



УДК 577.156.3.02

СВОЙСТВА ТРИПСИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО
ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ **Казанская Н. Ф., Кост О. А., Березин И. В.**Межфакультетская лаборатория биоорганической химии
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Показано, что при модификации трипсина глутаровым альдегидом характер образующихся связей зависит от времени проведения реакции. Получены растворимые олигомеры трипсина, содержащие фракцию, устойчивую к термической денатурации. Нерастворимый продукт модификации устойчив к действию денатурирующих агентов.

Применение ферментов в промышленности ограничено из-за их нестабильности. Одним из перспективных методов стабилизации ферментов является сшивание молекул с помощью бифункциональных агентов.

В работе изучено влияние обработки глутаровым альдегидом — одним из наиболее распространенных сшивающих агентов — на кинетические свойства и стабильность трипсина.

Было отмечено, что при инкубации трипсина с глутаровым альдегидом фермент теряет каталитическую активность. Скорость инактивации увеличивается с уменьшением кислотности реакционной среды (рис. 1), что согласуется с данными работы [1]. Нативный трипсин не подвергается заметному автолизу при инкубировании в течение суток, 20° и рН 6,0, поэтому наблюдаемую инактивацию фермента в присутствии глутарового альдегида (рис. 1, 3) следует отнести за счет модификации трипсина альдегидом. Прямое титрование активных центров фермента не дало однозначных результатов вследствие неспецифического распада НФГБ в присутствии модифицированного белка. Было проведено определение числа активных молекул трипсина методом частичного ингибирования известным количеством панкреатического ингибитора Кунитца. Оказалось, что уменьшение эстеразной активности в процессе реакции трипсина с глутаровым альдегидом вызывается уменьшением концентрации активных молекул фермента (рис. 2).

Нами было показано, что альдегид реагирует с трипсином с образованием внутримолекулярных мостиков. Для этого растворимые продукты, полученные в результате 12-часовой реакции, были подвергнуты диализу для удаления избытка глутарового альдегида и лиофилизированы. Полученный таким образом белок был обработан дитиотрептолом для восстановления дисульфидных связей. Последующая хроматография не обнаружи-

* Сокращения: БАЭЭ — этиловый эфир N- α -бензоил-L-аргинаина; АТЭЭ — этиловый эфир N- α -ацетил-L-тирозина; ТНБС — тринитробензолсульфокислота; НФГБ — *n*-нитрофениловый эфир *n'*-гуанидинбензойной кислоты.

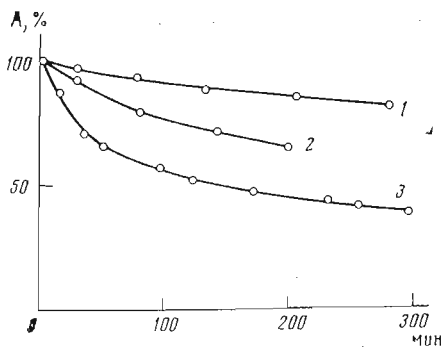


Рис. 1

Рис. 1. Влияние pH на скорость инактивации трипсина глутаровым альдегидом: 1 — pH 4,4; 2 — pH 5,1; 3 — pH 6,0. Условия реакции: $5,8 \cdot 10^{-6}$ М трипсин, $3,6 \cdot 10^{-3}$ М глутаровый альдегид в 0,1 М цитратном буфере, 0,05 М CaCl_2 , 25° (A — активность)

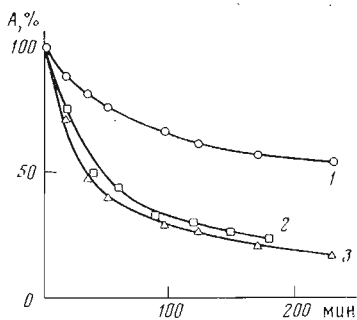


Рис. 2

Рис. 2. Изменение эстеразной активности трипсина в процессе реакции с глутаровым альдегидом: 1 — активность, определенная по БАЭЭ, 2 — то же в присутствии панкреатического ингибитора, 3 — теоретическая активность по БАЭЭ в присутствии панкреатического ингибитора, рассчитанная из кривой 1 в предположении, что $k_{\text{кат}}$ и K_i фермента не меняются в процессе реакции с альдегидом. Активность в начальный момент реакции во всех случаях принята за 100%. Условия ингибирования: $2,17 \cdot 10^{-6}$ М трипсин, $1 \cdot 10^{-6}$ М ингибитор, pH 7,8 (значения концентраций приведены с учетом содержания активных молекул в реагентах)

ла пика, соответствующего цепям трипсина (рис. 3). Несомненно, мостики, образованные альдегидом, препятствуют разделению цепей.

Бивен и Гратцер [2] предположили, что трипсин инактивируется при образовании альдегидом мостиков между остатками лизина 131—206, 142—176 и 144—176 (номера остатков соответствуют номерам в трипсиногене). Они считают, что такие мостики могут нарушать структуру активного центра фермента. Вероятно также, что глутаровый альдегид в присутствии аминогрупп может конденсироваться с гистидином, входящим в активный центр трипсина [3]. Кроме того, наблюдаемая инактивация фермента может быть вызвана взаимодействием альдегида с α -аминогруппой N-концевого изолейцина-7, которая, как известно, принимает участие в поддержании активного центра трипсина [4]. Последний эффект довольно трудно выявить из-за низкой точности аминокислотного анализа.

Аминокислотный состав трипсина, модифицированного глутаровым альдегидом, заметно отличается от состава нативного трипсина по содержанию остатков лизина (см. таблицу). Продукты, полученные после 1,5—3-часовой реакции, обнаруживают уменьшение содержания лизина (в расчете на моль трипсина) на 3 остатка, а продукты, полученные после 12-часовой реакции, — на 6 остатков. Титрование аминогрупп белка, выполненное с помощью ТНБС, показало, однако, что за 2 ч реакции альдегид модифицирует 8—9 аминогрупп белка из 15 (14 ϵ -аминогрупп лизина и α -аминогруппа изолейцина-7). Аминокислотный анализ растворимых продуктов, полученных в результате 12-часовой реакции и восстановленных боргидридом натрия перед кислотным гидролизом, обнаруживает уменьшение содержания лизина на 8 остатков по сравнению с нативным белком.

Полученные в этой работе данные проливают некоторый свет на уже широко обсуждавшийся вопрос [6—9] о природе связи глутарового альдегида с белком. Очевидно, взаимодействие альдегида с трипсином происходит быстро, но если время протекания реакции относительно невелико (1,5—3 ч), то образующиеся связи лабильны и разрушаются в условиях кислотного гидролиза. Естественно предположить образование на этой стадии оснований Шиффа. (Некоторое подтверждение этому положе

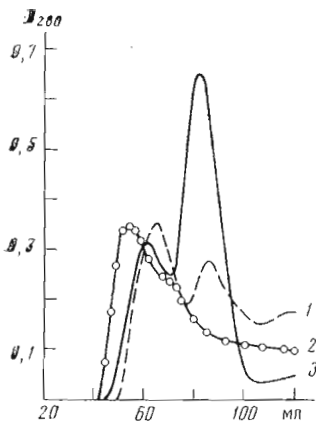


Рис. 3

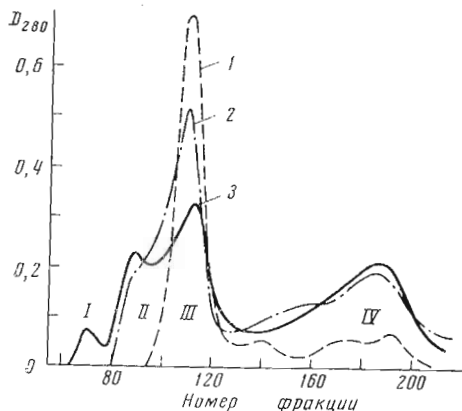


Рис. 4

Рис. 3. Хроматография образцов трипсина на сефадексе G-25 (колонка 2×60 см) в 9%-ной муравьиной кислоте после восстановления дисульфидных связей по методу [21]: 1 — нативный трипсин, 2 — трипсин, модифицированный глутаровым альдегидом, 3 — α -трипсин, ингибированный диизопропилфторфосфатом

Рис. 4. Хроматография растворимых продуктов реакции трипсина с глутаровым альдегидом на колонке (2×200 см) с сефадексом G-75. 1 — нативный трипсин; 2, 3 — образцы модифицированного трипсина, полученные в результате соответственно 2- и 12-часовой реакции. Колонка калибрована по нативному трипсину и бычьему плазматическому альбумину

нию будет обсуждено ниже.) При увеличении времени инкубации трипсина с глутаровым альдегидом до 12 ч количество модифицированных аминокрупп в растворимых продуктах реакции, видимо, не меняется, оставаясь равным 8—9 остаткам/моль, но доля устойчивых к кислотному гидролизу связей возрастает до 6 остатков/моль.

Как следует из анализа содержания азота в нерастворимом продукте реакции трипсина с глутаровым альдегидом, на каждую аминокгруппу фермента приходится 2—3 молекулы альдегида, что находится в соответствии с данными работ [7, 9—11]. Полученный результат можно объяснить взаимодействием альдегида с другими, помимо аминокгрупп [3], функциональными группами с образованием лабильных связей, не выдерживающих условий кислотного гидролиза. Кроме того, существует возможность взаимодействия белка не с мономерными молекулами альдегида, а с продуктами его конденсации.

Ричардс и Ноулес [6] предположили, что первичные аминокгруппы белков могут реагировать с α, β -непредельным полимером альдегида по типу

Содержание лизина в продуктах реакции трипсина с глутаровым альдегидом, по результатам аминокислотного анализа

Образец трипсина	Время реакции, ч	Содержание лизина, остаток/моль	Образец трипсина	Время реакции, ч	Содержание лизина, остаток/моль
Нативный трипсин		13,5 14 [5]	Димер трипсина	12	8,1
Смесь растворимых продуктов	1	10,7	Мономер трипсина	12	8,5
	3	11,2	Нерастворимый продукт	12	3,5
	12 *	5,8			

* После восстановления NaBH_4 .

конденсации Михаэля с образованием продуктов типа R-NH-R'. Такого рода связи должны быть устойчивы к кислотному гидролизу.

Боус и Катер [7] считают, что в системе может происходить конденсация молекул альдегида, уже прореагировавших одной из двух карбонильных групп. При этом образуется неопределенное соединение, активное по отношению к аминокруппам.

Возможно также, что в образовании стабильных продуктов реакции могут участвовать уже образовавшиеся основания Шиффа.

При проведении реакции трипсина с глутаровым альдегидом в течение 2 ч не наблюдается образования нерастворимого продукта реакции. Хроматография реакционной смеси обнаруживает присутствие димерных молекул фермента (рис. 4, пик II). При увеличении времени реакции до 12 ч образуется осадок, являющийся, вероятно, полимером трипсина, а из смеси растворимых продуктов были хроматографически выделены тример (пик I), димер (пик II) и мономер (пик III) модифицированного трипсина (рис. 4), обладающие энзиматической активностью. Вещество пика IV представляет собой неактивные низкомолекулярные примеси.

В процессе реакции трипсина с глутаровым альдегидом спектр реакционной смеси меняется в соответствии с данными работ [3, 12]. Максимум поглощения благодаря взаимодействию альдегида с аминокруппами белка сдвигается к 275 нм. Кроме того, наблюдается увеличение коэффициента экстинкции при 280 нм, которое, как предполагают [9], можно объяснить взаимодействием альдегида с остатком триптофана молекулы фермента. Однако можно предположить, что модификация трипсина альдегидом приводит к некоторому изменению конформации белка и соответственно к возрастанию коэффициента экстинкции при 280 нм вследствие изменения контакта хромофорных групп с растворителем.

Определение белка по методу Лоури в димере, полученном в результате 12-часовой реакции, показало, что коэффициент экстинкции при 280 нм в модифицированном белке увеличился в 1,28 раза по сравнению с нативным. С учетом полученной величины было найдено, что мономер модифицированного фермента обладает 59%, а димер и тример — 32% от активности нативного хроматографированного трипсина. Аминокислотный состав димера и мономера, однако, одинаков. По-видимому, наблюдаемое уменьшение активности у олигомеров модифицированного трипсина по сравнению с мономером объясняется небольшими расстояниями между белковыми глобулами в олигомерах. Возникающие при сшивании трипсина альдегидом белок-белковые взаимодействия, как известно, должны сильно влиять на активность фермента [13].

Растворимые продукты, полученные в результате реакции трипсина с глутаровым альдегидом, имеют зависимость скорости гидролиза БАЭЭ от pH, практически одинаковую с аналогичной зависимостью для нативного фермента (рис. 5). Ингибирование растворимых продуктов панкреатическим ингибитором Кунитца проходит с той же константой ингибирования, что и для нативного трипсина.

Автолиз (pH 7,4; 40°) димера и мономера модифицированного трипсина, полученного в результате 1,5-часовой реакции, идет с меньшей константой скорости, чем у нативного фермента. Отношение констант скорости автолиза нативного (k_n) и модифицированного (k_m) ферментов составляет $\sim 1,8$ (для образцов с одинаковой начальной активностью по БАЭЭ). Как выше указывалось, при кратковременной инкубации реагентов (1,5 ч) образующиеся продукты, вероятно, в основном представляют собой основания Шиффа, которые должны иметь значение pK не выше 5—6 [6], что приводит к уменьшению константы скорости автолиза путем снижения специфичности критических пептидных связей к атаке молекулой фермента.

Продукты, полученные в результате 12-часовой реакции, подвергаются автолизу (pH 7,8; 50°) в той же степени, что и нативный трипсин. Отно-

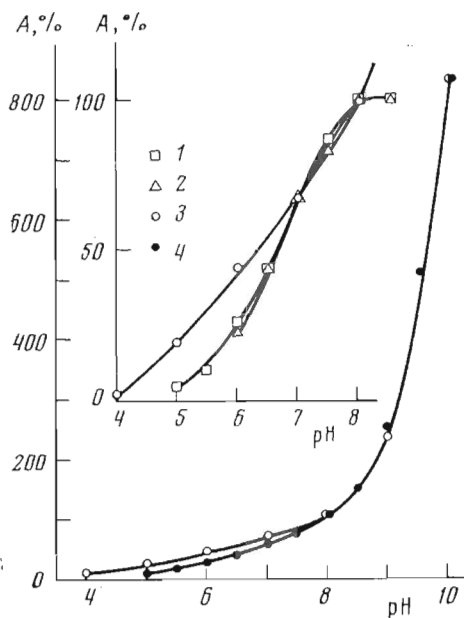


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость активности образцов трипсина (по гидролизу БАЭЭ) от pH при 25° (активность при pH 8,0 принималась за 100%): 1 — нативный трипсин в 0,1 М КСl, 2 — растворимый трипсин, модифицированный в 0,1 М КСl, 3 и 4 — нерастворимый продукт реакции трипсина с глутаровым альдегидом соответственно в 0,1 и 2 М КСl

Рис. 6 Термическая денатурация продуктов реакции трипсина с глутаровым альдегидом (а, б): 1 — нативный трипсин, 2 — мономер модифицированного трипсина, 3 — димер модифицированного трипсина. Условия денатурации: 5%-ная уксусная кислота (pH 3,0), 100°

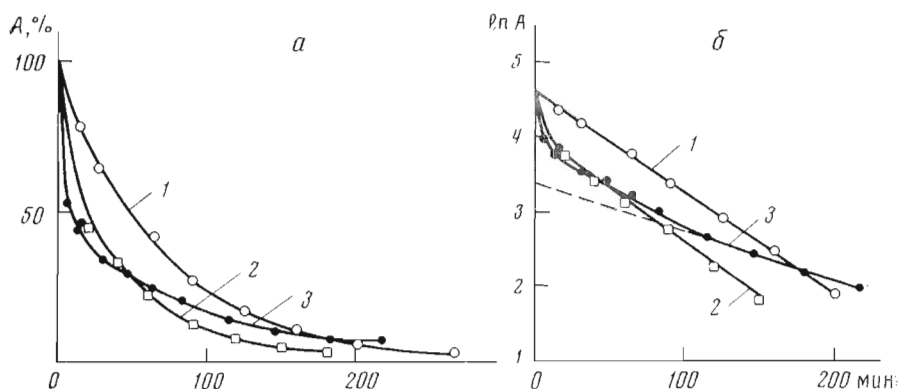


Рис. 6

шение констант k_n/k_m в этом случае составляет 1,0—1,2. Этот факт можно объяснить тем, что теперь большая часть связей белка с альдегидом является стабильными связями типа R-NH-R', значение рК аминокислотных групп которых должно быть немного выше, чем у немодифицированных аминокислотных групп. Таким образом, заряд критических по отношению к автолизу связей в молекуле трипсина сохраняется, и сохраняется константа скорости автолиза.

Было найдено, что полученные производные трипсина, аналогично нативному трипсину, полностью теряют ферментативную активность в 8 М растворах мочевины. Зависимость активности модифицированного трипсина от концентрации присутствующего в растворе хлористого гуанидина также полностью идентична аналогичной зависимости для нативного фермента.

Наконец, была исследована термическая денатурация модифицированного трипсина при pH 3,0 (рис. 6). Денатурация нативного трипсина в этих условиях является реакцией первого порядка с константой скорости $2,2 \cdot 10^{-4} \text{с}^{-1}$. В начальный период денатурации мономера модифицированного трипсина наблюдается быстрое падение активности, которое,

вероятно, следует отнести к дестабилизированной фракции (до 40% всего количества мономера). В дальнейшем денатурация мономера идет с той же константой скорости, что и денатурация нативного фермента. В случае димера мы имеем сложную кривую снижения активности в результате денатурации. Полученные результаты можно объяснить, если принять, что димер существует в двух формах с разными константами скорости денатурации. Кинетика денатурации димера в этом случае может быть описана суммой двух экспонент, причем константы скорости денатурации составляют $5,4 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ и $1,04 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ ($\sim 30\%$ всего количества димера).

Как уже отмечалось, в процессе реакции трипсина с глутаровым альдегидом образуется желтый осадок, не растворимый в воде, солевых растворах и конц. HCl. Вероятно, этот осадок представляет собой полимер трипсина.

Результаты аминокислотного анализа нерастворимого продукта отличаются от результатов анализа растворимых продуктов в основном меньшим содержанием лизина (см. таблицу).

Активность полимера трипсина по БАЭЭ, измеренная методом рН-стабирирования при рН 8,0, составляет 2—3% от активности нативного трипсина. Активность, определенная по высокомолекулярному субстрату — химотрипсиногену при рН 8,0, составляет лишь 0,03% от активности нативного трипсина. Очевидно, отмеченное уменьшение активности в случае высокомолекулярного субстрата по сравнению с БАЭЭ вызывается стерическими затруднениями при гидролизе.

Ингибирование нерастворимого продукта панкреатическим ингибитором Кунитца протекает неполно. При инкубировании малоактивного полимера в растворе, содержащем ингибитор в количестве, достаточном для полного ингибирования фермента, активность снижается лишь на 30%. Полученный результат также можно объяснить стерическими затруднениями при ингибировании высокомолекулярным ингибитором. Низкомолекулярный необратимый ингибитор трипсина тозиллизилхлорметилкетон также ингибирует фермент лишь на 70%. Вероятно, в этом случае имеет место понижение сродства к ингибитору в условиях эксперимента (рН 8, 25°).

Зависимость скорости гидролиза БАЭЭ нерастворимым продуктом от рН имеет необычный для трипсина вид (рис. 5). Она не обнаруживает максимума до рН 10 (при более высоких значениях рН измерения не проводились вследствие высокой скорости спонтанного гидролиза БАЭЭ в этой области). При подщелачивании среды до рН 10 скорость реакции увеличивается в 8 раз по сравнению со скоростью реакции при рН 8, причем этот эффект обратим. Вид рН-зависимости практически не меняется с изменением ионной силы. Такой необычный вид рН-зависимости может быть объяснен тем, что при значениях рН выше 8 работают лишь активные центры, находящиеся на поверхности или расположенные близко от поверхности полимерных частиц. Это может происходить по двум причинам. Во-первых, активные центры внутри полимерных частиц трипсина заключены в гидрофобные области, не контактирующие с растворителем. В этих областях, естественно, концентрация воды низка и скорости гидролитических реакций замедлены. Во-вторых, вероятно, что диффузия продукта гидролиза эфира из частиц фермента, сшитого альдегидом, происходит медленно. В этом случае значение рН среды внутри частиц должно быть значительно ниже, чем значение рН растворителя, из-за появления кислоты, образующейся в процессе гидролиза. На существование такой возможности указывают, например, данные по реакционной способности трипсина, иммобилизованного в частицах полиакриламидного геля [14].

Таким образом, из приведенных выше данных видно, что активность полученного нерастворимого модифицированного трипсина приближается к 20% от активности нативного трипсина.

Нерастворимый продукт реакции трипсина с глутаровым альдегидом в отличие от растворимых продуктов обладает повышенной устойчивостью к денатурирующему действию хлористого гуанидина и мочевины. При инкубации осадка в течение 20—40 мин в 6 М растворе хлористого гуанидина (рН 8,0) полимер сохраняет 15% энзиматической активности, в то время как нативный трипсин в этих условиях полностью ее теряет.

После инкубации осадка в течение 40 мин в 8 М растворе мочевины (рН 8,0) активность его возрастает примерно в 1,5—2 раза. С увеличением времени инкубации до 24 ч дальнейших изменений активности не наблюдается. С повышением рН реакционной среды до 10 активность осадка в 8 М растворе мочевины увеличивается в 4 раза по сравнению с активностью, измеренной при рН 8,0. Таким образом, очевидно, что осадок в 8 М растворе мочевины при рН 10 практически полностью сохраняет энзиматическую активность, т. е. мочевина не обладает денатурирующим действием на нерастворимый спитый трипсин. Кажущееся увеличение активности фермента при рН 8,0 можно приписать повышению буферности системы в присутствии мочевины и вследствие этого некоторому выравниванию значений рН внутри и вне полимерных частиц.

В отличие от стабилизации осадка по отношению к денатурирующим агентам термической стабильности его не наблюдалось. Различия в устойчивости нерастворимого модифицированного трипсина к действию мочевины, хлористого гуанидина и к нагреванию, по-видимому, являются следствием различий в механизмах денатурации.

Экспериментальная часть

Кристаллический трипсин — препарат Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова. Процентное содержание активных молекул фермента, определенное титрованием НФГБ по методике [15], составляло 50%. В некоторых случаях трипсин отделяли геле-фильтрацией на сефадексе G-75 от низкомолекулярных неактивных примесей. α -Трипсин и β -трипсин были выделены в соответствии с работой [16].

Глутаровый альдегид в виде 25%-ного водного раствора — препарат фирмы «Merck» (ФРГ), чистый для микроскопии. БАЭЭ, химотрипсиноген — препараты фирмы «Reanal» (Венгрия). НФГБ синтезировали в нашей лаборатории по методу [17]. ТНБС любезно предоставили нам сотрудники отдела химии белка лаборатории биоорганической химии МГУ. Панкреатический ингибитор трипсина очищали в нашей лаборатории по методу [18]. Препарат имел 86% активных молекул. АТЭЭ синтезировали в нашей лаборатории по методу [19]. Тозиллизилхлорметилкетон — препарат фирмы «Calbiochem» (США). Сефадекс G-25 и G-75 — препараты фирмы «Pharmacia» (Швеция).

Определение количества свободных аминокрупп в белке проводили по модифицированному методу [20] с помощью ТНБС. К 1 мл раствора трипсина ($\sim 0,5$ мг/мл) добавляли 1 мл 0,2 М боратного буфера (рН 8,1) и 1 мл раствора ТНБС (2 мг/мл). Смесь инкубировали при 40°. Измеряли поглощение раствора при 355 нм. В качестве стандарта были использованы нативный трипсин и β -трипсин, ингибированный диизопропилфторфосфатом.

Определение эстеразной активности трипсина по БАЭЭ [21] производили на спектрофотометре «Hitachi-124» (Япония) и рН-стате «Radiometer» (Дания) при рН 8,0, вводили поправку на спонтанный гидролиз БАЭЭ. Активность трипсина по высокомолекулярному субстрату определяли по начальной скорости активации трипсином химотрипсиногена при рН 8,0; 3°. Активность химотрипсина определяли по АТЭЭ [21] на рН-стате при рН 7,8. Восстановление дисульфидных связей и разделение цепей трипсина проводили по методу [22].

Для аминокислотного анализа лиофильно высушенный белок гидролизovali 6 н. НСl при 105° в вакуумированных ампулах в течение 24 ч. Гидролизат исследовали на автоматическом аминокислотном анализаторе

КЛА-3 «Hitachi» (Япония), за что авторы выражают благодарность отделу хроматографии лаборатории биоорганической химии МГУ.

Модификация трипсина глутаровым альдегидом. Трипсин (50 мг) растворяли в 35 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 6; 0,05 М CaCl₂), отделяли нерастворившиеся примеси центрифугированием и добавляли к надосадочной жидкости глутаровый альдегид (0,5 мл 2,5%-ного раствора). Смесь перемешивали в разных случаях от 1,5 до 12 ч. Для прекращения реакции реакционную смесь подкисляли до рН 3. Для увеличения выхода нерастворимых продуктов реакции пользовались удвоенными концентрациями реагентов и вели реакцию 12 ч. Нерастворимый продукт отделяли центрифугированием, промывали несколько раз 5%-ной уксусной кислотой, дистиллированной водой и сушили в вакуум-экссикаторе.

В тех случаях, когда требовалось удаление избытка глутарового альдегида из реакционной смеси, применяли два метода: гельфильтрацию на сефадексе G-25 (колонка 1,5 × 10 см) в 0,1 М цитратном буфере (рН 6,0; 0,05 М CaCl₂) или в 5%-ной уксусной кислоте (рН 3,0) и диализ против 0,05 М раствора CaCl₂.

Хроматография растворимых продуктов реакции. Нерастворимый продукт реакции трипсина с глутаровым альдегидом удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость подкисляли до рН 3 и наносили на колонку (2 × 200 см) с сефадексом G-75, уравновешенным 5%-ной уксусной кислотой. Элюцию проводили 5%-ной уксусной кислотой при 3°. Скорость элюции 17 мл/ч. Объем фракции 2,8 мл. Фракции собирали на коллекторе «Ultras» (Швеция) при 3°.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jansen E. F., Tomimatsu I., Olson A. C. (1971) Arch. Biochem. and Biophys., 144, 394—400.
2. Beaven G. H., Gratzel W. B. (1973) Int. J. Peptide Protein Res., 5, 215—218.
3. Habeeb A. F. S. A., Hiramoto R. (1968) Arch. Biochem. and Biophys., 126, 16—26.
4. Robinson N. C., Neurath H., Walsh K. A. (1973) Biochemistry, 12, 420—426.
5. Dayhoff M. O. (1969) Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation.
6. Richards F. M., Knowles J. R. (1968) J. Mol. Biol., 37, 231—233.
7. Bowes J. H., Cater C. W. (1968) Biochim. et biophys. acta, 168, 341—352.
8. Hardy P. M., Nicholls A. C., Rydon H. N. (1969) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 565—566.
9. Korn A. H., Fearheller S. H., Filachione E. M. (1972) J. Mol. Biol., 65, 525—529.
10. Bowes J. H., Cater C. W. (1965) J. Appl. Chem. and Biotechnol., 15, 296—304.
11. Thies C. (1973) J. Coll. Interf. Sci., 44, 133—141.
12. Horwood D., Allen C. R., McCabe M. (1970) Histochem. J., 2, 137—150.
13. Полторак О. М., Чухрай Е. С. (1971) Физико-химические основы ферментативного катализа, стр. 283—296, изд-во «Высшая школа», М.
14. Gestrelus S., Mattiasson B., Mosbach K. (1973) Eur. J. Biochem., 36, 89—96.
15. Chase T., Shaw E. (1967) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 29, 508—514.
16. Schroeder D. D., Shaw E. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2943—2949.
17. Knowles J. R., Preston J. M. (1968) Biochim. et biophys. acta, 151, 290—292.
18. Казанская Н. Ф., Ларнонова Н. И. (1970) Вопр. мед. химии, 16, 368—371.
19. Vigneard V., Weyer E. (1932) J. Biol. Chem., 98, 295—308.
20. Habeeb A. F. S. A. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., 119, 264—268.
21. Inagami T., Stertevant J. M. (1960) J. Biol. Chem., 235, 1019—1026.
22. Hermodson M. A., Ericsson L. H., Neurath H., Walsh K. A. (1973) Biochemistry, 12, 3146—3153.

Поступила в редакцию
5.II.1975

THE PROPERTIES OF TRYPSIN MODIFIED BY GLUTARALDEHYDE

KAZANSKAYA N. F., KOST O. A., BEREZIN I. V.

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

The reaction between glutaraldehyde and trypsin proceeds with the formation of intra- and intermolecular cross-links. Their type being dependent upon the reaction time. Gel filtration of soluble reaction products revealed the presense of enzymatically active trimer, dimer and monomer of modified enzyme, one dimer moiety possessed increased thermal stability.