

## Die Isolierung von Meerrettichperoxydase

K. G. PAUL

*Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska avdelningen, Stockholm, Schweden*

Eine vereinfachte Methode zur Isolierung von Meerrettichperoxydase wird beschrieben. Die Ausbeute an Aktivität, mit der Mesidinmethode gemessen, ist höher als 40 % des Rohauszuges. Durch Chromatographie auf Karboxymethylzellulose kann das Enzym in vier Komponenten aufgetrennt werden.

Meerrettichperoxydase (MRP) interessiert als Häminprotein und ist auch ein praktisch verwendbares Mittel für gewisse Oxydationen. Sie wird ebenfalls als zuverlässige Vergleichsubstanz benutzt, wenn man vor der Frage steht, ob ein beobachteter Stoffwechselvorgang möglicherweise durch Peroxydase katalysiert werden kann. In diesen Fällen und für die Aufklärung des Peroxydasemechanismus ist es notwendig, reinste Enzympräparate zu verwenden. So fanden z.B. Paul und Avi-Dor<sup>1</sup> in Versuchen über Harnsäureoxydation, dass Allantoin nicht nachzuweisen war, wenn MRP, die etwa 1 % Hämin enthielt, verwendet wurde. Der Nachweis gelang nur mit der kristallisierten Peroxydase mit 1.26 % Hämin.

MRP wurde zum erstenmal von Theorell<sup>2</sup> kristallisiert. Diese Methode ist jedoch etwas mühsam, und verschiedene Autoren<sup>3-5</sup> haben andere Darstellungsverfahren angegeben, die vom Verfasser nachgeprüft wurden. Die Ergebnisse gehen aus dem folgenden hervor.

### METHODEN UND MATERIALIEN

Die Aktivitätsbestimmungen wurden nach der Mesidinmethode<sup>6</sup> ausgeführt. Die unten in Molen angegebenen Peroxydasemengen sind also auf ältere Aktivitätsbestimmungen mit "reinen" Präparaten bezogen. Die Guajacolmethode<sup>7</sup> wurde ebenfalls versucht, erwies sich aber in den ersten Stufen der Reinigung ebensowenig zuverlässig wie die Purpurogallinmethode — Ausbeuten über 100 % kamen vor. Mit steigender Reinheit der Peroxydase normalisierten sich die Ausbeuten. Man sieht bei den Aktivitätsbestimmungen an Rohauszügen, dass die zunächst auftretende Farbe bald verschwindet; dies kann nicht die Folge einer Peroxydasehemmung sein, offenbar findet auch eine Entfärbung des Oxydationsproduktes durch die Verunreinigungen in den Rohauszügen statt.

Bei den Häminbestimmungen<sup>8</sup> wurde der Wert  $\beta = 8,0 \times 10^7 \text{ cm}^2 \times \text{Mole}^{-1}$  für den molaren Absorptionskoeffizienten des  $\alpha$ -Bandes des Pyridinhämochromogens benutzt\*.

$$* \beta = \frac{1}{c} \times \frac{1}{d} \times \ln \frac{I_0}{I} \quad \text{wo } \begin{array}{l} c = \text{Konzentration in Molen pro cm}^3, \\ d = \text{Schichtdicke der Küvette in cm.} \end{array}$$

Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurde 6 Std auf 105° und zur Aschenbestimmung 1 Std auf 500°C erhitzt.

Das Verhältnis  $Q$  zwischen den Extinktionen bei 403  $m\mu$  (Maximum der Häminkomplexe) und etwa 280  $m\mu$  (Maximum der Eiweisskomplexe) wurde ebenfalls bestimmt. Die zu untersuchende Lösung wurde, wenn nötig, mit 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7 verdünnt.

## ARBEITSGANG

### 1. Extraktion und erste Ammoniumsulfatfällung

Fein zerteilter Meerrettich (26,2 kg) wurde zweimal mit 39,3 und einmal mit 19,7 l destilliertem Wasser, jedesmal wenigstens vier Stunden unter gelegentlichem Umrühren oder über Nacht, bei Zimmertemperatur extrahiert. Die Extrakte wurden vom Rückstand mittels Gaze getrennt und ohne weitere Behandlung bis auf etwa das halbe Volumen in Vacuum eingeeengt. Der scharfe Meerrettichgeruch verschwand dabei. Der Extrakt wurde in Glaszylindern im Kältezimmer einige Stunden oder über Nacht stehengelassen. Die Flüssigkeit, die noch trübe, aber von grossen Partikeln frei war, wurde abgehebert, der Bodensatz mit etwas Wasser ausgewaschen und zentrifugiert. Die vereinigten Lösungen wurden mit Ammoniumsulfat auf 40 %-ige Sättigung gebracht (230 g Ammoniumsulfat pro Liter Flüssigkeit, +4°C). Der Niederschlag, der nur wenig Aktivität enthielt, wurde abzentrifugiert und ohne erneute Extraktion verworfen. Das Gesamtvolumen des nicht ganz klaren Extraktes war dann 39,6 l. Nach der Aktivitätsbestimmung enthielt es 30,0  $\mu$ Mole MRP.

Die Beobachtung<sup>3,9</sup>, dass die Menge einer mit Wasser extrahierbaren Substanz, wahrscheinlich von Kohlenhydratnatur, mit der Jahreszeit schwankt, wurde bestätigt; die Schwierigkeiten, die mit der Aufarbeitung von herbstgeernteten Wurzeln verknüpft sind, wurden jedoch durch die zweistufige Ammoniumsulfatbehandlung (2. Stufe, siehe unten) beseitigt. Bei unmittelbarer Sättigung des Rohextraktes mit Ammoniumsulfat fällt zwar MRP aus, die Trennung des Niederschlags und der Mutterlauge ist aber schwierig, was auch bei den früheren Methoden anscheinend der Fall war.

Die Behandlung des Rohextraktes mit Alkohol-Chloroform<sup>4</sup> wurde zweimal versucht. Es wurden keine Verluste beobachtet (Ausbeute 98 und 104 %, Mesidinmethode), der Reinigungseffekt war aber mässig (1,22 und 1,18). Diese Behandlung wurde daher nicht weiter ausgeführt.

Ein aus praktischen Gründen wichtiger Befund war, dass die Dauer der Extraktion kritisch ist. Bei der kürzeren Extraktionszeit von z.B. dreimal dreissig Minuten ist zwar die Ausbeute an Peroxydaseaktivität fast unverändert, aber der Niederschlag nach dem zweiten Alkoholzusatz (siehe unten) kann nur mit Schwierigkeit in Lösung gebracht werden. Die darauf folgende Ammoniumsulfatfällung gibt einen sehr klebrigen Niederschlag, was auch von Keilin und Hartree<sup>3</sup> gefunden wurde. Die Behandlung mit Dowex-2 bewirkt nur eine unbedeutende Reinigung.

Während der Extraktion färbt sich allmählich der Meerrettichbrei graubraun. Extrakte aus solchen verfärbten Breien sind meistens leicht zu reinigen. Auch wenn ein Kausalitätszusammenhang zwischen der Verfärbung und der Leichtigkeit, mit der der Brei aufzuarbeiten ist, vielleicht nicht besteht, ist doch die "Reife" des Breies Voraussetzung für eine einfache Reindarstellung der Peroxydase.

Es ist zweckmässig, die Wurzeln während 2–4 Tagen in fliessendem Leitungswasser liegen zu lassen. Dadurch wird die Ausbeute erhöht und das Zerkleinern erleichtert. Physiologische Kochsalzlösung<sup>5</sup> als Extraktionsmittel für solche mit Wasser behandelte Wurzeln hat gegenüber dem Wasser keine besonderen Vorteile.

## 2. Ausfällung mit Ammoniumsulfat

Die 39,6 l MRP-Lösung, die schon an Ammoniumsulfat zu 40 % gesättigt war, wurden mit weiteren 12,0 kg Salz versetzt, wodurch 85 % Sättigung erreicht wurde. Der Niederschlag war leicht abzentrifugieren. Die völlig inaktive Mutterlauge wurde verworfen. Der Niederschlag wurde in etwas 0,01 M Phosphatpuffer von pH 7 aufgelöst und im Kältezimmer bis zur Sulfatfreiheit gegen Wasser dialysiert und weiter über Nacht gegen 0,04 M Acetatpuffer (K-Salz) von pH 5. Die MRP-Lösung wurde in der Kälte zentrifugiert und der graue Bodensatz einmal mit Acetatpuffer gewaschen. Die vereinigten Lösungen ergaben 1 210 ml, die 22  $\mu$ Mole MRP enthielten.  $Q = 0,21$ . Trockengewicht 13,3 und Asche 0,3 mg/ml.

Die Dialyse wurde die ganze Zeit über in ziemlich kleinen Glasgefäßen mit oft erneuertem Wasser durchgeführt, da rohe Peroxydasepräparate Zellophan angreifen, wodurch die Schläuche zerbrechlich werden. Zur Sicherheit wurde auch bei jeder Präparation nach einigen Stunden die Innenflüssigkeit in frische Schläuche übergeführt.

## 3. Alkoholfällung

Anderthalb Volumen (1,8 l) von 96 %-igem Aethylalkohol von  $-13^{\circ}\text{C}$  wurden langsam unter mechanischem Umrühren der eiskalten MRP-Lösung zugesetzt. Der graue Niederschlag wurde in der Kälte abzentrifugiert, in etwas Wasser aufgelöst, mit Alkohol umgefällt und der Niederschlag verworfen. Die vereinigten Lösungen wurden mit 2,5 Volumen kaltem Alkohol (3,2 l) versetzt. Der braune MRP-Niederschlag wurde auf der Zentrifuge gesammelt, in einer minimalen Menge Wasser aufgelöst und gegen Wasser dialysiert. Nach zwei Tagen wurde die Lösung scharf zentrifugiert, der graue Niederschlag mit etwas Wasser gewaschen und verworfen. Das Volumen der MRP-Lösung war dann 147 ml mit einem Trockengewicht von 11,30, Asche 0,50 und Hämin 0,090 mg pro ml. Die Gesamtmenge MRP betrug nach der Aktivitätsmessung 21,0 nach dem Hämingehalt 20,4  $\mu$ Mole.  $Q = 1,72$ . Die Lösung wurde durch Gefriertrocknung auf etwa 50 ml konzentriert.

Nach der Alkoholbehandlung wurden Schwankungen im Reinheitsgrad von  $Q = 0,9-1,7$  und im Hämingehalt von 0,53–0,80 % in verschiedenen Präparationen gefunden. Es ist gelegentlich notwendig, einige Tropfen gesättigter KCl-Lösung zuzusetzen, um die Koagulation des Kolloids nach dem zweiten Alkoholzusatz zu beschleunigen.

Die Abtrennung des Niederschlags nach dem zweiten Alkoholzusatz kann bei grossen Mengen von Meerrettich zeitraubend werden. Das folgende Verfahren kann dabei benutzt werden. Die MRP-Lösung, die mit 0,04 M Acetatpuffer von pH 5 im Gleichgewicht steht, wird wie oben beschrieben mit 1,5 Volumen Alkohol versetzt und der Niederschlag abzentrifugiert. MRP in der Mutterlauge wird dann auf Karboxymethylzellulose (siehe unten) adsorbiert, entweder durch Rühren oder in einer Säule. MRP wird mit 0,1 M Acetatpuffer von pH 5 in Abwesenheit von Alkohol eluiert. Die Wahl zwischen dem erstgenannten Verfahren mit vier Volumen Alkohol und der Zellulosemethode wird von den zugänglichen Zentrifugen bestimmt. Der erste Weg wird vom Verfasser empfohlen.

## 4. Behandlung mit Anionenaustauscher

*Vorbehandlung des Ionenaustauschers.* Käufliches "Dowex-2, 8–10 % cross linking, 200–400 mesh", wurde mit dem zehnfachen Volumen von etwa molarer Salzsäure bis zum Aufhören der Gasentwicklung (etwa 24 Std) gerührt,

Tabelle 1. Reinigung der Meerrettichperoxydase mit Dowex 2. Für Einzelheiten siehe Text.

Fraktion	Volumen ml	Q	% vom Ansatz nach der Lichtabsorption bei 403 m $\mu$
I 1	22	2,45	41
I 2	42	2,49	46
I 3	7	2,21	10
			<hr/> 97
II 1	26	2,48	78
II 2	19	2,18	15
II 3	12	1,87	2
			<hr/> 95
III 1	32	2,62	4
III 2	35	2,68	78
III 3	19	2,47	14
III 4	23	1,83	4
			<hr/> 100

mehrmals mit Wasser gewaschen, abgenutzt und endlich in 0,05 M Tris HCl-Puffer von pH 8,6 aufgerührt. Das Chromatographierohr wird mit Puffer beschickt, die Austauschersuspension eingegossen und die Säule bis zum pH-Gleichgewicht mit dem Puffer gewaschen.

Dieselbe Säule kann mehrmals benutzt werden, wenn sie mit dem Puffer jedesmal nach der Verwendung bis zur Lichtabsorptionsfreiheit bei 280 m $\mu$  gewaschen wird. Es ist jedoch vorzuziehen vor dem Waschen das oberste Zehntel der Säule zu entfernen und die entsprechende Menge frischer Dowex einzufüllen.

Die MRP-Lösung wurde mit dem Tris-Puffer ohne Dialyse auf 147 ml verdünnt und in drei Portionen (I 50, II 50, III 47 ml) durch eine Säule (60  $\times$  2,7 cm) von Dowex-2 mit einer Geschwindigkeit von 22—26 ml pro Stunde filtriert. Fraktionen wurden manuell gesammelt, wenn sich das Eluat braun zu färben begann (Tabelle 1). Die Fraktionen I 1—2, II 1—2 und III 1—3 wurden vereinigt. Das Gesamtvolumen war nach dem Waschen 201 ml mit Q 2,56. Nach der Aktivitätsbestimmung enthielt die Lösung 17,2  $\mu$ Mole MRP.

Die Bedingungen für die Reinigung der Peroxydase mittels Dowex-2 sind nicht kritisch. Der Puffer kann innerhalb der Grenzen 0,02—0,10 M Tris und pH 7,6—8,6 variieren. Die Präparatmenge kann ohne Verschlechterung des Q-Werts hoch gehalten werden (<2 mg pro cm<sup>3</sup> der Säule), ebenso die Durchlaufgeschwindigkeit (<5 ml pro cm<sup>2</sup>/Stunde). Bei grösseren Ansätzen oder schnellerem Filtrieren werden zwar die Begleitpigmente zurückgehalten, eine farblose Verunreinigung wird aber nicht entfernt.

##### 5. Ammoniumsulfatfällung

182 ml der obengenannten Lösung wurden mit festem Ammoniumsulfat versetzt (41,8 g, 40 % Sättigung). Ein kleiner, jedoch inaktiver Niederschlag wurde auf der Zentrifuge abgeschieden, und die Mutterlauge mit 69,2 g Ammonium-

sulfat versetzt (88% Sättigung). Nach einigen Stunden im Kühlschrank wurde scharf zentrifugiert, die Peroxydase in 0,01 M Phosphatpuffer von pH 7 aufgelöst und gegen Wasser einige Tage lang dialysiert.

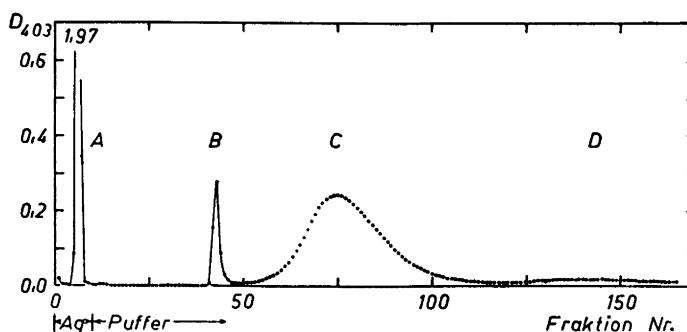
*Analyse:* Volumen 18,5 ml,  $Q$  3,03. Trockengewicht 33,80 mg, Asche 0,05 mg, Hämin 0,404 mg und Eisen 33,4  $\mu\text{g}$ , alles pro ml. Der Stickstoffgehalt war 13,3 %. Die Aktivitätsbestimmung gab die Gesamtmenge von 10,5  $\mu\text{Molen}$  MRP\*.

Bei vorsichtigem Zusatz von Ammoniumsulfat kristallisiert MRP zum Teil. Es ist aber zu empfehlen, die Peroxydase mittels Ammoniumsulfat quantitativ auszufällen und in diesem Zustand in geschlossenen Gefässen im Eisschrank aufzubewahren. Die Aktivität bleibt dabei jahrelang nahezu unverändert, und die Peroxydase kann bei Bedarf weitergereinigt werden.

## 6. Chromatographie auf Karboxymethylzellulose (CMC)

*Vorbehandlung des Ionenaustauschers.* Zellulose ("Whatman cellulose powder, standard grade"), die nach Peterson und Sober<sup>10</sup> karboxyliert ist, wird mit Puffer (30 ml 1 M Essigsäure + 15 ml 1 M NaOH + Wasser auf 1 l) im Kältezimmer bis zum Gleichgewicht gerührt. Das Rohr wird mit Puffer gefüllt, die Karboxymethylzellulose eingegeben, und man lässt sie ohne Druck bis zu konstantem Volumen sedimentieren. Danach wird die Säule einige Stunden lang mit kaltem Wasser gewaschen.

Grössere Ansätze als 8 mg Substanz pro  $\text{cm}^3$  Säule wurden nicht untersucht, wählt man jedoch Mengen bis zu dieser Konzentration, so werden die Chromatogramme identisch. Fig. 1 zeigt ein Beispiel für das Verfahren. Die gegen Wasser dialysierte MRP-Lösung wird verwendet, und man beginnt die



*Fig. 1.* Chromatographie von Meerrettichperoxydase auf Karboxymethylzellulose. Ausgangsmaterial: 0,50 ml einer gegen Wasser dialysierten Lösung mit  $\log(I_0/I) = 29,5$  bei 403  $\text{m}\mu$ ,  $Q = 2,44$ . Ansatz etwa 8 mg. Säule  $210 \times 9$  mm. Durchlaufgeschwindigkeit 5,9 ml pro  $\text{cm}^2$  pro Stunde. 20 Min. pro Fraktion. Sämtliche Fraktionen ohne Verdünnung in Beckman DU-Spektrophotometer gemessen.

\* Wegen Unfall ging hier in dieser Preparation etwa ein Drittel verloren. Diese Stufe ist sonst praktisch ohne Verluste.

Tabelle 2. Analysen der vier Meerrettichperoxydasen.

	A	B	C	D
Hämin <sup>1</sup>	1,04	1,28	1,44	1,36
Asche <sup>2</sup>	7,1	2,9	1,8	2,4
Stickstoff <sup>1</sup>	11,07	13,41	13,24	13,06
Q	3,53	2,92	3,31	3,13
Aktivität nach der Guaiacolprobe <sup>3</sup>	0,019	0,080	0,075	0,077
der Mesidinprobe <sup>4</sup>	0,48	1,28	1,25	1,25

Elution mit Wasser. Etwa ein Viertel des Enzyms wird nicht zurückgehalten, wandert aber schnell abwärts. Diese Fraktion, als MRP A bezeichnet, wird gegen Wasser dialysiert und im gefrorenen Zustand getrocknet. Das Eluat bleibt dann farblos, und die MRP-Bande im obersten Teil der Säule bewegt sich nicht.

Das Chromatogramm wird dann mit dem oben beschriebenen Acetatpuffer weitereluiert, wobei drei Fraktionen MRP B, C und D erhalten werden. Sie werden gegen Wasser über Nacht dialysiert und danach, zwecks Konzentrierung, auf drei Säulen adsorbiert (wie oben CMC in Puffer, mit Wasser ausgewaschen). Diese Säulen können klein sein, z.B. für 500 mg MRP C in 1 200 ml 50 × 9 mm. Nach Adsorption und Waschen mit Wasser wird mit Acetatpuffer (30 ml 1 M Essigsäure + 20 ml 1 M NaOH + Wasser auf 1 l) eluiert, die Peroxydasen gegen Wasser dialysiert und endlich analysiert.

Die Aschenwerte sind auffallend hoch. MRP A und C wurden elektrophoretisch untersucht und zeigten dabei eine Verunreinigung, die noch bei pH 4.6 anodisch wanderte. Sie machte in A einen Drittel, in C weniger als zehn Prozent aus. Versuche, die saure Fraktion, die von Kohlenhydratnatur sein dürfte, chromatographisch, auch auf Dowex 2-Borat, abzutrennen, sind bisher nicht erfolgreich geworden. Es ist von Interesse, dass Paraperoxydase aus MRP A bei pH über 9, besonders in Boratbuffer, leicht gebildet wird, aus den anderen Peroxydasen aber nicht. Peroxydase und Paraperoxydase waren auf Dowex-2 bei pH 7, Phosphatpuffer, leicht zu trennen. Paraperoxydase bewegte sich dabei etwas langsamer.

Der Befund von Jermyn und Thomas<sup>11</sup> über die Uneinheitlichkeit der Meerrettichperoxydase ist somit bestätigt worden. Die vier Peroxydasen A, B, C und D werden am besten innerhalb der pH-Grenzen 4,2–4,9 getrennt. Bei niedrigerem pH bewegen sich C und D kaum, bei höherem pH wandern B, C und D als eine Fraktion. Wenn die Säule nicht mit Wasser gewaschen wird, bleibt A unverändert, B kommt aber als eine zwar gut begrenzte und fast symmetrische aber weit ausgedehnte Bande heraus.

Drei MRP-Präparationen aus herbstgeernteten Wurzeln gaben nahezu konstante Mengenverhältnisse zwischen den vier Peroxydasen und zwar verhielt sich A:B:C:D wie 2:1:4:1. Die relativen Q-Werte der vier Peroxydasen sind auch ziemlich konstant. A hat

<sup>1</sup> In % des aschefreien Trockengewichtes.

<sup>2</sup> In % des Gesamttrockengewichtes.

<sup>3</sup> In  $1/t \text{ min}^{-1}$ , wo  $t$  = Zeit für die Steigerung des  $D_{470}$  mit 0.050.  $6.9 \times 10^{-6} \mu\text{Mole}$  von MRP-Hämin in der Kuvette.

<sup>4</sup> In  $1/t \text{ min}^{-1}$ , wo  $t$  = die Zeit, in der  $D_{490} = 0.450$  erreicht wird.  $10^{-4} \mu\text{Mole}$  von MRP-Hämin in der Kuvette.

immer den höchsten und B den niedrigsten  $Q$ -Wert. Das Spektrum von A variiert stark mit dem pH und  $Q$ -Werte über 4,5 sind für Lösungen in Acetatpuffer beobachtet worden. Wenn die Zello-säule mit grossen Mengen beladen war, konnte zweimal eine kleine und sehr ausgedehnte, aber deutlich begrenzte Fraktion E beobachtet werden. Es wurde kein Versuch gemacht, sie zu isolieren.

Diese Arbeit wurde von *Statens naturvetenskapliga forskningsråd* unterstützt. Fräulein A. Hartkoorn sei sehr wertvolle Assistenz gedankt.

## LITERATUR

1. Paul, K. G. und Avi-Dor, Y. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 637.
2. Theorell, H. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **16 A** (1942) No. 2.
3. Keilin, D. und Hartree, E. F. *Biochem. J.* **49** (1951) 88.
4. Kenten, R. H. und Mann, P. J. G. *Biochem. J.* **57** (1954) 347.
5. Boman, H. G. und Westlund, L. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **64** (1956) 217.
6. Paul, K. G. und Avi-Dor, Y. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 649.
7. Georg, P. *J. Biol. Chem.* **201** (1953) 413.
8. Paul, K. G., Theorell, H. und Åkeson, Å. *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 1284.
9. Theorell, H. und Åkeson, Å. *Persönliche Mitteilung.*
10. Peterson, E. A. und Sober, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **78** (1956) 751.
11. Jermyn, M. A. und Thomas, R. *Biochem. J.* **56** (1954) 631.

Eingegangen am 4. Februar 1958.