie stwierdzono wpływu hamującego serotoniny na aktywność oksydazową ceruloplazminy (ryc. 5).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W opracowaniu preparatyki ceruloplazminy przyjęto schemat Holmberga i Laurella (8) z uwagi na dostępność materiału wyjściowego i nieskomplikowany przebieg postępowania. Preparat ceruloplazminy otrzymany wg oryginalnej metody Holmberga i Laurella wykazał podczas elektroforezy bibułowej przy pH 8,4 obecność trzech, a przy pH 5,6 i pH 7,0 — dwóch smug odpowiadających frakcjom białkowym. Poszukując rozwiązań, które pozwoliłyby uzyskać jednorodny elektroforetycznie preparat ceruloplazminy postanowiono wprowadzić



Ryc. 5. Chromatogram cienkowarstwowy mieszaniny ceruloplazminy i serotoniny po 120 min. inkubacji. Mieszanina inkubacyjna zawierała około $1 \mu\text{M}$ ceruloplazminy i $100 \mu\text{M}$ serotoniny w 10 ml $0,1 \text{ M}$ buforu octanowego o pH 5,6. Nośnik żel krzemionkowy, czas inkubacji 120 min, temp. 37°C . Układy rozwijające: I. izopropanol, II. butanol. Wywoływalcz związków indolowych odczynnik Ehrlicha. Objasnienia: k_1, k_2 — plamki kontrolne serotoniny po rozwinięciu w I układzie, k_3, k_4 — plamki kontrolne serotoniny po rozwinięciu w II układzie, 1, 2 — plamki odpowiadające związkom indolowym utworzonym podczas inkubowania samej serotoniny w warunkach doświadczenia, i 3 — związek indolowy utworzony podczas inkubacji serotoniny z ceruloplazminą

Thin-layer chromatogram of the mixture of ceruloplasmin and serotonin after 120 minutes of incubation. Incubation mixture contained approximately $1 \mu\text{mole}$ of ceruloplasmin and $100 \mu\text{moles}$ of serotonin in the total volume of 10 ml of 0.1 M acetate buffer, pH 5.6. Supporting medium silica gel, incubation time — 120 minutes, temperature 37° . Solvents: I. iso-propanol, II. butanol. The Ehrlich reagent was employed for detecting indol compounds. k_1, k_2 — the control spots of serotonin after development in solvent I, k_3, k_4 — the control spots of serotonin after development in solvent II, 1, 2 — the indol compounds spots found during the incubation of serotonin only, and 3 — an indol compound found during the incubation of the mixture of serotonin and ceruloplasmin

modyfikacje, dotyczące uproszczeń w schemacie frakcjonowania surowicy jak i zmiany sposobu oczyszczenia w ostatniej fazie. W miejsce eliminowanych ze schematu pierwotnego izoelektrycznego frakcjonowania przy pH 6,2 i dalszego frakcjonowania mieszaniną etanolo-chloroformową przy pH 5,5 wprowadzono elektroforezę kolumnową, adaptując dobór nośnika, buforu i napięcia prądu do własnych potrzeb.

Wyniki pomiarów kinetycznych potwierdziły pogląd innych autorów (17) o charakterze enzymatycznym ceruloplazminy (oksydazy) w odniesieniu do podlegającego dyskusji kwasu askorbinowego jako substratu. Potwierdzono również pogląd, że kwas cytrynowy jest naturalnym inhibitorem ceruloplazminy (16). Wyznaczona stała Michaelisa metodą manometryczną dla substratu p-fenylenodwuaminy $1,5 \cdot 10^{-3}$ M jest zgodna z danymi innych autorów (8, 10), natomiast stała Michaelisa dla kwasu askorbinowego $9,5 \cdot 10^{-4}$ M jest o jeden rząd wielkości wyższa od danych O s a k i i w s p. ($1,3 \cdot 10^{-5}$ M). Autorzy ci (17) stosowali w pomiarach kinetycznych neokupreinę znoszącą hamujący wpływ jonów miedzi, które mogłyby zostać uwolnione z ceruloplazminy w warunkach pomiaru. W doświadczeniach własnych eliminowano wpływ jonów miedzi pochodzenia zewnętrznego, stosując oczyszczenie na kolumnie wypełnionej żywicą cheleks — 100.

W piśmiennictwie nie znaleziono wzmianek na temat składu aminokwasowego ceruloplazminy zwierzęcej. Skład jakościowy i ilościowy ceruloplazminy ludzkiej podali K a s p e r i D e u t s c h (9). Skład aminokwasowy własnego preparatu ceruloplazminy zwierzęcej zbadano jakościowo na drodze zróżnicowanych technik chromatografii bibułowej. Na podstawie wyników własnych i danych z piśmiennictwa (9) należy przyjąć, że ceruloplazmina zwierzęca (wieprzowa) odpowiada pod względem składu aminokwasowego ludzkiej (18 aminokwasów).

Badania nad strukturą miedzioproteidową ceruloplazminy prowadzono w oparciu o metodę enzymatycznej hydrolizy α -chymotrypsyną stosowaną już przez C u r z o n a (4) do ceruloplazminy ludzkiej. Mimo przedłużonego trawienia do kilkudziesięciu godzin odszczepia się tylko 50% miedzi zawartej w preparacie, co odpowiada 4 atomom w stosunku do 8 atomów zawartych w ceruloplazminie. Należy przypuszczać, że α -chymotrypsyna rozbija wiązania peptydowe w centrach aktywnych, a nie narusza wiązań pozostałych 4 atomów miedzi, które nie ulegają odszczepieniu.

Zagadnienie wzajemnego wpływu między ceruloplazminą a serotoniną badane przez wielu autorów (5, 13) stanowi jeszcze temat do dyskusji. Według wcześniejszych poglądów (20) serotonina utlenia się w ustroju pod wpływem oksydazy monoaminowej (EC 1.4.5.4) do kwasu 5-hydroksyindoliloctowego. Według Y a m a d y i w s p. (23) serotonina nie jest substratem dla oksydazy monoaminowej. W doświadczeniach własnych potwierdzono rozkład serotoniny pod wpływem ceruloplazminy (13), przy czym wykazano na chromatogramach powstanie nowego związku indolowego. Wykazano ponadto, że serotonina nie hamuje aktywności ceruloplazminy podczas inkubacji w 0,1 M buforze octanowym o pH 5,6.

PIŚMIENNICTWO

1. Batelli F., Stern L. S.: *Biochem. Z.* **46**, 317, 1912.
2. Bearn A. G., Kunkel H. G.: *Jour. Clin. Invest.* **31**, 442—448, 1952.
3. Burck H. C.: *Mikrochim. Acta* **2**, 200—203, 1960.
4. Curzon G.: *Nature* **181**, 115—116, 1958.
5. Curzon G.: *Biochem. J.* **79**, 656—663, 1961.
6. Fischl J., Segal S.: *Clin. Chim. Acta* **8**, 479—486, 1963.
7. Flodin P., Gelotte B., Porath J.: *Nature* **188**, 493—494, 1960.
8. Holmberg C. G., Laurell C. B.: *Acta Chem. Scand.* **2**, 550—556, 1948.
9. Kasper C. B., Deutsch H. F.: *J. Biol. Chem.* **238**, 2325—2338, 1963.
10. Levine W. G., Peisach J.: *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 602—614, 1963.
11. Lineweaver H., Burk D.: *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658—666, 1934.
12. Lowry D. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
13. Martin G. M., Benditt E. P., Erikson N.: *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 208—217, 1960.
14. Morell A. G., Aisen P., Scheinberg J. H.: *J. Biol. Chem.* **237**, 3455—3457, 1962.
15. Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H.: *Post. Biochem.* **11**, 211—224, 1965.
16. Osaki S., Dermott J. A., Frieden E.: *J. Biol. Chem.* **239**, PC364, 1964.
17. Osaki S., Dermott J. A., Frieden E.: *J. Biol. Chem.* **239**, 3570—3575, 1964.
18. Peterson R. E., Bollier M. E.: *Anal. Chem.* **27**, 1195—1197, 1955.
19. Rice E. W.: *Clin. Chim. Acta* **5**, 632—636, 1960.
20. Sjoerdsma A., Smith T. E., Stevenson T. D., Udenfriend S.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. N. Y.* **89**, 36—39, 1955.
21. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.: *Manometric Techniques*, vol. 15 Burgees Publ. Co, Minneapolis 1957.
22. Walz D., Fahmy A. R., Pataki G., Niederwieser A., Bromer M.: *Experientia* **19**, 213—217, 1963.
23. Yamada H., Gee P., Ebata M., Yasunobu X.: *Biochim. Biophys. Acta* **81**, 165—171, 1964.

Pracę otrzymano 16 IV 1966.

Получение и свойства церулоплазмина

Резюме

Автором разработан способ получения и очищения церулоплазмина из сыворотки свиней, включающий фракционирование насыщенным серноокислым аммонием, холодным этанолом, смесью хлороформа и этанола (1 : 9) при pH 6,5, а также при помощи колонки электрофореза высокого напряжения в аппарате LKB-3340 (Швеция).

Получен препарат, гомогенность которого установлена электрофорезом на крахмальном геле при рН 7,3 и 8,6, отношение Cu/N в препарате равнялось 0,0225, константы Михелиса — $1,5 \cdot 10^{-3}$ (субстрат *p*-фенилдиамин) и $9,5 \cdot 10^{-4}$ (субстрат 1-аскорбиновая кислота) при рН 5,2 и температуре 37°C. В препарате хроматографически идентифицировано 18 аминокислот.

Результаты определений в энзиматическом гидролизе при помощи α -химотриспина с оксидазовой активностью, абсорбцией при 610 м μ и меди, не подвергшейся диализу, подсказывают, что в оксидазовой активности принимают участие 4 лабильных атома меди. Во время инкубации препарата с серотином обнаружено разложение серотонина без дезактивизации церулоплазмينا.

Рис. 1. Энзиматическая кривая, полученная по графическому методу Lineweaver'a и Burk'a, для определения константы Михелиса по отношению к *p*-фенилдиамину, реакционная смесь содержала 200 μ М уксуснокислого буфера с рН 5,2, 5 μ М хлорида натрия, 0,5 мл раствора церулоплазмينا (0,122 мг Cu /мл) и непостоянного количества *p*-фенилдиамин (*S*); общий объем 3,2 мл. Начальные скорости реакции (*v*), выраженные в мл O_2 /мин при температуре 37°C и рН 5,6.

Рис. 2. Энзиматическая кривая, полученная по методу Lineweaver'a и Burk'a, для определения константы Михелиса по отношению к 1-аскорбиновой кислоте. Условия, за исключением непостоянных количеств 1-аскорбиновой кислоты, как на рис. 1.

Рис. 3. Хроматограмма гидролиза церулоплазмينا, полученная по методу двунаправленной хроматографии, выступающая в системах: I — пропанол — вода (7 : 3) и II — фенол — вода (7 : 3). 1 — аланин, 2 — аргинин, 3 — аспарагиновая кислота, 4 — глицин, 5 — глутаминовая кислота, 6 — гистидин, 7 — изолейцин, 8 — лейцин, 9 — лизин, 10 — метионин, 11 — фенилаланин, 12 — пролин, 13 — серин, 14 — треонин, 15 — триптофан, 16 — пирозин, 17 — валин.

Рис. 4. График энзиматического гидролиза церулоплазмينا под действием α -химотриспина в 0,05 м фосфорном буфере с рН 7,5.

- 1 — не подвергнутая диализу медь во время пищеварения,
- 2 — экстинкция при 610 м μ инкубационной смеси,
- 3 — оксидазовая активность церулоплазмины.

Рис. 5. Тонкослойная хроматограмма смеси церулоплазмينا и серотонина спустя 120 мин. после инкубации. Инкубационная смесь содержала около 1 μ М церулоплазмينا и 100 μ М серотонина в 10 мл 0,1 М уксусного буфера с рН 5,6. Рецептор геля кремнезема, время инкубации 120 мин., температура 37°C. Развивающиеся системы: I — изопропанол, II — бутанол. Проявитель соединений индола — реактив Эрлиха. K_1 , K_3 — контрольные пятна серотонина после развития в I системе; K_2 , K_4 — контрольные пятна серотонина после развития во II системе; 1, 2 — пятна, соответствующие соединениям индола, образованным во время инкубирования лишь одного серотонина в условиях эксперимента; 3 — соединение индола, образованное во время инкубации серотонина с церулоплазмином.

The Isolation of Ceruloplasmin and Investigation of Its Properties

Summary

The paper deals with the method of isolation and purification of ceruloplasmin from the plasma of pigs. The method includes fractionation with saturated ammonium sulphate, cold ethanol, a mixture of chloroform and ethanol (1:9) at pH 6.5, and a high-voltage column electrophoresis in the apparatus LKB 3340 (Sweden). A preparation was obtained the homogeneity of which was found by electrophoresis on starch gel at pH 7.3 and 8.6. The Cu/N ratio in the preparation was 0.0225. Michaelis's constants were $1.5 \cdot 10^{-3}$ M (p-phenylenediamine substrate) and $9.5 \cdot 10^{-4}$ M (1-ascorbic acid substrate), at pH 5.2 and at a temperature of 37°C. Eighteen amino acids have been identified in this preparation by chromatography. The results of determinations, with α -chymotrypsin in enzymatic hydrolyzate, of the oxidase activity, absorption at 610 m μ and non-dialyzing copper, suggest that 4 labile atoms of copper take part in the oxidase activity. During the incubation of the author's own preparation with serotonin, the decomposition of the serotonin without the inactivation of ceruloplasmin was noted.

