



УДК 547.963.4'441.057 : 577.112.4

© 1990 г.

**МОДИФИКАЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ
И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ПОЛУЧЕННЫХ КОНЬЮГАТОВ***Кузнецова Н. П., Гудкин Л. Р., Самсонов Г. В.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

Исследованы электрохимические свойства макромолекул модифицированного гемоглобина, полученного путем поликонденсации его с глутаровым альдегидом. Используются методы потенциометрического титрования, электрофореза в полиакриламидном геле, ионообменной хроматографии, а для оценки величины изоэлектрической точки — метод распределения между двумя водными полимерными фазами. Введение дополнительных функциональных групп в макромолекулу возможно при использовании блокирующих реакцию поликонденсации агентов разной природы, что позволяет менять величину общего заряда и изоэлектрическую точку белка.

Модификация гемоглобина глутаровым альдегидом приводит к образованию сшитых белковых конъюгатов, в которых молекулы гемоглобина связаны между собой ковалентными связями посредством глутарового альдегида.

В работе исследуются изменения электрохимических свойств модифицированного гемоглобина совокупностью методов ионообменной хроматографии, потенциометрического титрования, диск-электрофореза в ПААГ, а также метода распределения между фазами, дающего оценку изоэлектрических точек белковых конъюгатов.

В основе модификации гемоглобина лежит реакция конденсации альдегидных групп глутарового альдегида и аминогрупп белка с образованием альдиминных связей. Реакция заканчивается добавлением блокирующего агента — боргидрида натрия, восстанавливающего как альдиминные, так и оставшиеся альдегидные группы. В результате образования внутри- и межмолекулярных связей количество аминогрупп белковой молекулы уменьшается [1]. Интенсивность реакции зависит от величины рН раствора, концентрации и соотношения компонентов в реакционной смеси. Высокомолекулярные растворимые конъюгаты, полидисперсные по размерам, содержат от 2 до 10 молекул гемоглобина и являются олигомерами гемоглобина (олигогемоглобинами) с молекулярной массой, кратной $65 \cdot 10^3$.

Оценка количества модифицированных функциональных аминогрупп белковой молекулы была проведена методом сопоставительного потенциометрического титрования одинаковых объемов равных концентраций двух образцов нативного гемоглобина и олигогемоглобина. Различия в кривых титрования в координатах рН — V (рис. 1а) отчетливо наблюдается в области рН 7,7—10,5; количество израсходованных на титрование миллиграмм-эквивалентов щелочи, избыточных для гемоглобина по сравнению с олигогемоглобином, эквивалентно количеству модифицированных α -концевых и ϵ -лизинных аминогрупп, титрующихся в этой области рН в белковом конъюгате. Результаты нескольких экспериментов по синтезу олигогемоглобина, проведенных в идентичных условиях, показали, что модифицируется 5,7—8,5 аминогрупп на молекулу гемоглобина, т. е. количество, равное миллиграмм-эквивалентам избыточной щелочи, пошедшей на титрование гемоглобина. Следовательно, при образовании олигогемоглобинов в выбранных условиях модифицируется 15—20% общего числа аминогрупп молекулы гемоглобина. Данные титрования, отражаю-

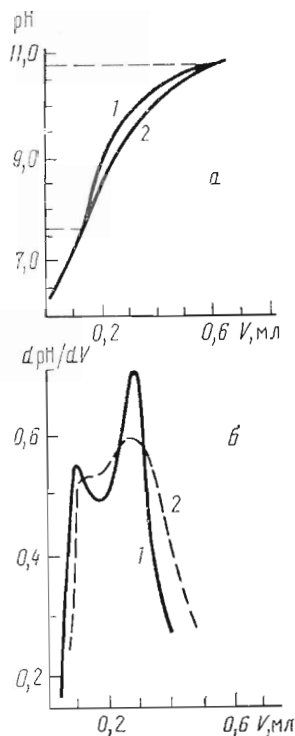


Рис. 1

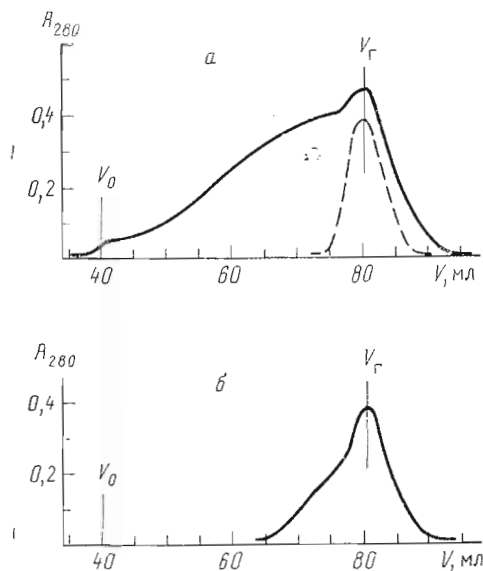


Рис. 2

Рис. 1. Потенциметрическое титрование равных количеств гемоглобина (1) и модифицированного гемоглобина (2) в координатах pH — V (количество мл 0,034 н. NaOH)

(а) и $\frac{d \text{pH}}{dV}$ — V (б)

Рис. 2. Гель-хроматография на сефарозе 6В ($1,8 \times 50$ см, 0,033 М фосфатный буфер, pH 7,4, скорость элюции 12 мл/ч) олигогемоглобина (а) и его фракции (б), выделенной ультрафильтрацией на мембране ХМ-100. V_0 — свободный объем колодки, V_G — место выхода нативного гемоглобина (штриховая линия — нативный гемоглобин)

щие буферную емкость растворов гемоглобина и олигогемоглобина (рис. 1б), также обнаруживают снижение буферной емкости растворов модифицированного гемоглобина.

Для завершения реакции поликонденсации гемоглобина с глутаровым альдегидом кроме боргидрида натрия возможно использование различных блокирующих агентов, которые способны взаимодействовать с непрореагировавшими альдегидными группами сшивающего агента. В зависимости от природы блокирующих агентов в макромолекулу белкового конъюгата могут вводиться дополнительные функциональные группы, что позволяет направленно изменять специфичность ферментов по отношению к ингибиторам [2]. Известно, что глутаровый альдегид может взаимодействовать с бисульфитом натрия [3], при этом в молекулу белка вводятся дополнительные сульфогруппы.

Исследование выделенной гель-хроматографией фракции модифицированного гемоглобина, соответствующего по молекулярной массе нативному белку (рис. 2), показало, что при поликонденсации не остается непрореагировавшего белка, а существует модифицированная глутаровым альдегидом молекула гемоглобина. Доказательством может служить различие в поведении нативного гемоглобина и фракции модифицированного гемоглобина в процессе ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-50. Как видно из рис. 3, нативный гемоглобин элюируется фосфатным буферным раствором с pH 7,4 (ионная сила 0,1). Элюция модифицированного аналога возможна только при увеличении ионной силы раствора добавлением NaCl до 0,5—0,6 М, что указывает на наличие значительного

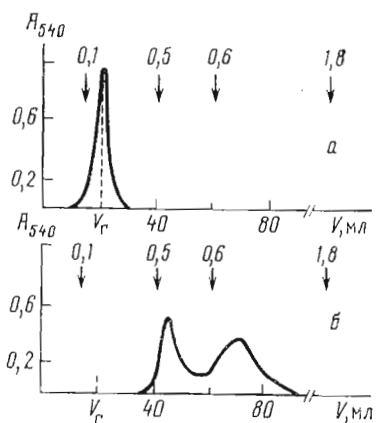


Рис. 3

Рис. 3. Хроматография на DEAE-сефадексе А-50 (1,4 × 34 см, 0,033 М фосфатный буфер, рН 7,4, с градиентом концентрации NaCl, скорость элюции 9 мл/ч) нативного (а) и модифицированного гемоглобинов (б). Цифры у стрелок — ионная сила раствора. V_r — место выхода нативного гемоглобина

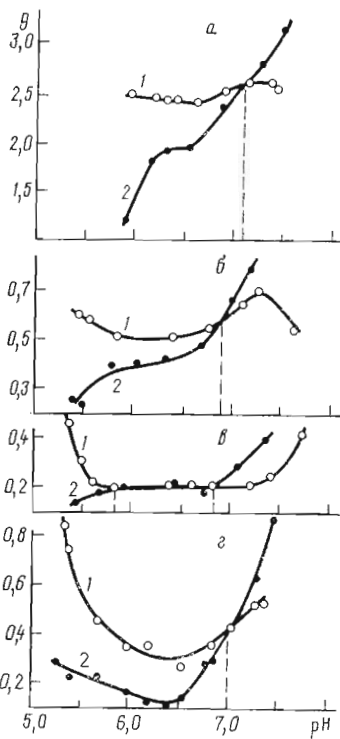


Рис. 4

Рис. 4. Распределение между двумя фазами гемоглобина (а) и олигогемоглобинов (б — г), модифицированных различными блокирующими агентами: глицином (б), бисульфитом натрия (в) и боргидридом натрия (г) в системе 40% ПЭГ-6000 — 7% декстран Т-500, содержащей 0,4 М NaCl (1) и 0,2 М Na₂SO₄

избыточного отрицательного заряда в молекуле модифицированного гемоглобина.

Олигогемоглобины полидисперсны по размеру макромолекул (рис. 2), но они также обладают значительной электрохимической гетерогенностью. Согласно данным электрофореза в ПААГ (табл.1) олигогемоглобин представляет собой набор продуктов, занимающих в геле широкую зону и имеющих различный, но более отрицательный заряд, чем нативный белок.

Добавление избыточного количества бисульфита натрия для завершения реакции поликонденсации гемоглобина и glutaraldehyde может оказать «расшивающее» действие на высокомолекулярные продукты реакции, вероятно, вследствие конкурирующего влияния бисульфита натрия на связывание аминогрупп с альдегидными. Добавления бисульфита натрия в соотношении 0,32 моль/моль альдегидных групп исходного glutaraldehyde недостаточно для блокирования всех непрореагировавших с белком альдегидных групп и реакция сшивания продолжается (\bar{M}_w увеличивается) (табл. 2). Соответствующее соотношение, равное 0,43, не дает возможности дальнейшего видимого протекания реакции образования высокомолекулярных производных, величина \bar{M}_w остается постоянной (на уровне исходного): все непрореагировавшие с белком альдегидные группы заблокированы бисульфитом натрия. Увеличение содержания бисульфита приводит к «расшиванию» полимерного белкового производного — величина \bar{M}_w падает с $270 \cdot 10^3$ до $130 \cdot 10^3$.

Использование различных блокирующих агентов позволяет варьировать величину общего заряда и смещать изоэлектрическую точку (pI) модифицированных белковых конъюгатов. Изоэлектрическую область

Электрофоретическая подвижность белков в ПААГ ($m \cdot 10^5$, см/В·с)

Белок	Концентрация ПААГ, %		
	3,85	5,1	7,2
Гемоглобин нативный	2,65	2,4	1,95
Олигогемоглобин	2,75–3,25	2,55–3,0	1,9–2,25
Сывороточный альбумин	3,35	3,75	2,65

Таблица 2

Влияние добавления бисульфита натрия на изменение величины среднemasовой молекулярной массы (\bar{M}_w) олигогемоглобинов в ходе реакции с глутаровым альдегидом *

$[\text{NaHSO}_3]/\left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} \right]$, моль/моль	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$
0,0	270
0,32	330
0,43	250
0,64	220
1,07	170
1,51	130

* Добавление варьируемого количества бисульфита натрия проводили после реакции поликонденсации гемоглобина с глутаровым альдегидом в течение 1 ч при pH 6,7 [8].

белковых макромолекул возможно оценить методом распределения между фазами неионогенных полимеров в двухфазных водных системах, содержащих декстран и полистирилгликоль [4, 5]. Избирательное распределение макромолекул достигается в основном за счет небольших различий при взаимодействии с растворителем в каждой из фаз и связано с поверхностными свойствами макромолекул, прежде всего с их суммарным зарядом. Распределение молекул между двумя фазами характеризуется распределительным соотношением g (см. «Экспериментальную часть»), величина которого зависит от молекулярной массы исследуемого вещества. Величина pH, при которой пересекаются две кривые, характеризующие зависимость g от pH для систем с соевыми растворами 0,4 M NaCl или 0,2 M Na_2SO_4 , характеризует изоэлектрическое состояние исследуемых макромолекул (рис. 4). Так, для нативного гемоглобина (рис. 4а) величина pH, соответствующая изоэлектрической точке белка, составляет $\sim 7,0-7,1$ при заданной ионной силе раствора. Использование в качестве блокирующего агента при синтезе олигогемоглобина глицина, боргидрида натрия или лизина практически не сказывается на величине pI (табл. 3). Применение бисульфита натрия приводит к появлению изоэлектрической области (pH 5,8–6,9), смещенной по сравнению с нативным белком в кислую область, тогда как блокирование трисом смещает величину pI в слабощелочную область. Таким образом, модификация низкомолекулярными реагентами позволяет варьировать величину общего заряда макромолекул олигогемоглобина.

Экспериментальная часть

В работе использовали гемоглобин крови человека, полученный осмотическим гемолизом эритроцитов донорской крови. Предварительно эритроциты отмывали 1,6 и 0,9% растворами NaCl. Осмотический гемолиз проводили добавлением двух объемов охлажденной воды к 1 объему эритро-

Величины pI образцов олигогемоглобина, модифицированных рядом низкомолекулярных реагентов (см. рис. 4)

Модификатор	pI	Модификатор	pI
NaHSO ₃	5,7–6,9	NaBH ₄	7,0–7,1
Лизин	6,8–6,9	Трис	7,3–7,4
Глицин	6,8–6,9		

цитной массы. Время гемолиза 1 ч при 4° С. Стромальные элементы удалялись скоростным центрифугированием. Концентрацию гемоглобина определяли спектрофотометрически при 540 нм в виде ацетонциангидринового производного [6]. Использовали водный раствор глутарового альдегида (Reanal, Венгрия), предварительно очищенного вакуумной перегонкой; глицин, лизин солянокислый (Reanal, Венгрия), трис (Союзреактив). Бисульфит натрия был получен по методу [7].

Поликонденсацию гемоглобина с глутаровым альдегидом проводили по методу [8], количество блокирующего агента добавляли эквивалентно исходному количеству глутарового альдегида.

Электрофорез в ПААГ по методу Маурера [9] проводили в трис-глициновом буфере, pH 8,3. Пробы наносились по 100 мкг на гель. Время электрофореза 1,5 ч при напряжении электрического поля 30 В/см. Гели окрашивали 1% амидочерным 10 Б в 7% уксусной кислоте.

Потенциометрическое титрование растворов гемоглобина и олигогемоглобина проводили на регистрирующей системе для титрования (Radiometer, Дания): объем раствора 10 мл, концентрация по гемоглобину 1,3 мг/мл. Растворы предварительно диализовали против 0,15 М NaCl; величина pH исходных растворов доводилась непосредственно перед титрованием до 5,8. Титрование проводили в автоматическом режиме 0,034 н. NaOH при 22° С.

Для межфазного разделения белковых макромолекул по Альбертсону [10] использовали декстраны Т-500 (Fergak, Берлин) в концентрациях 14% (по массе) и полиэтиленгликоль-6000 (Lobo, Австрия) в концентрации 40% (по массе). Готовили две серии растворов, каждая содержала равные исходные объемы двух водных полимерных фаз, 1 объем раствора соли (0,4 М NaCl или 0,2 М Na₂SO₄) и 1 объем 0,04 М фосфатного буферного раствора в интервале pH 5,5–8,0. Затем в каждую пробирку добавляли 0,1 мл исследуемого раствора олигогемоглобина или нативного гемоглобина, содержащего ~2 мг белка. Содержимое пробирок тщательно встряхивали и оставляли при 4° С для расслаивания. Лучшее разделение фаз осуществлялось при центрифугировании этих растворов. В каждой фазе определяли концентрацию гемоглобина, pH и ее объем. Определяли распределительное соотношение g , равное произведению соотношения концентрации гемоглобина в фазах на соотношение их объемов. Для обеих солевых систем (NaCl и Na₂SO₄) строили зависимость g от pH. Точка пересечения кривых принималась за изоэлектрическую точку белкового компонента [4, 5].

Гель-хроматографию проводили на сефарозе 6В (Pharmacia, Швеция), колонка 1,8 × 50 см, элюция 0,033 М фосфатным буфером, pH 7,4, скорость элюции 12 мл/ч. Условия хроматографии на DEAE-сефадексе А-50 (Pharmacia, Швеция) — колонка 1,4 × 34 см, элюция 0,033 М фосфатным буфером, pH 7,4, с градиентом концентрации NaCl, скорость элюции 9 мл/ч.

Ультрафильтрация проводилась в ячейке с перемешиванием на мембране ХМ-100 (Amicon, США) при давлении 0,3 атм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 3. С. 643–648.
2. Гаврилова Н. Н., Генникова Т. А. // Тез. XIX научной конф. ИВС АН СССР. Л., 1979. С. 66.

3. Margel S. // J. Polymer Sci. 1984, V. 22, № 1, P. 3521—3533.
4. Walter H., Sasakawa S. // Biochemistry. 1971, V. 10, P. 108—113.
5. Sasakawa S., Walter H. // Biochemistry. 1972, V. 11, P. 2760—2766.
6. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Л.: Медицина, 1968. С. 23.
7. Карякин Ю. В., Ангелов И. И. Чистые химические реактивы. М.: ГНТИ хим. литературы. С. 379.
8. Keipert P. E., Chang T. M. S. // Appl. Biochem. and Biotechnol. 1984, № 10, P. 133—141.
9. Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971.
10. Альбертсон П.-О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. М.: Мир, 1974.

Поступила в редакцию
25.X.1988

После доработки
24.V.1989

MODIFICATION OF HAEMOGLOBIN BY GLUTARIC ALDEHYDE AND INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF RESULTING CONJUGATES

KUZNETSOVA N. P., GUDKIN L. R., SAMSONOV G. V.

*Institute of Macromolecular Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Leningrad*

Electrochemical properties of macromolecules of modified haemoglobin obtained by polycondensation with glutaric aldehyde have been investigated by means of potentiometric titration, PAG-electrophoresis, ion-exchange chromatography, and (for evaluation of isoelectric point) distribution between two aqueous polymeric phases. Introduction of additional functional groups into the macromolecule is possible by using various agents blocking polycondensation, which makes it possible to change the resulting charge and the isoelectric point.