



УДК 577.156.3.02

МОДИФИЦИРОВАНИЕ ТРИПСИНА ВОДОРАСТВОРИМЫМ
ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ **Казанская Н. Ф., Кост О. А.**Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Для ковалентного присоединения трипсина к полиэтиленмину использован глутаровый альдегид с предварительной модификацией им трипсина или носителя. Свойства модифицированного полиэтиленмином трипсина не зависят от способа присоединения. Растворимые производные трипсина стабилизированы к автолизу, и определенная их доля стабилизирована к термической денатурации.

Методы иммобилизации белков получили широкое признание, так как образующиеся нерастворимые производные обычно обладают повышенной стабильностью. Однако часто требуется стабилизировать белок, но оставить его при этом в растворимом состоянии. Такая необходимость возникает, например, при переработке ферментами нерастворимых субстратов. С этой целью белки связывают с растворимыми полимерными носителями [1—3].

В нашей работе был исследован трипсин, ковалентно присоединенный к водорастворимому полимерному носителю с M 40 000, содержащему первичные аминогруппы [4]. В качестве связывающего реагента был использован один из наиболее распространенных бифункциональных агентов — глутаровый альдегид. Для ковалентного присоединения мы использовали как метод предварительной модификации фермента глутаровым альдегидом, так и метод предварительной модификации носителя.

Глутаровый альдегид реагирует с трипсином с образованием внутри- и межмолекулярных мостиков [5]. Однако естественно предположить, что часть молекул альдегида вступает в реакцию лишь одной из двух карбонильных групп. При этом создается возможность присоединения модифицированного фермента к носителю с помощью непрореагировавших карбонильных групп.

Из смеси продуктов реакции трипсина с глутаровым альдегидом был выделен ММТ, который был использован далее для присоединения к носителю при эквимолярных соотношениях белка и носителя. Полученный продукт оказался неоднородным по молекулярному весу и активности (рис. 1). Каждая молекула носителя, по-видимому, присоединяет к себе одну или более молекул белка (пик I). Пик II представляет собой непрореагировавший ММТ. Вероятно также, что две молекулы носителя могут соединиться друг с другом через молекулу ММТ, в данном случае выпол-

* Сокращения: ММТ — мономер модифицированного трипсина, БАЭЭ — этиловый эфир *N*- α -бензил-*L*-аргинаина.

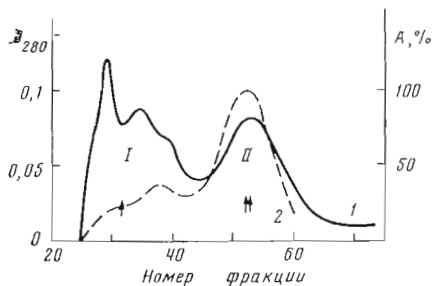


Рис. 1

Рис. 1. Гель-хроматография присоединенного к носителю ММТ на колонке с сефадексом G-75: 1 — оптическая плотность, 2 — активность по БАЭЭ (A) (активность фракции 53 принята за 100%). Колонка калибрована по бычьему сывороточному альбумину (↑) и нативному трипсину (↑↑)

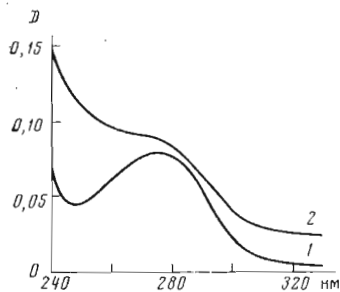


Рис. 2

Рис. 2. УФ-Спектры: 1 — исходного ММТ (фракция 52, рис. 1), 2 — ММТ присоединенного к носителю (фракция 33, рис. 1)

няющую роль бифункционального реагента. Образующийся при этом продукт имеет высокий молекулярный вес, но низкую относительную активность.

Присоединенный к носителю ММТ резко отличался по УФ-спектру от исходного. Исходный ММТ имел максимум поглощения при 275 нм, что соответствует данным работы [5—8]. УФ-спектр носителя, модифицированного глутаровым альдегидом, обнаруживал максимум при 230 нм. Присоединенный к носителю ММТ обладал аддитивным УФ-спектром модифицированного фермента и модифицированного носителя (рис. 2).

Ковалентное присоединение трипсина к носителю осуществляли также путем предварительной модификации аминокрупп носителя избытком глутарового альдегида с последующим присоединением нативного белка при большом его избытке по отношению к носителю. Полученный таким образом модифицированный трипсин (рис. 3, пик I) был однороден по молекулярному весу и активности. Его молекулярный вес, оцененный гель-фильтрацией, соответствовал соединению, состоящему из двух молекул белка, связанных с одной молекулой носителя. Активность присоединенного к полимеру фермента составляла 30% от активности нативного трипсина, что установлено по суммарной активности фермента, содержащегося в пике I (рис. 3), и по определению количества связанного с носителем фермента путем аминокислотного анализа.

Нативный трипсин, предварительно хроматографированный на колонке (2×200 см) с сефадексом G-75 в 5%-ной уксусной кислоте, денатурировал при 100° (рН 3,0) по реакции первого порядка с константой скорости денатурации $2,2 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$. Однако термическая денатурация в этих условиях трипсина, ковалентно присоединенного к носителю, может быть описана суммой двух экспонент (рис. 4, 2). В случае присоединенного к носителю ММТ (исследованы фракции 33—35, рис. 1) константы скорости денатурации составляли $5 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$, причем содержание стабильной фракции достигало 45% (рис. 4, 3). Присоединенный к носителю нативный трипсин денатурировал с константами скорости $5,4 \cdot 10^{-4}$ и $1,1 \cdot 10^{-4} \cdot \text{с}^{-1}$. Содержание стабильной фракции в этом случае составляло 35%.

Полученные данные интересно сравнить с данными о термической денатурации мономера и димера модифицированного трипсина, полученных в результате сшивания фермента глутаровым альдегидом [5]. Как было найдено, ММТ денатурировал при 100° и рН 3 с такой же константой скорости, что и нативный трипсин. Однако в начальный период времени константа скорости денатурации была значительно выше, чем константа скорости денатурации нативного трипсина. Этот факт объясняли наличием

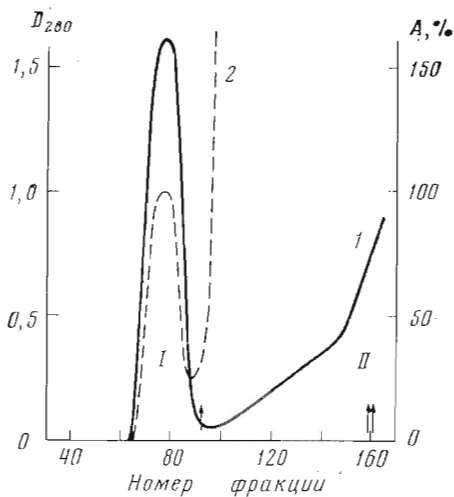


Рис. 3

Рис. 3. Гель-хроматография трипсина, присоединенного к модифицированному носителю, на колонке с сефадексом G-75: 1 — оптическая плотность, 2 — относительная активность по БАЭЭ (активность фракции 76 принята за 100%). Колонка калибрована (см. подпись к рис. 1)

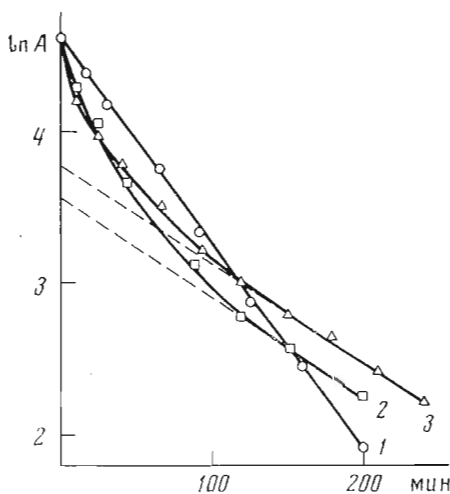


Рис. 4

Рис. 4. Термическая денатурация трипсина в 5%-ной уксусной кислоте (рН 3,0) при 100°: 1 — нативный трипсин, 2 — трипсин, присоединенный к модифицированному носителю, 3 — ММТ, присоединенный к носителю (A — остаточная активность)

Рис. 5. Автолиз трипсина при рН 8,0, 50°: 1 — нативный трипсин, концентрация c_1 , 2 и 3 — присоединенный к носителю трипсин соответственно концентрации c_1 и $2c_1$

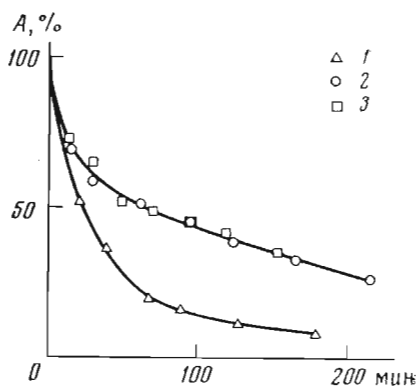


Рис. 5

дестабилизированной фракции (до 40% всего количества ММТ), образующейся при модификации трипсина альдегидом. Кинетика денатурации димера в общем виде могла быть описана суммой двух экспонент с константами скорости денатурации $5,4 \cdot 10^{-4}$ и $1,04 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ (содержание стабильной фракции — 30%).

Видно, что димер шитого глутаровым альдегидом трипсина, ММТ, присоединенный к носителю, и трипсин, связанный с предварительно модифицированным носителем (что дает возможность связывания белка с полимером-носителем большим числом связей), денатурировали в общем одинаково. Во всех этих продуктах наблюдалось существование как лабильной, так и стабильной фракции, причем константы скорости денатурации этих фракций у разных производных трипсина практически совпадали. Следовательно, при данном способе модификации рассматриваемого фермента термическая устойчивость образующихся продуктов не зависит от того, с каким носителем связан фермент — с инертным полимером или с другой молекулой фермента.

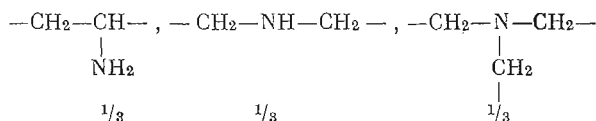
Присоединенный к модифицированному носителю трипсин подвергается автолизу при рН 8,0, 50° с константой скорости реакции второго порядка, в 3,5 раза меньшей константы скорости автолиза нативного трипсина (результат получен для растворов с одинаковыми начальными активностями по БАЭЭ). Этот факт может быть объяснен стерическими затруднениями при автолизе. Кроме того, при увеличении вдвое концентрации модифицированного фермента скорость автолиза, выраженная в единицах dA/dt , где A — относительная активность фермента, не изменялась (рис. 5). Полученный результат означает, что в разбавленных растворах определяющие скорость элементарные акты автолиза происходят внутри сложной молекулы трипсин — носитель.

Экспериментальная часть

Кристаллический трипсин — препарат Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова. Процентное содержание активных молекул, определенное титрованием навески фермента *n*-нитрофениловым эфиром *n'*-гуанидинбензойной кислоты по методу [9], составляло 50%.

Глутаровый альдегид в виде 25%-ного водного раствора, чистый для микроскопии — препарат фирмы «Merck» (ФРГ).

В качестве носителя использовали полимер на основе этиленимина со средним M 40 000 [4], имеющий состав:



Водный 20%-ный раствор этого полимера был любезно предоставлен нам П. А. Гембицким (Институт нефтехимического синтеза). БАЭЭ — препарат фирмы «Reanal» (Венгрия).

Сефадекс G-25 и G-75 — препараты фирмы «Pharmacia» (Швеция).

Модификацию трипсина глутаровым альдегидом и выделение ММТ проводили по методу [5]. Реакцию трипсина с альдегидом вели в течение 12 ч, ММТ выделяли хроматографией реакционной смеси на колонке (2 × 200 см) с сефадексом G-75. Элюцию проводили 5%-ной уксусной кислотой. Активность ММТ составляла 59% по отношению к исходному трипсину.

Ковалентное присоединение ММТ к носителю. К 35 мл раствора ММТ ($D_{275}0,3$) добавляли 0,4 мл 2%-ного водного раствора носителя, доводили рН до 8,5, инкубировали полученную смесь в течение 3 ч и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75 (2 × 80 см) в 5%-ной уксусной кислоте. Элюцию проводили 5%-ной уксусной кислотой при 3° (скорость 22 мл/ч, объем фракции — 3,6 мл). Фракции собирали на коллекторе «Ultraras» (Швеция) при 3°.

Модификация носителя глутаровым альдегидом. К 10 мл раствора 0,1 М КСl, 0,05 М СаСl₂ добавляли 0,4 мл 2%-ного водного раствора носителя и 2 мл 25%-ного раствора глутарового альдегида, доводили рН до 8,5 и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Затем смесь подкисляли конц. НСl до рН 3 и отделяли альдегид гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 (3,5 × 45 см), уравновешенной 10⁻⁴ н. НСl. Элюцию также проводили 10⁻³ н. НСl. Фракции, содержащие модифицированный носитель, определяли по поглощению при 240 нм.

Присоединение коммерческого трипсина к носителю, модифицированному глутаровым альдегидом. К раствору выделенного хроматографически модифицированного носителя (~ 40 мл) добавляли 440 мг трипсина, доводили рН до 8,0 и перемешивали образующуюся суспензию в течение

3 ч при 3°. Затем pH снижали до 3 и оставшийся нерастворимым осадок удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость подвергали гелевой фильтрации на колонке с сефадексом G-75 (2×200 см), уравновешенной 5%-ной уксусной кислотой. Элюцию проводили 5%-ной уксусной кислотой при 3° со скоростью 17 мл/ч. Объем фракции — 2,8 мл. Фракции собирали на коллекторе «Ultragac» (Швеция) при 3°.

Определение эстеразной активности трипсина по БАЭЭ [10] проводили на спектрофотометре «Hitachi-124» (Япония) и pH-стате «Radiometer» (Дания) при pH 8,0.

Для проведения аминокислотного анализа реакцию смесь, содержащую трипсин, присоединенный к носителю, после хроматографии на колонке с сефадексом G-75 упаривали на роторном испарителе и гидролизовали 6 н. HCl при 105° в течение 24 ч в вакуумированной ампуле. Гидролизат исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе KLA-3 «Hitachi» (Япония).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wykes J. R., Dunnill P., Lilly M. D. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, 250, 522—529.
2. Specht B.-U. von, Seinfeld H., Brendel W. (1973) *Z. Physiol. Chem.*, 354, 1659—1660.
3. Westman T. L. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 35, 313—317.
4. Гембицкий П. А., Чмарин А. И., Колесова Л. М., Жук Д. С. (1972) *Высокомолек. соед. (серия Б)*, 14, 599—602.
5. Казанская П. Ф., Кост О. А., Березин И. В. (1975) *Биоорг. химия*, 1, 1337—1344.
6. Korn A. H., Feairheller S. H., Filachione E. M. (1972) *J. Mol. Biol.*, 65, 525—529.
7. Habeeb A. F. S. A., Hiramoto R. (1968) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 126, 16—26.
8. Horwood D., Allen C. R., McCabe M. (1970) *Histochem. J.*, 2, 137—150.
9. Chase T., Shaw E. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 29, 508—514.
10. Inagami T., Stertevant J. M. (1960) *J. Biol. Chem.*, 235, 1019—1026.

Поступила в редакцию
20.XI.1974

TRYPSIN MODIFICATION BY WATER-SOLUBLE POLYETHYLENEIMINE

KAZANSKAYA N. F., KOST O. A.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov
State University, Moscow*

Trypsin was covalently bound to polyethyleneimine with the use of glutaraldehyde after modification of the enzyme or carrier. The properties of immobilized trypsin were shown to be independent of the mode of coupling. Soluble trypsin derivatives thus obtained are resistant to autolysis, while a portion of them is stabilized against thermal denaturation.