



УДК 577.456.3.03

РЕАКТИВНЫЙ ЦЕНТР И НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕРМО- И КИСЛОТОСТАБИЛЬНОГО  
ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА И ХИМОТРИПСИНА  
ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРОЛИКА \*

Оглоблина О. Г., Якубовская Р. И., Платонова Л. В.,  
Паскина Т. С.

*Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Химической модификацией остатков лизина и аргинина показана принадлежность ТКСТИ к «аргининовому» классу ингибиторов. Полученные значения констант диссоциации комплексов ТКСТИ с трипсином ( $6 \cdot 10^{-10}$  М) и химоотрипсином ( $6 \cdot 10^{-6}$  М) свидетельствуют о более высокой специфичности взаимодействия ТКСТИ с трипсином. Исследования проведены с препаратом ТКСТИ, очищенным хроматографией фракции белков сыворотки крови кролика (0,3—0,55 насыщения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) на трипсино-сефарозе 4В с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-75. Коэффициент седиментации  $S_{20, w} = 2S$  согласуется с величиной молекулярного веса, установленной гель-фильтрацией на сефадексе G-75 и равной  $23\ 000 \pm 2000$ .

В последние годы усилился интерес к выделению и изучению свойств термо- и кислотостабильных белковых ингибиторов трипсина [КФ 3.4.4.4] [1—7]. К этой группе принадлежат описанные ранее термо- и кислотостабильные ингибиторы, обнаруженные в моче беременных женщин и сыворотке крови человека Аструпом (mingin) [1] и в моче беременных женщин Шульманом [2]. Прокш и Ройс [3] выделили термостабильный ингибитор трипсина из мочи беременных женщин, близкий по свойствам к ингибитору Шульмана. Хоштрассер и соавт. [4, 5] обнаружили два кислотостабильных ингибитора в секретах слизистой бронхов человека; несколько позднее эти же авторы [6] сообщили о выделении кислотостабильного ингибитора, присутствующего в плазме крови человека в мономерной и димерной формах. В сыворотке крови кролика был обнаружен термо- и кислотостабильный ингибитор трипсина [7—13]. Интерес к исследованию подобных ингибиторов не случаен, так как, по-видимому, они выполняют важную функцию защиты организма млекопитающих от некроза, вызываемого протеиназами лейкоцитов и, возможно, протеиназами микроорганизмов.

\* В работе приняты следующие обозначения и сокращения: ТКСТИ — термо- и кислотостабильный ингибитор трипсина и химоотрипсина из сыворотки крови кролика; БАЭЭ —  $\text{BzArgOEt}$ ; E — международная эстеразная единица активности ферментов, соответствующая количеству фермента, которое катализирует расщепление 1 мкмоль БАЭЭ в 1 мин в стандартных условиях; IE — международная ингибиторная единица, соответствующая количеству ингибитора, которое тормозит расщепление 1 мкмоль БАЭЭ в 1 мин в стандартных условиях.

## Выделение и очистка ТКСТИ хроматографией на трипсин-сефарозе 4В

Этапы очистки	Количество белка, ОЕ <sub>250</sub>	Активность		Выход, %		Степень очистки
		удельная ИЕ/ОЕ <sub>250</sub>	общая, ИЕ	по белку	по активности	
1. а) Сыворотка крови кролика (2 л), разбавленная дистиллированной водой (1:1)	120 000	0,025—0,03*	3600	100	100	1
б) Фракция 0,3—0,55 насыщения (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45 000	0,075	3350	37,6	93	2,5
в) Гель-фильтрация на сефадексе G-25	41 500	0,074	3060	34,5	85	2,5
г) Подкисление фракции 1 в до pH 5,0	41 500	0,064	2700	34,5	75	2,1
2. Хроматография фракции 1 г (1,5 л) на трипсин-сефарозе 4В (колонка 2,2 × 12 см)						
а) Фильтрат	32 300	0,01	323	27,0	9	—
б) 1-й элюат, 0,1 М натрий-ацетатный буфер (pH 5,0) (0,22 М NaCl и 0,01 М CaCl <sub>2</sub> )	1 080	0	0	0,9	0	—
в) 2-й элюат; 0,01 М HCl (1 М NaCl, 0,01 М CaCl <sub>2</sub> , 15%-ный изопропиловый спирт)	52 **	39—44	1870	0,043	52	1300—1700
г) Концентрирование на роторном испарителе при 37° и диализ против дистиллированной воды	50	39—44	1800	0,042	50	1300—1700
3. Гель-фильтрация на сефадексе G-75; 0,01 М ацетат аммония (pH 7,9) и лиофилизация	41	42—45	1500	0,03	42	1300—1700

\* Антириптическая активность сыворотки крови кролика, прогретой 1 ч при pH 5,0 и 50°.  
 \*\* D<sub>250</sub> 1 мг/мл очищенного ТКСТИ равно 1.

Настоящая работа посвящена разработке принципиально нового метода выделения ТКСТИ, уточнению значения константы ингибирования ( $K_i$ ) трипсина, определению  $K_i$  химотрипсина [КФ 3.4.4.5], а также выяснению природы реактивного центра ТКСТИ химической модификацией функциональных групп ингибитора.

В настоящей работе предложен менее трудоемкий и более эффективный, чем описанный ранее [8], метод выделения ТКСТИ, включающий в качестве основной стадии хроматографию на трипсин-сефарозе 4В [12]. Основные этапы выделения и очистки ТКСТИ этим методом представлены в табл. 1.

Сыворотку крови кролика разбавляли водой (1 : 1) и собирали фракцию белков, осаждающуюся (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 0,3—0,55 насыщения; эту фракцию освобождали от солей, подкисляли до pH 5,0 с целью инактивации незначительных примесей кислотолабильных ингибиторов и подвергали сорбции на трипсин-сефарозе 4В. ТКСТИ десорбировали 0,01 М соляной кислотой (pH 2), содержащей 1М NaCl, 0,01 М CaCl<sub>2</sub> и 15%-ный изопропиловый спирт (по объему). Низкое значение pH (~ 2) и высокая ионная сила элюирующей смеси способствуют ослаблению ионных связей ТКСТИ с иммобили-

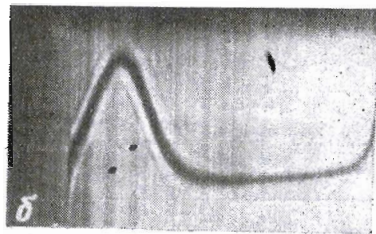


Рис. 1. Физико-химические характеристики препарата ТКСТИ: *а* — электрофореграмма [8] в 7,5%-ном полиакриламидном геле; трис-глициновый буфер, рН 8,3 (стрелка указывает на величину пробега бром-фенолового синего); *б* — седиментограмма, полученная на аналитической ультрацентрифуге «Spinco E»; 0,9%-ный раствор белка в 0,05 М трис-НСI буфере (рН 8,0), 18°, скорость вращения ротора — 56 100 об/мин; 81 мин после достижения полной скорости

лизованным трипсином; добавление изопропилового спирта необходимо для подавления гидрофобных взаимодействий ингибитора с фиксированным ферментом.

Полученные при элюции фракции, содержащие ТКСТИ, концентрировали в 3—4 раза на роторном испарителе при 37° (при этом удельная активность ингибитора не изменялась), диализовали против дистиллированной воды и подвергали геле-фильтрации на сефадексе G-75, уравновешенном 0,01 М ацетатом аммония (рН 7,9). На последней стадии очистки от фракции ингибитора отделялась незначительная примесь высокомолекулярного компонента. Лиофилизованный препарат ТКСТИ обладал удельной активностью 42—45 ИЕ/мг.

Как видно из данных табл. 1, использование трех этапов очистки, а именно: осаждения фракции белков сыворотки при 0,3—0,55 насыщения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , хроматографии на трипсин-сефарозе 4В и геле-фильтрации на сефадексе G-75 — позволило достигнуть очистки в 1300—1700 раз; выход составлял 42% относительно содержания ТКСТИ в прогретой в течение 1 ч при рН 5,0 и 50° сыворотке крови кролика. Определение удельной активности по титрованию трипсина [14] (39—44 ИЕ/мг) свидетельствует о 97%-ном содержании ингибитора в препарате ТКСТИ.

На рис. 1, *а* представлена электрофореграмма высокоочищенного препарата ТКСТИ. Как следует из рис. 1, препарат ТКСТИ 97%-ной чистоты неомогенен. Помимо основного компонента (рис. 1, *а*, *II*) в препарате содержится ряд минорных. Нами было показано, что компоненты *I* и *II*, перемещающиеся с большей скоростью к аноду, имеют одинаковую удельную активность, равную 39—40 ИЕ/мг, в то время как удельная активность компонента *III* равна лишь 10 ИЕ/мг. По предварительным данным, эти компоненты не отличаются по содержанию сиаловых кислот в углеводной части их молекул.

По аналогии с ингибитором из плазмы крови человека, обнаруженным Хохштрассером и соавт. [6], можно было предположить наличие различных молекулярных форм в препарате ТКСТИ (мономерной, димерной), но геле-фильтрация на колонке (2,5 × 45 см) с сефадексом G-75 при рН 8,0 вы-

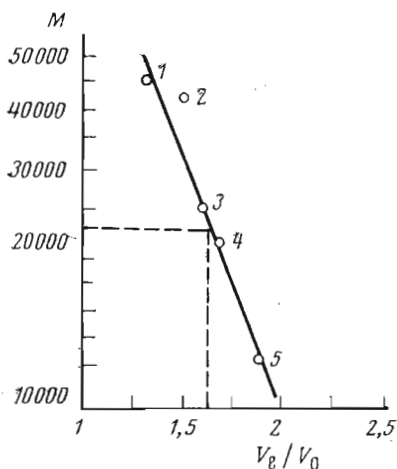


Рис. 2

Рис. 2. Определение молекулярного веса ТКСТИ методом гель-фильтрации [15]: 1 — яичный альбумин; 2 — пепсиноген; 3 — химотрипсиноген; 4 — ингибитор трипсина из бобов сои; 5 — цитохром с, ТКСТИ показан пунктиром.

Колонка (2,5 × 50 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 0,05 М трис-НСl буфером рН 8,0, содержащим 0,1 М КСl.  $V_e/V_0$  — отношение объема элюции белка к нулевому объему колонки, равному объему элюции голубого декстрана

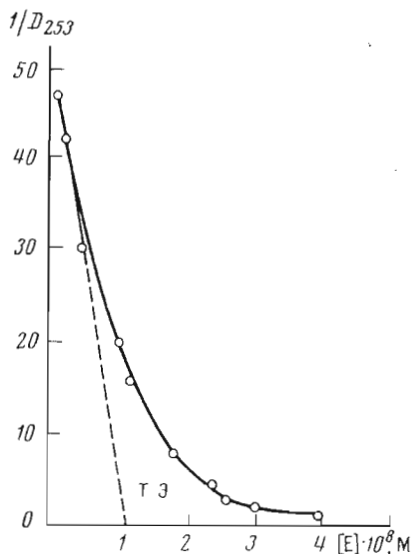


Рис. 3

Рис. 3. Определение величины константы диссоциации  $K_i$  для комплекса трипсина с ТКСТИ титрованием раствора ингибитора растворами фермента различной концентрации, М: субстрат БАЭЭ,  $[S]_0 = 5 \cdot 10^{-4}$ ;  $[E]_0 = 9,1 \cdot 10^{-9} - 4 \cdot 10^{-8}$ ;  $[I]_0 = 5,78 \cdot 10^{-8}$ ; объем каждой пробы 3 мл, 25°, рН 8,0 (0,05 М трис-НСl буфер)

явила наличие только одной формы с  $M 23\ 000 \pm 2\ 000$ . Величина молекулярного веса была установлена методом Эндрюса [15] (рис. 2).

На рис. 1, б представлена седиментограмма высокоочищенного препарата ТКСТИ. ТКСТИ седиментирует одним симметричным пиком. Рассчитанный коэффициент седиментации равен 2 S и хорошо согласуется с величиной молекулярного веса, найденной нами методом гель-фильтрации на сефадексе G-75.

Одной из важных задач данной работы являлось определение величин констант диссоциации ( $K_i$ ) для комплексов ТКСТИ с трипсином и химотрипсином. Значительное подавление эстеразной активности трипсина было отмечено для ряда термо- и кислотостабильных ингибиторов, известных в настоящее время [2, 5, 6, 9]. Помимо трипсина эти ингибиторы подавляют активность химотрипсина, но в значительно меньшей степени [2, 6, 9].

Кинетика взаимодействия подобных ингибиторов с трипсином и химотрипсином в настоящее время практически не изучена. Нартиковой методом Диксона была получена константа диссоциации ( $K_i$ ) для комплекса ТКСТИ с трипсином, равная  $6 \cdot 10^{-8}$  М [9].

Нами были определены величины констант диссоциации ( $K_i$ ) для комплексов ТКСТИ как с трипсином, так и с химотрипсином методом титрования по Грину [14]. Этот метод в отличие от метода Диксона позволяет проводить изучение ингибирования при концентрациях ингибитора, близких к концентрациям фермента, что в случае малых величин  $K_i$  приводит к более точным результатам.

На рис. 3 представлена кривая титрования раствора ТКСТИ растворами трипсина различной концентрации; по точке эквивалентности и кон-

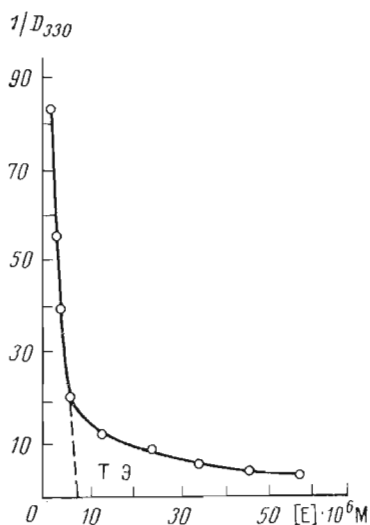


Рис. 4

Рис. 4. Определение величины константы диссоциации  $K_i$  для комплекса химотрипсина с ТКСТИ титрованием раствора ингибитора растворами фермента различной концентрации,  $M$ : субстрат  $p$ -нитрофенилацетат,  $[S]_0 = 1,33 \cdot 10^{-3}$  в  $0,05 M$  трис- $HCl$  буфера ( $pH$  8,0) с добавлением  $1,6\%$   $CH_3CN$ ;  $[E]_0 = 1,1 \cdot 10^{-6} - 5,7 \cdot 10^{-6}$ ;  $[I]_0 = 1,025 \cdot 10^{-5}$ , объем каждой пробы  $3$  мл,  $25^\circ$ ,  $pH$  8,0 ( $0,05 M$  трис- $HCl$  буфер)

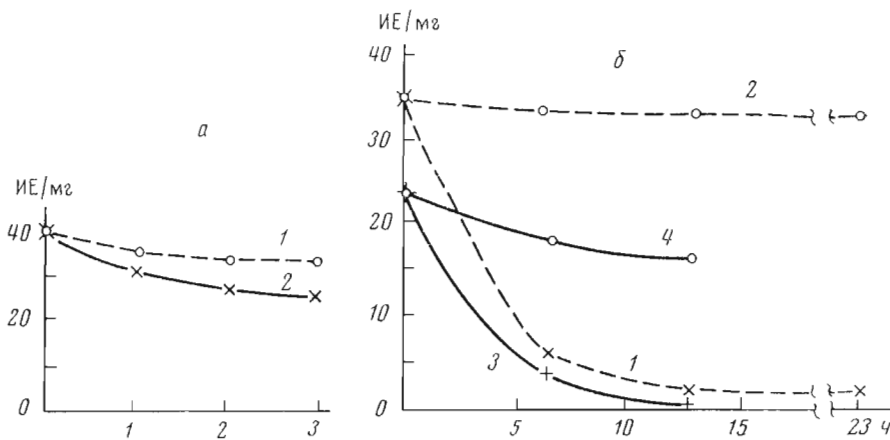


Рис. 5

Рис. 5. Взаимодействие ТКСТИ с малеиновым ангидридом и 1,2-циклогександионом:  $a$  — малеинирование ( $pH$  8,0, 60-кратный избыток реагента на 1 остаток лизина,  $3$  ч.  $4^\circ$ ) 1 — контроль, 2 — реакционная смесь;  $b$  — модификация 1,2-циклогександионом ( $pH$  10, 96-кратный избыток реагента на 1 остаток аргинина,  $20^\circ$ ; 1 — реакционная смесь, 2 — контроль, 3 — реакционная смесь (малеинированный ТКСТИ), 4 — контроль (малеинированный ТКСТИ)

центрации свободного фермента в этой точке была рассчитана концентрация фермент-ингибиторного комплекса и вычислена  $K_i$ , равная  $6 \cdot 10^{-10} M$ .

Константа диссоциации комплекса ТКСТИ с химотрипсином была определена этим же способом. На рис. 4 показана кривая титрования раствора ТКСТИ растворами химотрипсина, предварительно обработанного  $p$ -тозил- $L$ -лизилхлорметилкетонем, для устранения активности трипсина, содержащегося в препарате химотрипсина.  $K_i$  для химотрипсина равна  $6 \cdot 10^{-8} M$ .

Различие в величинах  $K_i$  для комплекса ТКСТИ с трипсином и химотрипсином свидетельствует о более высоком сродстве ингибитора к трипсину и позволяет предположить наличие одного активного центра в молекуле ТКСТИ, необходимого для связывания обоих ферментов.

В настоящее время причины высокой специфичности взаимодействия ферментов с их белковыми ингибиторами окончательно не выяснены. Озава и Ласковский [16] показали, что образование комплекса трипсина с ингибитором сопровождается гидролизом пептидной связи, образованной аминокислотными остатками, входящими в реактивный центр ингибитора (для ингибиторов трипсина эта связь имеет вид  $Arg - X$  или  $Lys = X$ ) [16—18].

**Влияние модификации остатков лизина и аргинина \*  
в ТКСТИ на его антитриптическую активность**

Номер опыта	Модифицирующий реагент	ТКСТИ		Избыток реагента в пересчете на модифицируемую аминокислоту	Число остатков реагента, присоединяющихся к молекуле ТКСТИ	Активность ТКСТИ, % от начальной
		начальная удельная активность, ИВ/мг	модифицируемая аминокислота			
1	2,4,6-Тринитробензолсульфокислота	37—39	Lys и N-концевая	23—184	10,4—11,7	—
2а	Малеиновый ангидрид	34—39	Lys и N-концевая	60 0	9,6—11,9 0	80 90
2б	—	34—39				
3а	1,2-Циклогександион	35	Arg	96	2—3	6,6
3б	—	35		0	0	97
4а	1,2-Циклогександион	24**	Arg	96	2—3	1,12
4б	—	24		0	0	83
4в	—	30***		0	0	92

\* По данным аминокислотного анализа, в молекуле ТКСТИ содержится 13 остатков Lys и 5 остатков Arg.

\*\* 1,2-Циклогександионом обрабатывали предварительно малеинированный ТКСТИ (опыт 2а), в котором содержалось 8—10 малеиновых групп на молекулу белка.

\*\*\* В условиях 2-го контрольного опыта инкубировали ТКСТИ, выделенный из контрольной инкубационной смеси (опыт 2).

Полагали, что именно для комплексов, стабилизированных ковалентной связью, характерны низкие значения констант диссоциации ( $1 \cdot 10^{-9}$  —  $1 \cdot 10^{-12}$  М) [19, 20]. Однако недавно было установлено, что англитротрипсин и англитрохимотрипсин, для которых невозможно стабилизирование комплекса с ингибитором путем ацилирования остатка серина активного центра фермента, образуют с рядом ингибиторов такие же прочные комплексы, как и нативные трипсин и химотрипсин [21]. По-видимому, специфическое взаимодействие фермента с ингибитором может быть обеспечено не только за счет образования ковалентной связи между ними, но и за счет множества более слабых взаимодействий двух белков.

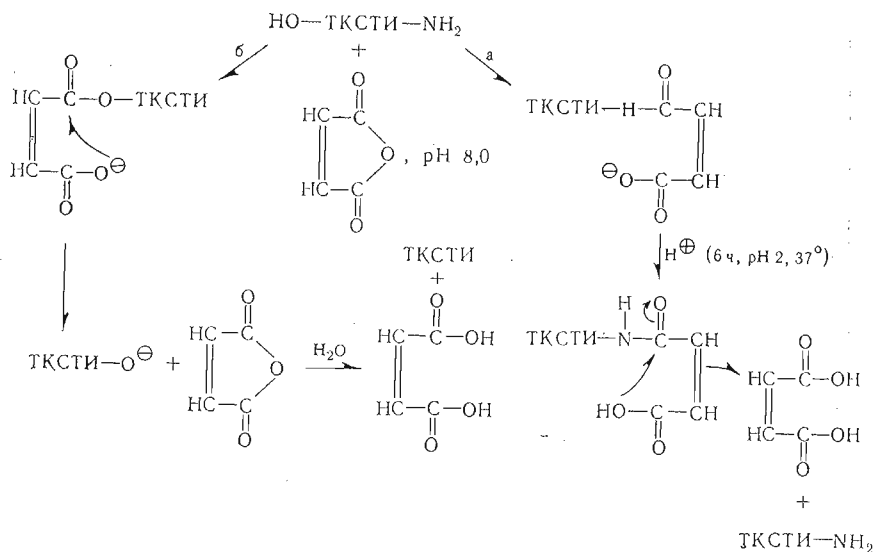
С целью выявления принадлежности ТКСТИ по природе активного центра к ингибиторам аргининового или лизинового типа нами была проведена химическая модификация его функциональных групп:  $\epsilon$ -аминогрупп остатков лизина и гуанидогрупп остатков аргинина. Аминокислотным анализом в молекуле ТКСТИ (94%-ный препарат) найдено 5 остатков аргинина и 13 остатков лизина [13], что составляет вместе с  $\alpha$ -аминогруппой N-концевой аминокислоты 14 незамещенных аминогрупп. Для модификации остатков лизина и аргинина были избраны соответственно малеиновый ангидрид и 1,2-циклогександион. Результаты модификации приведены в табл. 2.

Доступность аминогрупп ТКСТИ для модифицирующего агента была исследована при помощи реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой — избирательным реагентом на аминогруппы белков [22]. Эти результаты представлены в табл. 2, опыт 1. Как видно, с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой прореагировали 11—12 аминогрупп ингибитора, что составляет 85% от всех свободных аминогрупп ТКСТИ.

Влияние блокирования аминогрупп на ингибиторную активность ТКСТИ изучали на примере реакции с малеиновым ангидридом при pH 8. На схеме представлены возможные реакции данного ангидрида с функциональными группами ТКСТИ.

Малеиновый ангидрид преимущественно взаимодействует с непротонированными аминогруппами белков, при этом образуется амидное производ-

ное (см. схему, путь *a*), лабильное в кислой среде и устойчивое в слабощелочной [23]. Очевидно, в избранных условиях взаимодействие ТКСТИ с малеиновым ангидридом должно было привести к образованию только амидных производных (путь *a*), поскольку свободных тиоловых групп в ТКСТИ нет, а побочная реакция малеинового ангидрида с гидроксильными группами остатков серина и тирозина не могла отразиться на результатах модификации вследствие легкой гидролизваемости эфирных производных при pH 8,0 (путь *b*).



В результате обработки ТКСТИ 60-кратным избытком малеинового ангидрида (в расчете на одну аминогруппу) при pH 8,0 и 4° в течение 3 ч было выявлено включение 10—12 остатков реагента в молекулу белка при сохранении 80% активности ингибитора (табл. 2, опыт 2). Снижение анти-триптической активности ТКСТИ всего на 20% при почти полном блокировании свободных аминогрупп свидетельствовало о том, что эти группировки незначительны для взаимодействия с трипсином. Наглядно результаты этого эксперимента представлены на рис. 5, *a*.

Для модификации гуанидогрупп остатков аргинина ТКСТИ использовали 1,2-циклогександион. Как модифицирующий реагент этот дикетон имеет преимущества перед другими дикетонами благодаря хорошей растворимости в воде и высокой реакционной способности [24]. Устойчивость образующихся производных в условиях кислотного гидролиза белков позволяет определить число модифицированных гуанидогрупп по уменьшению содержания остатков аргинина.

ТКСТИ обрабатывали 96-кратным избытком дикетона (в расчете на одну гуанидогруппу) при pH 10 и уже через 13 ч наблюдали практически полную инактивацию ингибитора (табл. 2, опыт 3), при этом в молекулу ТКСТИ, в соответствии с данными аминокислотного анализа, включалось 3 остатка 1,2-циклогександиона (см. табл. 3).

Взаимодействие дикетона с ТКСТИ могло быть усложнено его побочной реакцией с аминогруппами белка [25]. Необходимо было показать, что именно блокирование остатков аргинина существенно для инактивации ТКСТИ. С этой целью предварительно малеинированный ТКСТИ, содержащий 8—10 малеильных группировок на молекулу (с удельной активностью 24 ИЕ/мг), обрабатывали 96-кратным избытком 1,2-циклогександиона при pH 10 в течение 13 ч. Как видно из данных табл. 2 (опыт 4), при этом ингибитор полностью инактивировался. Данные аминокислотного анализа дважды модифицированного ТКСТИ свидетельствовали о том, что в

молекулу маленированного ТКСТИ включилось 2 остатка 1,2-циклогександиона (см. табл. 3). В более наглядной форме результаты модифицирования ТКСТИ diketоном представлены на рис. 5, 6.

Таким образом, опыты по химическому модифицированию показали, что блокирование остатков аргинина в ТКСТИ приводит к утрате им биологической активности, что позволяет отнести ТКСТИ к классу аргининовых ингибиторов трипсина белковой природы.

Таблица 3

Анализ состава основных аминокислот в ТКСТИ  
(в молях, пересчет на известное содержание остатков Lys  
в ТКСТИ (13))  
Гидролиз белка 5,8 М HCl, 105°, 24 ч

ТКСТИ	Lys	His	Arg
Нативный	13 (13)	1,04 (1)	4,5 (5)
Модифицированный 1,2-циклогександионом	13 (13)	0,60 (1)	2,10 (2)
Модифицированный малеиновым ангидридом и 1,2-циклогександионом	13 (13)	0,75 (1)	2,95 (3)

ТКСТИ по своим характеристикам значительно отличается от шести хорошо изученных ингибиторов трипсиноподобных протеиназ плазмы крови человека, а именно:  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_1$ -антихимотрипсина, антитромбина-III,  $\alpha$ -интерингибитора трипсина, инактиватора С1-эстеразы,  $\alpha_2$ -макроглобулина, из которых  $\alpha_1$ -антитрипсин и  $\alpha_2$ -макроглобулин также являются аргининовыми [26].

Близкое сходство по ряду свойств имеется между ТКСТИ и кислотостабильным ингибитором трипсина и химотрипсина, выделенными Хошптрассером и соавт. [6] из плазмы крови человека. Хотя выделенный этими авторами ингибитор еще недостаточно охарактеризован, некоторые данные о его свойствах позволяют сравнить его с ТКСТИ. Оба ингибитора близки, но не идентичны по аминокислотному составу [6, 13]. По-видимому, как ТКСТИ, так и ингибитор, выделенный из плазмы крови человека, содержат большое число дисульфидных связей, обеспечивающих их стабильность в кислой среде, что отличает эти ингибиторы от шести кислотостабильных ингибиторов плазмы крови человека, упомянутых выше. ТКСТИ и ингибитор из плазмы крови человека принадлежат к аргининовому классу ингибиторов трипсина; они имеют практически равные молекулярные веса (соответственно 23 000 и 22 000). Ингибитор из плазмы крови человека может существовать еще и в димерной форме, имеющей  $M$  44 000; этот факт, а также некоторые различия в аминокислотном составе, возможно, объясняются видовыми особенностями двух рассматриваемых ингибиторов.

Физиологическая роль ТКСТИ не выяснена, ТКСТИ не ингибирует такие важнейшие протеиназы плазмы крови, как тромбин [КФ 3.4.4.13], калликреин [КФ 3.4.4.21] и плазмин [КФ 3.4.4.14] [8, 13].

Данные работы [27] позволяют предположить, что подобно  $\alpha_1$ -антитрипсину основная функция ТКСТИ может быть связана с подавлением активности протеиназ лейкоцитов, освобождающихся при воспалении и, в частности, при инфекции в верхних дыхательных путях. Подтверждением этому является высокое содержание ингибиторов типа ТКСТИ в бронхиальном секрете [4]. Защитная функция ингибиторов типа ТКСТИ может быть выражена в большей степени, чем у  $\alpha_1$ -антитрипсина [28], вследствие их меньшего молекулярного веса, что обеспечивает им более легкое прохождение через клеточные барьеры. Место синтеза ТКСТИ и ему подобных ингибиторов в настоящее время не установлено.



## Экспериментальная часть

Использовали следующие препараты и реактивы: кристаллические препараты трипсина и химотрипсина (Ленинградский мясокомбинат им. С. М. Кирова), кристаллический препарат трипсина («Srofa», Чехословакия) — для иммобилизации на сефарозе 4В; кристаллический химотрипсиноген, яичный альбумин («Reanal», Венгрия), ингибитор из бобов сои («Serva», ФРГ), цитохром *c* («BDH», Англия), пепсиноген (любезно предоставлен В. М. Степановым, ВНИИгенетики и селекции промышленных микроорганизмов); все препараты использовали без дополнительной очистки; трипсин-сефароза 4В была получена нами [12]; голубой декстран (G-2000) («Pharmacia», Швеция); этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина солянокислый («Reanal», Венгрия), *p*-нитрофениловый эфир уксусной кислоты любезно предоставлен В. К. Антоновым, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР; *p*-тозил-*L*-лизилхлорметилкетон синтезирован в лаборатории органической химии Института биологической и медицинской химии АМН СССР; 2,4,6-тринитробензолсульфоуксуслота · 4H<sub>2</sub>O, «х. ч.»; 1,2-циклогександион, «х. ч.» (Львовский завод химреактивов); малеиновый ангидрид, «х. ч.» (Харьковский завод химреактивов).

Эстеразную активность трипсина по БАЭЭ определяли спектрофотометрически с помощью СФ-16 [9], а активность ТКСТИ — по торможению эстеразной активности трипсина (см. [9]).

*Эстеразную активность трипсина, иммобилизованного на сефарозе 4В*, определяли следующим образом: 1 мл трипсин-сефарозы 4В, суспендированной в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,0), содержащем 0,01 М CaCl<sub>2</sub> и 0,22 М NaCl, центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин; 0,05 мл полученной «плотной» суспензии (в 1 мл «плотной» суспензии содержится 50—55 мг сухой сефарозы 4В) смешивали с 1,95 мл 0,05 М трихлоридной кислоты (рН 8,0) при 25°, после чего добавляли 1 мл 0,015 М БАЭЭ в том же буфере; пробу перемешивали в течение 2 мин, фильтровали через стеклянный фильтр; прирост оптической плотности в пробе измеряли при 253 нм против смеси реактивов. Активность трипсина выражали в Е/мл «плотной» суспензии.

*Выделение и очистку ТКСТИ из сыворотки крови кролика* при помощи хроматографии на трипсин-сефарозе 4В осуществляли по схеме, представленной в табл. 1. На 1-м этапе из разбавленной в 2 раза водой сыворотки крови кролика фракцию белков 1 б осаждали (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 0,3—0,55 насыщения; фракцию освобождали от (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> гель-фильтрацией в колонке (5 × 120 см) с сефадексом G-25 (грубый), уравновешенным дистиллированной водой, после чего фракцию 1в подкисляли до рН 5,0 добавлением 4 М натрий-ацетатного буфера (рН 5) до конечной концентрации 0,1 М. На 2-м этапе очистки фракцию 1 г в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 5,0, содержащем 0,22 М NaCl и 0,01 М CaCl<sub>2</sub> — буфер А, пропускали через колонку (2,2 × 12 см), заполненную трипсин-сефарозой 4В (эстеразная активность иммобилизованного трипсина — 20 Е/мл «плотной» суспензии), уравновешенной буфером А; скорость тока жидкости через колонку 30 мл/ч. Колонку с сорбированными белками промывали буфером А, после чего ТКСТИ десорбировали 0,01 М HCl, содержащей 1 М NaCl, 0,01 М CaCl<sub>2</sub> и 15% изопропилового спирта (по объему); активные белковые фракции объединяли, концентрировали в 3—4 раза на роторном испарителе при 37° и освобождали от солей путем диализа против дистиллированной воды. На 3-м этапе фракцию ТКСТИ (удельная активность 39—44 ИЕ/мг) подвергали гель-фильтрации на колонке (2,5 × 50 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 0,01 М ацетатом аммония (рН 7,9), после чего их лиофильно высушивали. Выход препарата составлял 42% от содержания ТКСТИ в сыворотке крови кролика, прогретой 1 ч при рН 5,0 и 50°.

*Молекулярный вес ТКСТИ* определяли методом Эндрюса [15], гель-фильтрацией на колонке (2,5 × 50 см) с сефадексом G-75, уравновешенным

0,05 М трис-НСl буфером (рН 8,0), содержащим 0,1 М КСl. В качестве стандартов использовали белки с известными молекулярными весами: яичный альбумин — 45 000, пепсиноген — 42 200, химотрипсиноген — 25 000, ингибитор протениназ из бобов сои — 21 500, цитохром *c* — 12 000. Ингибитор из бобов сои и ТКСТИ идентифицировали по подавлению эстеразной активности трипсина, цитохром *c* — по поглощению при 410 нм, голубой декстран — по поглощению при 625 нм, химотрипсиноген и пепсиноген — по поглощению при 280 нм. На рис. 2 представлена калибровочная кривая, по которой был определен молекулярный вес ТКСТИ, оказавшийся равным  $23\ 000 \pm 2000$ .

Величину константы диссоциации  $K_i$  комплекса ТКСТИ с трипсином определяли методом Грина [14]. Для нахождения точки эквивалентности растворы трипсина (содержание активного трипсина в препарате по данным титрования тразилолом [29] составляло  $44 \pm 6\%$ ) различных концентраций от  $9,1 \cdot 10^{-9}$  до  $4 \cdot 10^{-8}$  М инкубировали с  $5,78 \cdot 10^{-8}$  М раствором ТКСТИ в течение 5 мин при  $25^\circ$  в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 8,0) в объеме 2 мл; после этого к каждой пробе прибавляли по 1 мл  $1,5 \cdot 10^{-3}$  М БАЭЭ в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 8,0) и измеряли прирост оптической плотности в пробе при 253 нм в течение 5 мин. При построении кривой титрования (см. рис. 3) по оси ординат откладывали обратные величины прироста оптической плотности при 253 нм в пробе за 1 мин, по оси абсцисс — молярную концентрацию трипсина в пробе.

Величину константы диссоциации  $K_i$  комплекса ТКСТИ с химотрипсином определили методом Грина [14] аналогично тому, как указано для комплекса с трипсином. Растворы химотрипсина ( $1,1 \cdot 10^{-6}$  —  $5,7 \cdot 10^{-6}$  М; содержание активного фермента в препарате принято за 80% [30]), обработанного *n*-тозил-*L*-лизилхлорметилкетонем, выдерживали с  $1,025 \cdot 10^{-5}$  М раствором ТКСТИ при  $25^\circ$  в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 8,0) в течение 15 мин в объеме 2 мл; после этого к каждой пробе добавляли по 1 мл  $4,01 \cdot 10^{-3}$  М раствора *n*-нитрофенилацетата и измеряли прирост оптической плотности в пробе при 330 нм в течение 10 мин. Кривая титрования представлена на рис. 4.

*Получение модифицированных препаратов ТКСТИ.* Реакцию ТКСТИ с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой проводили по методу [22]; включение реагента в ТКСТИ определяли, принимая коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon$  для ТКСТИ равным 23 000 при 280 нм.

*Модификация ТКСТИ малеиновым ангидридом.* К 7 мг ТКСТИ, растворенного в 2,5 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,0), прибавляли 22,2 мг малеинового ангидрида в три приема — в начале реакции, через 1 ч и через 2 ч инкубации. Реакцию вели при  $4^\circ$  и интенсивном перемешивании; рН реакционной смеси поддерживали равным 8 добавлением 1 М раствора NaOH. Через 3 ч низкомолекулярные примеси из реакционной смеси удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (грубый), уравновешенным 0,1 М аммиаком (рН 8,0). Белковые фракции собирали и определяли их оптическую плотность при 250 и 280 нм, количество малеильных группировок  $n$ , включившихся в молекулу ингибитора, вычисляли по формуле [31]:

$$n = \frac{D_{280}\epsilon_{250} - D_{250}\epsilon_{280}}{D_{280} \cdot 310 - D_{250} \cdot 3360},$$

где 310 и 3360 — коэффициенты молярной экстинкции для малеильной группировки соответственно при 280 и 250 нм;  $\epsilon_{250}$  для ТКСТИ — 13 200,  $\epsilon_{280}$  для ТКСТИ — 23 000,  $D_{280}$  и  $D_{250}$  — оптические плотности растворов малеинированного ТКСТИ соответственно при 280 и 250 нм. Контрольный опыт проводили как указано выше, но без добавления в реакционную смесь малеинового ангидрида.

*Модификацию ТКСТИ 1,2-циклогександионом* проводили по видоизменной методике Хейнса и Фини [32]: 6,6 мг ТКСТИ в 3 мл раствора,

содержащего 0,1 М триэтиламин, 0,01 М натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты и 0,015 М 1,2-циклогександион (рН 10) перемешивали при 20° в темноте в течение 23 ч. После этого реакционную смесь фильтровали через колонку с сефадексом G-25 (грубый), уравновешенным дистиллированной водой; белковые фракции собирали и лиофилизировали. В сухом препарате определяли содержание основных аминокислот. Контрольный опыт проводили как указано выше, но без добавления 1,2-циклогександиона в реакционную смесь.

*Модификация малеинированного ТКСТИ 1,2-циклогександионом.* 8,7 мг малеинированного ТКСТИ (8—10 малеильных групп связано с молекулой ингибитора, удельная активность 24 ИЕ/мг) модифицировали 1,2-циклогександионом в условиях, указанных выше. Дважды модифицированный белок выделяли из реакционной смеси, лиофилизировали, гидролизировали и подвергали аминокислотному анализу на содержание основных аминокислот. Первый контрольный опыт: 4,3 мг малеинированного ТКСТИ инкубировали в условиях, указанных для основного опыта, но без добавления 1,2-циклогександиона; второй контрольный опыт: 4,3 мг немодифицированного ТКСТИ инкубировали в условиях, указанных для первого контрольного опыта. Через 13 ч инкубации белки из инкубационных смесей отделяли от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (грубый), лиофилизировали и подвергали аминокислотному анализу на содержание основных аминокислот.

*Аминокислотный анализ немодифицированного и модифицированных препаратов ТКСТИ* проводили следующим образом: 2,5—3 мг белка гидролизировали 1 мл 5,8 М HCl в вакуумированной запаянной ампуле в течение 24 ч при 105°; определение содержания основных аминокислот в гидролизатах проводили в приборе KLA-3B фирмы «Hitachi» (Япония).

Авторы выражают благодарность В. О. Шпикитеру (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР) за определение коэффициента седиментации ТКСТИ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Astrup T. (1968) Ann. N. Y. Acad. Sci., 146, 601—611.
2. Shulman N. R. (1955) J. Biol. Chem., 213, 655—671.
3. Proksch G. J., Routh J. I. (1972) Z. Lab. Clin. Med., 79, 491—499.
4. Hochstrasser K., Reichert R., Heimburger N. (1973) Z. Physiol. Chem., 354, 587—588.
5. Hochstrasser K., Reichert R., Schwarz S., Werle E. (1973) Z. Physiol. Chem., 354, 923—926.
6. Hochstrasser K., Feuth H., Stoiner O. (1973) Z. Physiol. Chem., 354, 927—932.
7. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф. (1966) Вопр. мед. химии, 12, 325—327.
8. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. (1969) Биохимия, 34, 282—292.
9. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. (1970) Биохимия, 35, 187—195.
10. Пасхина Т. С., Нартикова В. Ф., Якубовская Р. И. (1973) Химия протеолитических ферментов (материалы Всесоюзного симпозиума по химии протеолитических ферментов), стр. 36—37, Вильнюс.
11. Оглоблина О. П., Якубовская Р. И., Пасхина Т. С. (1974) Третий Всесоюзный симпозиум по химии пептидов и белков (тезисы докладов), стр. 109, Киев.
12. Оглоблина О. П., Якубовская Р. И., Пасхина Т. С. (1974) Получение и применение иммобилизованных ферментов (тезисы докладов I Всесоюзного симпозиума), стр. 72—73, Таллин.
13. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. (1975) Биоорган. химия, 1, 340—346.
14. Green N. M. (1953) J. Biol. Chem., 205, 535—551.
15. Andrews P. (1964) Biochem. J., 91, 222—233.
16. Ozawa K., Laskowski M. Jr. (1966) J. Biol. Chem., 241, 3955—3961.
17. Rigbi M., Green L. J. (1968) J. Biol. Chem., 243, 5457—5464.
18. Krahn J., Stevens F. C. (1973) Biochemistry, 12, 1330—1355.
19. Seidl D. S., Liener I. E. (1972) J. Biol. Chem., 247, 3533—3538.
20. Schweitz H., Vincent J. P., Lazdunski M. (1973) Biochemistry, 12, 2841—2846.
21. Ako H., Foster R. J., Ryan C. A. (1974) Biochemistry, 13, 132—139.
22. Haynes R., Osuga D., Feeney R. (1967) Biochemistry, 6, 541—547.
23. Butler P., Harris J., Hartley B., Leberman R. (1969) Biochem. J., 112, 679—689.
24. Toi K., Vynum E., Norris E., Itano H. A. (1967) J. Biol. Chem., 242, 1036—1043.

25. Liu W. H., Feinstein G., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R. E. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2886—2892.
26. Heimbürger N., Haupt H., Schwick H. J. (1971) *Proceedings of the Int. Res. Conference on Proteinase Inhibitors*, Munich, 1970, N. Y., p. 1—22.
27. Hochstrasser K., Schuster R., Reichert R., Heimbürger N. (1972) *Z. Physiol. Chemie*, **353**, 1120—1124.
28. Ohlsson K. (1974) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **28**, 5—11.
29. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Ларионова Н. И. (1970). *Биохимия*, **35**, 261—269.
30. Березин И. В., Коломийцева Г. Я., Мартинек К. (1967). *Молекулярн. биология*, **1**, 488—497.
31. Freedman M. H., Grossberg A. L., Pressman D. (1968) *Biochemistry*, **7**, 1941—1950.
32. Haynes R., Feeney R. (1968). *Biochemistry*, **7**, 2879—2885.

Поступила в редакцию  
2.II.1975.

**THE ACTIVE SITE AND SOME KINETIC CHARACTERISTICS  
OF THERMO- AND ACID STABLE TRYPSIN INHIBITOR  
FROM RABBIT SERUM**

OGLOBLINA O. G., YAKUBOVSKAYA R. I., PLATANOVA L. V.,  
PASKHINA T. S.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Modification of lysine and arginine residues revealed the presence of the latter in the active site of thermo- and acid stable trypsin inhibitor from rabbit serum. The  $K_i$  values for the inhibitor complexes with trypsin and chymotrypsin ( $6 \cdot 10^{-10}$  M and  $6 \cdot 10^{-4}$  M, respectively) are indicative of its higher affinity for trypsin. Affinity chromatography on trypsin-Sepharose 4B was used to isolate the inhibitor from rabbit serum.

---