



УДК 547.96.02:543.544

МИКРОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ
ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩЕГО С СОРБЕНТОМ БЕЛКА*Мальцев В. Г., Курейкин О. И., Зилина Т. М.,
Виленич Л. З., Готлиб Ю. Я., Бельский В. Г.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

Разработаны принципы хроматографического определения равновесных констант димеризации белка в двухкомпонентной системе при взаимодействии с сорбентом мономера и ассоциата. На основании экспериментальной концентрационной зависимости средневесового и z -среднего объема элюции переднего фронта хроматограммы удастся не только определить константу равновесия, но и рассчитать изотермы адсорбции компонентов. Методика апробирована при исследовании ассоциации лизоцима методом микроколоночной хроматографии на декстрановом и полиакриламидном гелях. Для обоих сорбентов получены одинаковые значения константы равновесия, хотя механизмы адсорбции в разных гелях, по-видимому, различны. Определенная таким образом константа димеризации лизоцима хорошо согласуется с литературными данными по равновесной седиментации.

Ассоциация белков тесно связана с их биологической функцией. Особенно ярко выражена роль обратимых реакций ассоциации-диссоциации при осуществлении метаболического контроля ферментативной активности. Смещение равновесия между активной и неактивной формами фермента, имеющими различную степень ассоциации, при изменении температуры, рН или связывании низкомолекулярного лиганда, — таков один из вероятных механизмов контроля активности для многих ферментов [1]. Большое распространение при исследовании равновесия и кинетики ассоциации белков получил метод фронтальной эксклюзионной хроматографии [2—5]. При использовании этого метода константы равновесия реакции ассоциации можно получить по концентрационной зависимости средневесового объема элюции (коэффициента распределения) [2, 5], а кинетические параметры — по зависимости дисперсии фронта от общей концентрации белка [6, 7].

Метод основан на том, что при фронтальном анализе на плато концентрационного профиля устанавливается постоянный состав, а центры тяжести переднего и заднего фронта движутся с постоянной скоростью, причем их элюционный объем является средневесовой величиной для компонентов реакции [2].

Микроколоночный вариант этого метода особенно удобен [7, 8], так как позволяет сократить до нескольких миллиграммов необходимое для исследования ассоциации количество белка.

Отсутствие взаимодействия белка с сорбентом является необходимой предпосылкой для интерпретации экспериментальных данных в рамках теории эксклюзионной хроматографии реагирующих макромолекул [2—4]. Однако даже такие инертные по отношению к белкам сорбенты, как шпигель-декстран (сефадекс) или полиакриламид (биогель), все-таки вступа-

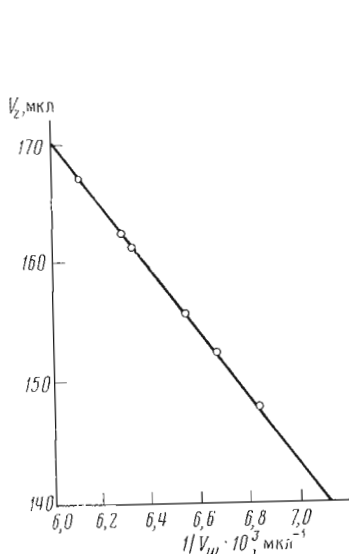


Рис. 1

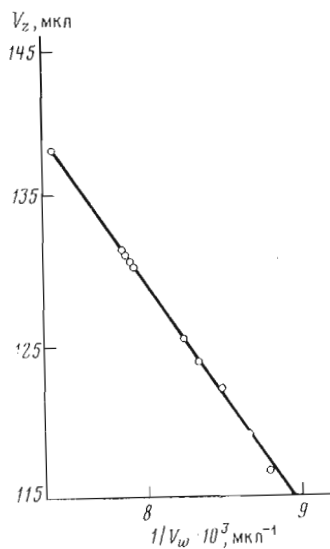


Рис. 2

Рис. 1. Экспериментальная зависимость $V_z(c_0)$ от $V_w^{-1}(c_0)$ для сефадекса G-75

Рис. 2. Экспериментальная зависимость $V_z(c_0)$ от $V_w^{-1}(c_0)$ для биогеля Р-60

ют во взаимодействие с некоторыми белками [9, 10]. Поэтому представляет интерес разработка методической основы для хроматографического определения констант равновесия ассоциации белка при наличии адсорбции в хроматографической системе. В этом случае определяемая из эксперимента концентрационная зависимость средневесового объема элюции отражает не только увеличение весовых долей ассоциатов при повышении концентрации белка, но и нелинейность изотерм адсорбции всех компонентов реакции. В настоящей работе рассматривается возможность определения из хроматографических данных константы равновесия в системе адсорбирующийся мономер — адсорбирующийся ассоциат и изотерм адсорбции мономера и ассоциата. В качестве объекта экспериментального исследования выбран лизоцим (КФ 3.2. 1.17), так как известно, что этот белок взаимодействует с декстраном и полиакриламидом [9], а ассоциация фермента достаточно хорошо изучена методом равновесной седиментации [11, 12].

Для количественной характеристики реакции ассоциации-диссоциации прежде всего необходимо определить ее стехиометрию и число компонентов, участвующих в реакции. Согласно литературным данным по исследованию лизоцима [11, 12], ассоциация фермента происходит по схеме мономер — димер. Для системы из двух не взаимодействующих компонентов в хроматографическом эксперименте должна наблюдаться линейная зависимость z -среднего объема элюции V_z от обратной величины средневесового объема элюции $1/V_w$ [12]:

$$V_z = (V_1 + V_n) - V_1 V_n V_w^{-1}, \quad (1)$$

где V_1 и V_n — удерживаемые объемы, соответствующие мономеру и n -меру.

Зависимость 1 следует из определений V_w и V_z для двухкомпонентной системы:

$$V_w \equiv \frac{V_1 c_1 + V_n c_n}{c_1 + c_n} \quad \text{и} \quad V_z \equiv \frac{V_1^2 c_1^2 + V_n^2 c_n^2}{V_1 c_1 + V_n c_n},$$

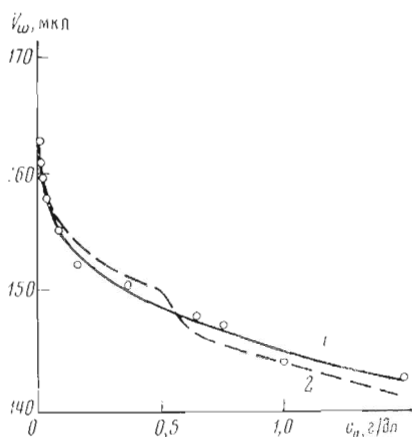


Рис. 3

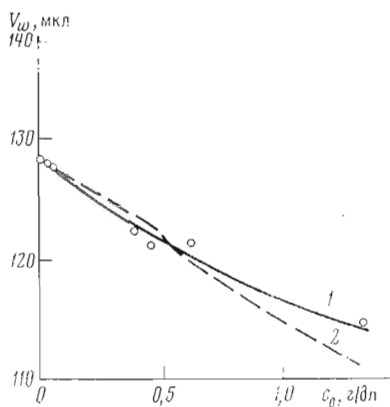


Рис. 4

Рис. 3. Концентрационная зависимость V_w для сефадекса G-75: 1 — кривая, рассчитанная по приведенным в статье параметрам K , c_{01} , α_1 , c_{02} , α_2 ; 2 — рассчитанная кривая с увеличенной вдвое константой равновесия K

Рис. 4. Концентрационная зависимость V_w для био-геля Р-60. Обозначения соответствуют рис. 3

где c_1 и c_n — концентрации мономера и n -мера.

Из хроматограммы ассоциирующего белка можно определить величины

$$V'_w = \int_0^{c_0} V(c) dc / c_0 \quad (2)$$

и

$$V'_z = \int_0^{c_0} V^2(c) dc / \int_0^{c_0} V(c) dc, \quad (3)$$

где V'_w и V'_z — величины V_w и V_z , измеряемые экспериментально; $V(c)$ — элюционный объем, соответствующий определенным концентрационным точкам на хроматограмме; c_0 — равновесная концентрация вещества на плато хроматографической зоны.

В работе [13] показано, что V_w равно V'_w , за исключением случая сопоставимых друг с другом скоростей реакции и хроматографического разделения компонентов. С другой стороны, если пренебречь хроматографическим размыванием, то, как следует из работы [3], V_z отличается от V не более чем на 6%. Поэтому линейная связь V_z с V_w^{-1} в двухкомпонентной системе сохраняется и при наличии взаимодействия, а V_z и V_w в этом случае являются функциями общей концентрации белка.

Рассмотрим поправку к величине V'_z , определенной по формуле 3, вносимую хроматографическим размыванием. Дисперсию, связанную с наличием в системе двух взаимодействующих компонентов, можно определить как $\sigma_{V_0}^2 = V_z V_w - V_w^2$ (это соотношение вытекает из определений V_z и V_w). Тогда по закону аддитивности дисперсий, с учетом вклада хроматографического размывания, имеем

$$V'_z = \frac{\sigma_{V_0}^2 + \sigma_V^2 + V_w^2}{V_w} = V_z + \frac{\sigma_V^2}{V_w} = V_z + \frac{1}{N} V_w, \quad (4)$$

где σ_V^2 — дисперсия объема элюции, связанная с диффузионным размыва-

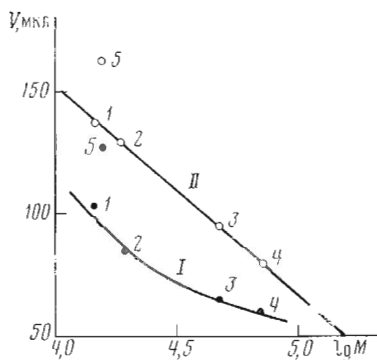


Рис. 5

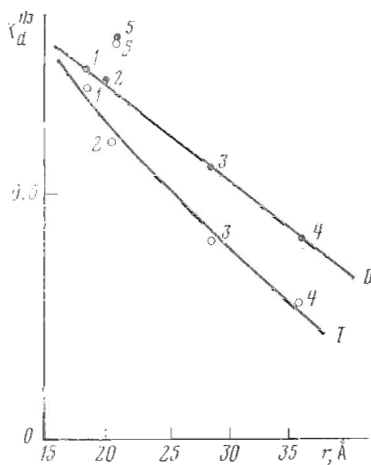


Рис. 6

Рис. 5. Калибровочные зависимости объема элюции от молекулярной массы: для биогеля Р-60 (I), для сефадекса G-75 (II); 1 — рибонуклеаза, 2 — миоглобин, 3 — овальбумин, 4 — бычий сывороточный альбумин, 5 — лизоцим-мономер

Рис. 6. Калибровочная зависимость объемов элюции от стоксова радиуса (корреляция Пората). Обозначения соответствуют рис. 5

нием фронта, $N = V_w^2 / \sigma_v^2$ — число теоретических тарелок. В соотношении 4 подразумевается одинаковая величина N для мономера и ассоциата. Определенная по реперным белкам величина N в интервале молекулярных масс 12 400 (цитохром *c*) — 67 000 (бычий сывороточный альбумин) практически не зависит от молекулярной массы: $N = 50 \pm 5$. Таким образом, поправка на диффузионное размывание ($V'_2 - V_2$) равна $0,02 V_w$.

Линейность зависимости 1, исправленной в соответствии с выражением 4, должна подтвердить присутствие только двух компонентов в исследуемой системе и позволить найти объемы элюции мономера и n -мера по определенным из хроматограммы величинам V'_w и V'_z для разных концентраций белка.

На рис. 1, 2 представлена зависимость V_2 от V_w^{-1} , полученная экспериментально для различных значений концентрации раствора белка (c), изменяющейся в пределах 10^{-4} — 1,5 г/дл. Видно, что эта зависимость линейна. Аппроксимируя ее уравнением 1 с учетом выражения 4, можно получить значения V_1 и V_n , равные 163 и 157,2 мл для сефадекса и 127,6 и 120,4 мл для биогеля соответственно. Экстраполяция к нулевому значению c_0 концентрационных зависимостей V_w лизоцима, полученных на этих сорбентах (ситуация, когда в растворе находится практически только мономер), в пределах погрешности дает те же значения V_1 для мономера (рис. 3, 4), что подтверждает правомерность использования зависимости 1 для нахождения элюционных объемов компонентов реакции.

Полученные таким образом значения V_1 и V_n существенно превышают найденные по калибровочным кривым (рис. 5, 6) величины V_1 и V_2 , отвечающие молекулярному весу лизоцима 14 400 [14] и стоксову радиусу 20 Å [15], что указывает на существование адсорбционного взаимодействия лизоцима с матрицей декстранового или полиакриламидного геля. В случае сефадекса, очевидно, имеет место взаимодействие типа фермент-субстратного, так как этот гель подобен полисахаридному субстрату лизоцима. Наличие адсорбции лизоцима декстрановым или полиакриламидным гелем наблюдалось и другими авторами [9].

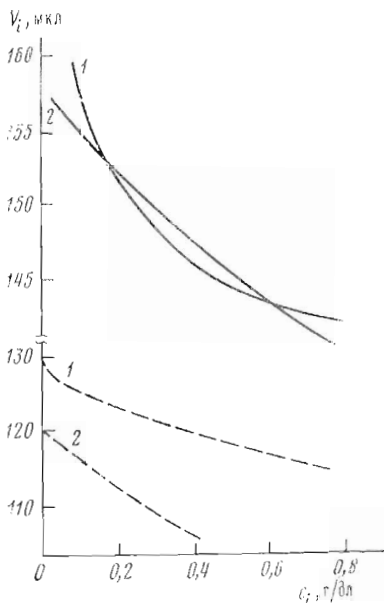


Рис. 7

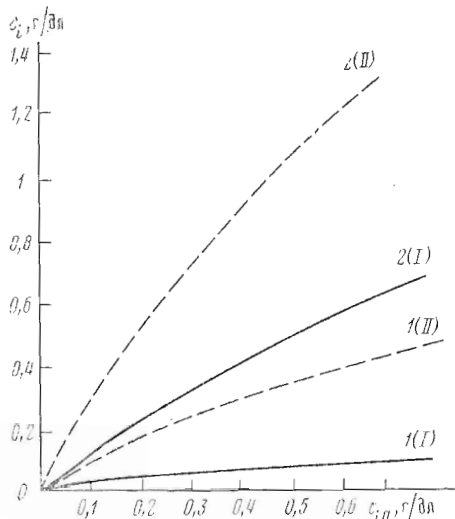


Рис. 8

Рис. 7. Концентрационная зависимость удерживаемых объемов мономера (1) и димера (2) лизоцима для сефадекса G-75 (непрерывные линии) и биогеля Р-60 (пунктирные линии)

Рис. 8. Изотермы адсорбции мономера (1) и димера (2) лизоцима для сефадекса G-75 (I) и биогеля Р-60 (II)

Для отдельного рассмотрения вклада адсорбции и вклада ассоциации в экспериментальную зависимость V_w от c_0 необходимо задать вид изотермы адсорбции компонентов исследуемой реакции. Будем считать, что закономерности адсорбции лизоцима определяются изотермой Ленгмюра

$$K_{oi} \equiv \bar{q}_i/q_{in} = \bar{c}_{oi}/(\alpha_i + K_{di}c_i); \quad i = 1, n, \quad (5)$$

где \bar{q}_i — количество сорбированного белка, а q_{in} — равновесное количество белка в порах. Входящие сюда коэффициенты \bar{c}_{oi} могут трактоваться как предельные концентрации адсорбированного белка при насыщении всех адсорбционных центров; c_i — концентрация i -мера на плато хроматографической зоны, параметры α_i характеризуют величину адсорбционного взаимодействия, K_{oi} — коэффициент адсорбции и $K_{di} = q_{in}/q_i$ — массовый коэффициент распределения, где q_i — равновесное количество белка в подвижной фазе. Для белка трудно предположить возможность многослойной адсорбции (вогнутая изотерма), более того, экспериментальные данные по многим белкам [3] свидетельствуют в пользу выпуклой изотермы типа 5. Выбор K_{oi} в виде выражения 5 предполагает также отсутствие конкуренции молекул разных компонентов за адсорбционные центры.

При наличии адсорбции с коэффициентом K_{oi} хроматографическую систему удобно рассматривать как трехфазную, состоящую из подвижной фазы объема (V_0), порового пространства (V_n) и адсорбционного слоя на внутренней поверхности сорбента. В этом случае удерживаемые объемы V_i рассчитываются по формуле [16]

$$V_i = V_0 + V_n K_{di} (1 + K_{oi}), \quad (6)$$

где K_{di} — коэффициент распределения i -го компонента между подвижной и неподвижной фазами в отсутствие взаимодействия, т. е. при $K_{oi} = 0$; K_{di} легко определяется из калибровочных зависимостей рис. 5 и 6.

Заменяя V_1 и V_n в уравнении 1 их значениями, рассчитанными по формуле 6 с учетом выражения 5, получим

$$V_z \cong (V_{01} + V_{0n}) - V_{01}V_{0n}V_w^{-1}, \quad (7)$$

где

$$V_{01} = V_0 + V_{II}K_{d_i}(1 + c_{01}/\alpha_1),$$

$$V_{0n} = V_0 + V_{II}K_{d_n}(1 + c_{0n}/\alpha_n). \quad (8)$$

Равенство 7 означает, что величины V_1 и V_n , входящие в соотношение 1, следует рассматривать как объемы элюции компонентов при экстраполяции к нулевой концентрации.

Для определения константы равновесия ($K=c_2/c_1^2$, где c_1 и c_2 — концентрации мономера и димера соответственно) реакции ассоциации-диссоциации лизоцима использовали метод, развитый в работах [2—4, 13]. При этом в соответствии с [11, 12] считали, что степень ассоциации лизоцима $M_n/M_1=2$. В отсутствие адсорбции степень ассоциации лизоцима можно было бы определить из калибровки по молекулярной массе (на основе аддитивности масс) или стоксову радиусу (на основе линейной модели или модели слияния в одну сферу). Выражение для средневесового удерживаемого объема V_w как функции общей концентрации белка c_0 может быть записано в виде

$$V_w(c_0) = \frac{V_1 + Kc_1V_2}{1 + Kc_1}, \quad (9)$$

причем концентрация мономера на плато c_1 может быть выражена через c_0 и K из следующих соотношений, определяющих условия равновесия:

$$Kc_1^3 = c_2, \quad c_1 + c_2 = c_0. \quad (10)$$

Уравнение 9 в совокупности с уравнениями 5, 6 и 10 позволяет определить константу равновесия K , добиваясь наилучшего совпадения экспериментальной концентрационной зависимости $V_w(c_0)$ с рассчитанной по формуле 9 путем варьирования параметров α_1 , α_2 и K методом наименьших квадратов. Таким образом, число параметров, подлежащих определению и входящих в уравнение 5, сократилось с пяти до трех, поскольку из зависимости 7 уже определены величины V_{01} и V_{02} , связанные с соотношениями c_{01}/α_1 и c_{02}/α_2 в уравнении 8.

Были получены следующие значения c_{0i} ($i=1,2$) и формулы для расчета удерживаемых объемов компонентов на сефадексе: c_{01} 0,045 г/дл, c_{02} 0,48 г/дл,

$$V_1 = 135,4 + \frac{3,02}{0,11 + 0,39 \cdot c_1} \text{ мкл}, \quad (11)$$

$$V_2 = 108 + \frac{19,2}{0,38 + 0,23 \cdot c_2} \text{ мкл}, \quad (12)$$

на биогеле: c_{01} 0,29 г/дл, c_{02} 0,27 г/дл,

$$V_1 = 93,8 + \frac{10,6}{0,31 + 0,194 \cdot c_1} \text{ мкл}, \quad (13)$$

$$V_2 = 73 + \frac{4}{0,083 + 0,081 \cdot c_2} \text{ мкл}. \quad (14)$$

На рис. 7 приведены графики зависимостей, следующих из формул 11—14. При этом для обоих сорбентов константа равновесия K имеет значение $0,9 \pm 0,2$ дл/г.

Существенно подчеркнуть, что получена одинаковая величина K при хроматографии на двух различных по химической природе сорбентах. Это свидетельствует о правомерности учета вклада адсорбции в зависимость $V_w(c_0)$ с помощью изотермы Ленгмюра. Определенную нами величину K можно сопоставить с литературными данными по седиментационному равновесию [11], где для нее получено значение 0,35 дл/г, что можно считать удовлетворительным соответствием. Однако в работе [11] из экспериментальной зависимости среднемолекулярной массы (\bar{M}_w) от общей концентрации белка в области низких концентраций ($c \leq 0,1$ г/дл) были получены значения $\bar{M}_w < M_1 = 14400$, причем отличия достигали $1,2 \cdot 10^3$ г/моль. Это расценивалось как артефакт и не использовалось при расчете K . Если вместо принятого в работе [11] значения парциального удельного объема лизоцима $\bar{V} = 0,726$ см³/г считать его равным 0,74 см³/г, что близко к верхнему пределу определенных в литературе значений [17], то все экспериментальные данные [11], включая область малых концентраций, находятся в соответствии с величиной K 1 дл/г, что очень хорошо согласуется с нашими результатами.

На рис. 3 и 4 приведены экспериментальные и рассчитанные концентрационные зависимости при найденных значениях параметров. Для сравнения на этих же рисунках пунктиром показаны рассчитанные концентрационные зависимости при увеличении константы ассоциации K вдвое и значениях остальных параметров, найденных методом наименьших квадратов. Зависимости существенно отклоняются от экспериментальных, что является еще одним свидетельством в пользу найденных значений параметров α_1 , α_2 и K .

Зная эти величины, нетрудно рассчитать изотермы адсорбции мономера и димера на сефадексе и биогеле. Соответствующие графики приведены на рис. 8. Видно, что для полиакриламидного геля $c_{02} \approx c_{01}$, т. е. димер взаимодействует с удвоенным числом адсорбционных центров по сравнению с мономером. В то же время при хроматографии на декстрановом геле $c_{02} \approx 10c_{01}$, т. е. можно предположить, что мономер взаимодействует не со всеми адсорбционными центрами сефадекса, проявляя значительно меньшую активность по связыванию с декстраном, чем димер.

Разработанная методика определения равновесных констант ассоциации дает удовлетворительные результаты в наиболее сложном случае, а именно при невозможности воспользоваться для определения V_n калибровочными зависимостями по молекулярной массе или стоксову радиусу и при наличии концентрационной зависимости объемов элюции компонентов реакции, связанной с взаимодействием белковых молекул с сорбентом. В то же время микроколоночная хроматография обеспечивает минимальный расход исследуемого материала, что открывает возможность изучения реакций ассоциации дефицитных белков. Для проведения всего эксперимента оказалось достаточно 1 мг белка. Микроколоночная хроматография имеет и другие преимущества по сравнению, например, с широко применяемым для исследования ассоциации методом седиментации. Эти преимущества связаны в первую очередь с возможностью исследования чрезвычайно широкого диапазона концентраций (вплоть до 10^{-4} г/дл при детектировании на 220 нм). Благодаря этому существенно уменьшается неопределенность в определении равновесных параметров ассоциации, поскольку в области низких концентраций минимальна неидеальность раствора, полиэлектролитные эффекты и эффекты трения, тогда как область высоких концентраций особенно чувствительна к присутствию ассоциатов высшего порядка. Важным преимуществом является также быстрота эксперимента.

Экспериментальная часть

Для проведения эксперимента использовался микроколоночный хроматограф ХЖ-1305 (СКБ АП АН СССР), оснащенный шприцевым микро-

насосом с производительностью 8—4000 мкл/ч и двухлучевым спектрофотометром с объемом кюветы 1 мкл. Измерения проводились в области 220—600 нм в диапазонах 0—0,3; 0—0,15; 0—0,04 ОЕ. Малый объем измерительной ячейки и коммуникаций детектора позволяет без ущерба для разделения применять колонки диаметром 1 мм. В нижней части в капиллярную колонку вставляли фильтр из капронового волокна толщиной 2 мм, обеспечивающий протекание воды со скоростью 0,5—1 см³/мин при гидростатическом давлении 20 см. Колонки заполнялись набухшим гелем из 50% суспензии при давлении, не превышающем критическое давление сжатия матрицы геля. Эксперименты проводились при постоянной скорости элюента 500 мкл/ч, вдвое меньшей скорости заполнения колонки. Благодаря этому предотвращалось сжатие геля в процессе опытов (с той же целью через колонку постоянно пропускался элюент, даже при остановке прибора).

Ассоциация лизоцима изучалась с помощью фронтальной ступенчатой микроколоночной хроматографии при дозировке 200 мкл раствора белка, что примерно соответствует объему колонки. При этом время эксперимента не превышало 40 мин. В качестве элюента использовался фосфатный буфер с рН 7 и ионной силой 0,2, температура опыта 25° С. По литературным данным известно, что лизоцим в этих условиях полидисперсен [12], и имеются оценки равновесных параметров ассоциации [11]. Для заполнения колонок использовался сефадекс G-75 (Pharmacia, Швеция) и биогель Р-60 (200—400 меш, Bio-Rad, США).

Лизоцим активности «А» («Союзреактив») подвергался дополнительной очистке путем хроматографии в водном растворе на колонке диаметром 2,5 см, длиной 65 см с сефадексом G-75. Концентрация лизоцима определялась спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции $E_{1\text{ см}}^{280\text{ нм}}$ 27,2 дл/г [11]. Исследовался интервал концентраций 10^{-4} —1,5 г/дл, причем в области низких концентраций регистрация элюата проводилась на полосе поглощения пептидной связи 220—230 нм, а при высоких концентрациях — в области 280—300 нм. Для калибровки колонки использовались растворы хроматографически чистых реперных белков фирмы Serva с концентрациями 10^{-2} — 10^{-3} г/дл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frieden C. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 653—693.
2. Ackers G. K. (1970) in: *Advances in Protein Chemistry*, **24**, 343—443.
3. Nichol L. M., Winzor D. J. (1972) *Migration of Interacting Systems*, Oxford, Clarendon Press.
4. Ackers G. K. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3026—3034.
5. Cann J. R., Coad W. B. (1970) *Interacting Macromolecules*, pp. 249—263, Acad. Press, N. Y.
6. Zimmerman J. K. (1974) *Biochemistry*, **13**, 384—389.
7. Мальцев В. Г., Куренбин О. И., Зминая Т. М., Виленчик Л. З., Белевский Б. Г., Готлиб Ю. Я. (1977) Тез. к докл. «Методические основы исследования кинетики и равновесия взаимодействующих белков с помощью микроколоночной гелевой хроматографии». IV Всес. симпозиум по химии белков и пептидов.
8. Мальцев В. Г., Зминая Т. М., Куренбин О. И., Белевский Б. Г., Александров С. Л., Павлова Н. П., Дьяков Н. П., Антонов В. К. (1979) *Биоорг. химия*, **5**, 1710—1719.
9. Halvorson H., Ackers J. K. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 967—973.
10. Andrews P. (1965) *Biochem. J.*, **96**, 595—606.
11. Deonier R. C., Williams J. W. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4260—4267.
12. Sophianopolous A. J., Van Holde K. E. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2516—2524.
13. Куренбин О. И., Виленчик Л. З., Готлиб Ю. Я., Белевский Б. Г. (1979) *Биофизика*, **24**, 222—226.
14. Canfield R. E., Liu A. K. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997—2002.
15. Тенфорд Ч. (1965) *Физическая химия полимеров*, «Химия», М.
16. Cucera E. (1965) *J. Chromatogr.*, **19**, 237—248.
17. Charlwood P. A. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 776—781.
18. Porath J. (1963) *J. Pure Appl. Chem.*, **6**, 233—240.

Поступила в редакцию
1.X.1979

MICROCHROMATOGRAPHIC STUDIES OF THE ASSOCIATION
OF A PROTEIN INTERACTING WITH THE SORBENT

MAL'TSEV V. G., KURENBIN O. I., ZIMINA T. M.,
VILENCHIK L. Z., GOTLIB Yu. Ya., BELENKY B. G.

*Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy
of Sciences of the USSR, Leningrad*

The principles of chromatographic determination of equilibrium constants for a protein dimerization in the two-component system have been worked out for the case of the sorbent interaction both with the monomer and the associate. On the basis of the experimental concentration dependence of weight-average and z-average elution volumes for leading chromatographic boundary it is possible not only to determine the equilibrium constant, but to calculate the adsorption isotherms for the components. The method was tested in the lysozyme association studies using microcolumn chromatography on Sephadex and Bio-Gel. With both sorbents the same equilibrium constants were obtained, though a sorption mechanism seems different. The lysozyme dimerization constant thus obtained agrees fairly well with literature data on the equilibrium sedimentation.
