



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152

© 1993 Л. М. Якуницкая, О. М. Ермолаева,  
М. А. Самарцев, С. В. Куликов

ПРИМЕНЕНИЕ АРИЛСУЛЬФЕНИЛХЛОРИДОВ ДЛЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ  
ФИБРИНОГЕНА ПО ОСТАТКАМ МЕТИОНИНА

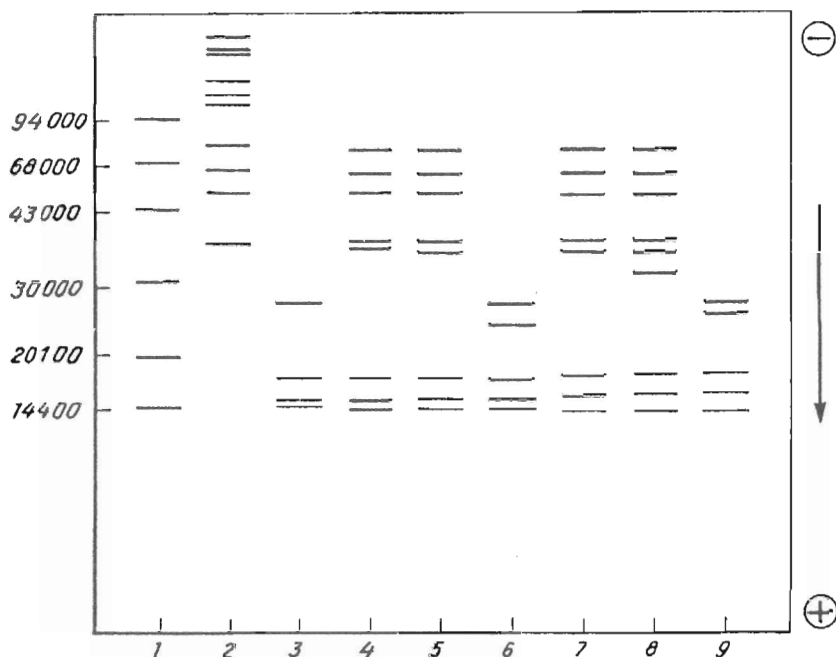
*Научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург*

Тканевый активатор плазминогена (ТАП) является важнейшим компонентом-регулятором системы свертывания крови, одним из перспективных объектов генно-инженерной технологии [1]. Существенное его отличие от экзогенных активаторов — урокиназы и стрептокиназы — состоит в том, что ТАП способен активировать плазминоген (или гидролизовать имитирующий его субстрат), только будучи связанным в комплекс с фибрином или его макромолекулярными фрагментами [2]. По этой причине при определении активности ТАП с помощью хромогенного субстрата [3] в качестве необходимого компонента реакции используют смесь водорастворимых фрагментов фибриногена. Для получения последних фибриноген расщепляют по пептидным связям, образованным карбоксильной группой метионина, с помощью бромциана [3]. Эта реакция широко используется при исследовании структуры белков [4], для получения маркеров молекулярных масс [5, 6] и имеет особое значение в процессах выделения рекомбинантных белков [7]. Однако при масштабировании высокая токсичность бромциана создает проблемы, связанные с безопасностью проведения работ.

В настоящей работе на примере фрагментации фибриногена исследован альтернативный метод расщепления метионил-пептидных связей с помощью арилсульфенилхлоридов [8].

Расщепление фибриногена (50 мг) бромцианом (65 мг) проводили в 5 мл 70% муравьиной кислоты, как описано ранее [3]. *o*-Нитрофенилсульфенилхлорид [9] и 2-пиридилсульфенилхлорид получали хлорированием соответствующих дисульфидов в растворе четыреххлористого углерода непосредственно перед применением. При этом раствор 2-пиридилсульфенилхлорида после синтеза упаривали, остаток растворяли в гексане и после выдерживания в холодильнике отделяли нерастворимый осадок дисульфида, а фильтрат упаривали досуха, высушивали в вакууме над щелочью и, аналогично работе [10], использовали маслообразный продукт без дальнейшей очистки, поскольку небольшая примесь растворимого в кислых водных средах дисульфида не мешает проведению реакции.

Реакцию фибриногена (25—30 мг) с сульфенилхлоридами при весовых отношениях, указанных в подписи к рисунку, проводили 3 ч в 2 мл безводной муравьиной кислоты при комнатной температуре и завершали перемешиванием в течение 15 ч с добавлением 0,6 мл воды. Реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды (4×5 л), определяли объем диализата и концентрацию белка в растворе по его оптическому поглощению при длине волны 280 нм. Выходы по белку составляли 60—90%. Приведенные на рисунке ре-



Электрофорез образцов фибриногена и продуктов его расщепления: 1 — стандартная смесь белков (слева указаны молекулярные массы), 2 — исходный фибриноген, 3 — продукты расщепления бромцианом, 4, 5, 6 — продукты расщепления 2-пиридилсульфенилхлоридом при весовом соотношении фибриногена и реагента 1:2, 1:5 и 1:10 соответственно; 7, 8, 9 — продукты расщепления *o*-нитрофенилсульфенилхлоридом при весовом соотношении фибриногена и реагента 2:1, 1:1 и 1:2 соответственно. Условия электрофореза: прибор Multiphor (Pharmacia, Швеция), 12,5% ПААГ, 70×75×1 мм, трис-глициновый буфер, pH 8,3, с 0,1% додецилсульфата натрия и 0,2% меркаптоэтанола

зультаты электрофореза в денатурирующих условиях показывают, что для получения смеси фрагментов с таким же интервалом молекулярных размеров, как при расщеплении бромцианом, необходимо использовать, по отношению к фибриногену, 2-кратный весовой избыток *o*-нитрофенилсульфенилхлорида и 10-кратный — 2-пиридилсульфенилхлорида.

Активирующий эффект полученных фрагментов фибриногена на гидролиз хромогенного субстрата (*D*-валил-*L*-лейцил-*L*-лизин-*p*-нитроанилида) под действием ТАП оценивали по методике [3], используя в каждом определении по 20 мкл раствора продуктов фрагментации с концентрацией белка 1,1—1,2 мг/мл. В таблице приведены значения поглощения при 405 нм, скорректированные на поглощение в контрольном опыте (спонтанный гидролиз субстрата в отсутствие

Определение ферментативной активности ТАП с применением полученных разными способами фрагментов фибриногена

Реагент для расщепления	$A_{405}$ при концентрации ТАП, ед. акт./мл			
	50,0	5,0	2,5	1,25
Бромциан	1,478	0,650	0,303	0,262
2-Пиридилсульфенилхлорид	1,500	0,603	0,285	0,235
<i>o</i> -Нитрофенилсульфенилхлорид	1,466	0,640	0,307	0,272

\* Хромогенный субстрат *D*-Val-Leu-Lys-pNA; приведены средние значения из трех параллельных опытов.

ТАП). Эти результаты показывают, что и по влиянию на гидролиз субстрата под действием ТАП полученные смеси фрагментов идентичны бромциановым фрагментам фибриногена. Таким образом, арилсульфенилхлориды могут рассматриваться как адекватная замена бромциана в реакции специфического химического расщепления белков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пилипенко А. И., Ценин А. Н., Ермолаева О. М., Лонская Н. Е. Свойства, получение и возможности клинического применения рекомбинантного тканевого активатора плазминогена/Химико-фармацевтическое производство: Обзорная информация. М.: ВНИИСЭНТИ, 1991. 38 с.
2. Verheijen J. H.//Thrombos. Res. 1982. V. 27. № 4. P. 377—385.
3. Verheijen J. H., Nieuwenhuizen W.//Европ. заявка. EP № 94720. 1986.
4. Практическая химия белка//Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989.
5. Hashimoto F., Horigome T., Kanbayashi M., Yoshida K., Sugano H.//Anal. Biochem. 1983. V. 129. № 1. P. 192—199.
6. Wilgus H., Stellwagen E.//Anal. Biochem. 1979. V. 94. № 1. P. 228—230.
7. Uhlén M., Moks T., Abrahmsén L.//Biochem. Soc. Trans. 1988. V. 16. № 2. P. 111—112.
8. Galpin Y. Y., Hoyland D. A.//Tetrahedron. 1985. V. 41. № 4. P. 895—900.
9. Синтезы органических препаратов. Т. 2/Ред. А. Блэтт. М.: ИЛ, 1949. С. 560—562.
10. Шевалье А. Ф., Офицеров В. И., Самуков В. В.//Журн. общ. химии. 1985. Т. 55. № 9. С. 2152.

Поступило в редакцию  
23.VII.1992

*L. M. Yakunitskaya, O. M. Yermolaeva, M. A. Samartsev, S. V. Kulikov*

#### THE USE OF ARYLSULFENYLCHLORIDES FOR FRAGMENTATION OF FIBRINOGEN AT METHIONINE RESIDUES

*Research Institute of Pure Biochemicals, St.-Petersburg*

Conditions for the fibrinogen fragmentation with 2-pyridyl- or *o*-nitrophenylsulfenylchloride were proposed. Resulting mixture of fragments is identical to the mixture prepared by the cyanogen bromide treatment and is suitable as supplementary analytical reagent in the determination of the tissue plasminogen activator (TPA) activity with a chromogenic substrate.