



УДК 577.152.344'17

АФФИННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.
КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ХИМОТРИПСИНА
НА МОДИФИЦИРОВАННОМ 6-АМИНОГЕКСАНОИЛ-
L-ФЕНИЛАЛАНИЛ-*n*-НИТРОАНИЛИДОМ СОПОЛИМЕРЕ
МАЛЕИНОВОГО АНГИДРИДА И N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА

Сижк П.Ф., Пато Я.*., Сииярв Р.К., Валмсен К.Х.,
Азори М.*., Аавиксаар А.А.

*Институт химической и биологической физики
Академии наук ЭССР, Таллин;*

**Центральный исследовательский институт химии
Академии наук Венгрии, Будапешт*

В работе предложен новый подход к селективной иммобилизации ферментов на активированных водорастворимых или твердых носителях, суть которого заключается в модифицировании носителя лигандом, узнаваемым активным центром фермента. Наличие на носителе такой «приманки» приводит к предпочтительному по сравнению с другими компонентами смеси комплексообразованию данного фермента с носителем и, так как активный центр в комплексе заблокирован аффинным лигандом, к иммобилизации фермента за счет реакции активных групп носителя с периферийными группами фермента.

Предлагаемый метод аффинной иммобилизации ферментов был нами использован при ковалентном связывании α -химотрипсина с сополимером малеинового ангидрида и N-винилпирролидона. Исходный полимер (средняя молекулярная масса 20 кДа [1]) модифицировали в дихлорметане введением 6-аминогексаноил-L-фенилаланил-*n*-нитроанилидных остатков [2] (5 моль/моль мономера) в качестве приманки. При смешивании раствора модифицированного полимера в диметилформамиде с водным раствором фермента протекают три параллельные реакции: 1) гидролиз ангидридных групп полимера в водной среде, 2) гидролиз N-ацил-L-фенилаланил-*n*-нитроанилида (приманки) под действием химотрипсина, 3) атака ангидридных групп полимерного носителя периферийными нуклеофильными группами химотрипсина, что приводит к ковалентному связыванию фермента.

Кинетические кривые свидетельствуют о том, что скорость расщепления *n*-нитроанилидных групп химотрипсином быстро убывает (рис. 1, 1 и 2). Это можно объяснить стерическими препятствиями к атаке полимерного субстрата ферментом, связанным с полимером. Оставшиеся *n*-нитроанилидные группы полимерного носителя быстро отщепляются при добавлении новой порции химотрипсина (рис. 1, 3), который уже не связывается ковалентно с полимером, так как за истекшее время (30 мин) ангидридные группы носителя практически полностью расщеплены водой. После предварительного гидролиза ангидридных групп носителя в буферном растворе добавление химотрипсина приводит к быстрому расщеплению *n*-нитроанилидных групп полимера (рис. 1, 4).

Разделение реакционной смеси ковалентного связывания химотрипсина проводили гель-хроматографией на колонке с сефакрилом S-200. Ковалентно связанный с полимером фермент элюируется начиная почти со свободного объема колонки (v_0) в виде широкого несимметричного пика (рис. 2а). Полная иммобилизация фермента достигается при соотношении фермент—полимер вплоть до 1 : 1, что соответствует мольному

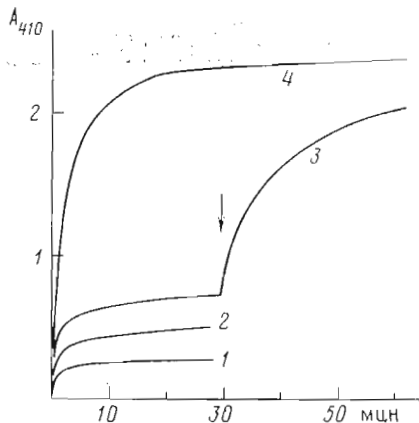


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика расщепления *n*-нитроанилидных групп сополимера малеинового ангидрида и *N*-винилпирролидона, модифицированного 6-аминогексаноил-*L*-фенилаланил-*n*-нитроанилидом при обработке его α -химотрипсином (25° С, рН 7,6; 0,1 М Нерес, 1 М NaCl). Концентрация полимера 74 мкМ, концентрация α -химотрипсина 30 (1), 60 (2), 116 мкМ (3); стрелкой обозначено добавление дополнительного количества фермента до концентрации 232 мкМ через 30 мин после начала инкубации. 4 — фермент добавлен до концентрации 232 мкМ после предварительного выдерживания полимера в буфере в течение 30 мин

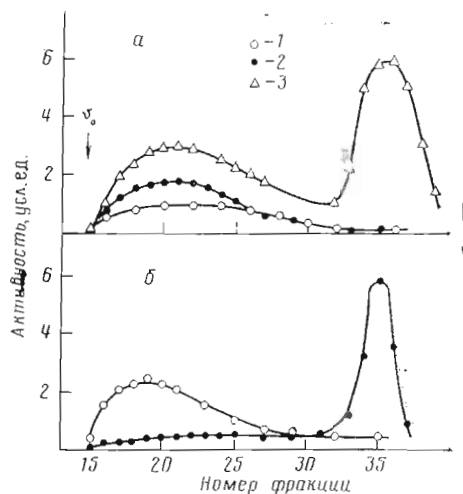


Рис. 2

Рис. 2. Гель-хроматография реакционных смесей на колонке с сефакрилом S-200, сверхтонким (1,5 × 100 см, 4° С, рН 8,0; 0,1 М трис-НСl, 1 М NaCl, объем фракции 2 мл): а — иммобилизация α -химотрипсина; условия иммобилизации и концентрации фермента (1) — (3) как на рис. 1, время реакции 1 ч; б — иммобилизация трипсина (25° С, рН 7,6; 0,1 М Нерес, 1 ч, концентрация трипсина 60 мкМ, концентрация полимера 75 мкМ) в отсутствие (1) и присутствии (2) 1 М NaCl

отношению фермент-приманка 1 : 5. Это, по всей вероятности, обеспечивается высоким сродством фермента к приманке ($K_m^{\text{каж}} = 10 \text{ мкМ}$ для фенилаланил-*n*-нитроанилидного полимера с расщепленными ангидридными группами [2]) при низкой скорости отщепления *n*-нитроанилида ($k_{\text{кат}} = 5 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ [2]). Остаток, образовавшийся на полимере по завершении гидролиза приманки (ацил-*L*-фенилаланин), является слабым обратным ингибитором иммобилизованного фермента: константа, $K_m^{\text{каж}}$ для гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина под действием иммобилизованного химотрипсина (0,80 мМ) лишь незначительно превышает $K_m^{\text{каж}}$ для нативного фермента (0,664 мМ [3]).

Поскольку отщепления *n*-нитроанилидных групп от носителя при обработке трипсином практически не наблюдалось, можно было думать, что связывание трипсина на этом носителе происходит намного менее эффективно по сравнению с химотрипсином. Действительно, при высоких концентрациях соли (1 М NaCl) лишь незначительное количество трипсина было иммобилизовано на полимере (рис. 2б, кривая 2).

Из кривой 1 на рис. 2б, однако, видно, что при низкой концентрации электролита трипсин, так же как химотрипсин, эффективно связывается с этим полимером. Это можно объяснить неспецифической ассоциацией положительно заряженного белка ($pI \approx 9$) с противоположно заряженным полиэлектролитом (см. [4, 5]). Таким образом, подбор рН среды и концентрации нейтральной соли имеют (при данном полимере) существенное значение для обеспечения селективности иммобилизации.

В итоге при удачном подборе носителя, приманки и условий реакции при ковалентном связывании можно достигать дополнительной очистки исходного ферментного препарата от балластных белков и других примесей. Выбором приманки может быть оптимизирована степень обратимого ингибирования и при необходимости стабилизации фермента аффинным лигандом.

Условия иммобилизации α -химотрипсина и трипсина приведены в подписях к рисункам. Активность α -химотрипсина определяли по начальной скорости гидролиза 3 мМ этилового эфира N-ацетил-L-тирозина (25° С, рН 7,6; 0,1 М NaCl, 1 мМ CaCl₂) на рН-стате; $K_m^{1ак}$ определяли в тех же условиях. Активность трипсина определяли по начальной скорости гидролиза 1,5 мМ этилового эфира N-бензоил-L-аргинина в тех же условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Páto J., Azori M., Tüdös F. // Makromol. Chem. Rapid Commun. 1982. V. 3. № 9. P. 643—647.
2. Azori M., Pato J., Fehérvári F., Tüdös F. // Makromol. Chem. 1986. V. 187. № 1. P. 303—309.
3. Березин И. В., Казанская Н. Ф., Клесов А. А. // Биохимия. 1971. Т. 36. № 1. С. 108—117.
4. Horn D., Heuck C.-C. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 3. P. 1665—1670.
5. Torchilin V. P., Tischenko E. G., Smirnov V. N. // J. Solid-Phase Biochem. 1977. V. 2. № 1. P. 19—29.

Поступило в редакцию
7.I.1988

AFFINITY IMMOBILIZATION OF ENZYMES. COUPLING OF CHYMOTRYPSIN WITH A WATER-SOLUBLE COPOLYMER OF MALEIC ANHYDRIDE AND N-VINYLPYRROLIDONE MODIFIED WITH N-(6-HEXANOYL)-L-PHENYLALANINE *p*-NITROANILIDE

SIKK P. F., PATO J.*, SINIJÄRV R. K., VALMSEN K. H.,
AZORI M.*, AAVIKSAAR A. A.

*Institute of Chemical Physics and Biophysics, Academy of Sciences
of the Estonian SSR, Tallinn;*

**Central Research Institute for Chemistry,
Hungarian Academy of Sciences, Budapest*

Modification of activated water-soluble or solid carriers with moieties which can be recognized by the active site of a desired enzyme should lead to preferential binding of the enzyme on the carrier. Provided that a coupling reaction occurs simultaneously outside the enzyme's active site, selective covalent attachment of the enzyme to the carrier could be achieved. The approach has been used for coupling of α -chymotrypsin with a water-soluble copolymer of maleic anhydride and N-vinylpyrrolidone modified with 6-aminohexanoyl-L-phenylalanine *p*-nitroanilide as a «bait» for the enzyme. All chymotrypsin from the solution is coupled to the polymer if the molar ratio is up to 1 mol/mol. On the other hand, only minor amounts of trypsin were attached to the polymer under similar conditions at high ionic strength (1 M NaCl); at low ionic strength substantial immobilization of trypsin due to nonspecific electrostatic binding of the reagents occurred.

The proposed approach might be of general use for selective immobilization of enzymes. Acceptable degree of the reversible inhibition and/or stabilization of the enzyme could be achieved by proper choice of the «bait».