

А. ИВАНОВ, Ю. ЛИЛЛЕ, С. СТЕПИН

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СТАБИЛИЗАЦИИ ПРОСТАГЛАНДИН-СИНТЕТАЗЫ МЕТОДОМ ВКЛЮЧЕНИЯ В ТВЕРДЫЕ ГЕЛИ

Несмотря на большие успехи тотального синтеза простагландинов (ПГ), получение их путем биохимической окислительной циклизации полиеновых кислот остается до сих пор препаративным методом изготовления природных ПГ в небольших масштабах [1]. При этом ПГ-синтетаза — комплекс энзимов, требующий кофакторов [2] и подвергающийся в ходе реакции автокаталитической деструкции [3], — применяется либо в виде гомогената, либо в виде т. н. ацетонового порошка (АП) [4]. Поэтому для увеличения масштабов препаративного биосинтеза ПГ большой интерес представляет стабилизация энзимов путем их иммобилизации [5, 6]. Данные о стабилизации ПГ-синтетазы до сих пор отсутствуют [6], однако имеется пример ее включения в силикагель [7].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании возможности стабилизации ПГ-синтетазы путем включения ее в твердые гели, в частности в силикагель и полиакриламидный гель (ПААГ).

### Экспериментальная часть

Выделение ПГ-синтетазы в виде АП из семенных пузырьков барана, биосинтез и определение ПГ  $E_2$  производились по [4]. Количество АП во всех опытах, включая и опыты с гелъэнзимами, составляло 50 мг. Концентрации компонентов инкубационной смеси были следующими: этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) — 30 мМ (рН 8,0—8,3), глутатион (GSH), гидрохинон (ГХ) и арахидоновая кислота (АК), соответственно, — 2,0; 0,5 и 0,4 мМ. Значение коэффициента экстинкции ПГ  $E_2$  принималось равным 22 000 л/моль·см. С целью определения стабильности синтетазы при многократном использовании АП или гелъэнзима инкубационную смесь перед подкислением центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Супернатант декантировали, подкисляли лимонной кислотой и определяли количество образовавшегося ПГ  $E_2$ . К осадку добавляли необходимые компоненты и вновь инкубировали. Описанные операции повторяли до тех пор, пока фермент сохранял еще какую-либо активность. Кинетические свойства гелъэнзимов изучались также методом измерения кинетики поглощения кислорода с помощью кислородного электрода [8].

**Включение АП в силикагель.** Силиказоль готовили по модифицированному методу [7]. В стакан, снабженный магнитной мешалкой и электродами рН-стата, заливали 10 мл 0,031 н. раствора HCl (рН 1,6). К раствору кислоты постепенно добавляли 50 мл насыщенного при 50 °C раствора *m*-силиката натрия ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), охлажденного до комнатной температуры. Постоянное значение рН 1,6 поддерживалось в стакане 2 н. соляной кислотой из бюретки рН-стата. Полученный силиказоль диализировали (через



целлофан) от 0,031 н. раствора HCl (4 л) в течение суток. Выход золя составлял 90 мл. Для иницирования гелеобразования к 15 мл диализированного силиказоля добавляли 30 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и поднимали pH до 6. Затем добавляли 100 мг АП, перемешивали и поднимали pH смеси до 8,0 (3 н. NaOH). Гелеобразование и сушку проводили совмещенно в ротационном испарителе под вакуумом при 25° в течение 2,5—3 ч. Выход гелянзима составил 1,9—2,0 г. В некоторых случаях гелирование силиказоля с добавленными к нему  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и АП проводили в стакане объемом 50 мл. После образования геля пробы замораживали жидким азотом и помещали в лиофилизатор (ОЕ-950, Венгрия). Продолжительность лиофилизации 5 ч.

**Включение АП в ПААГ.** Полимер готовили по модифицированному методу [9, 10]. Полимеризацию мономеров проводили в стакане емкостью 50 мл. Объем смеси мономеров 4 мл. Концентрация раствора акриламида (АА) 400 г/л, концентрация N,N'-метилен-бис-акриламида составляла 23 г/л (насыщенный раствор). Количество мономеров в различных опытах варьировали. Мономеры растворяли в буферных растворах 0,1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  или 0,03 М ЭДТА (pH которых, соответственно, 7,4 и 8,0) и в 0,37%-ном растворе Твин-40. Смесь мономеров продували аргоном в течение 10 мин, добавляли АП (50 мг) и растворенные в воде (0,5 мг/мл) рибофлавин и тетраметилэтилендиамин (10%) по 2 капли из капиллярной пипетки. Затем была проведена полимеризация смеси облучением УФ-светом с помощью облучателя типа 12 МО.081.019 при охлаждении смеси льдом до постоянной плотности смеси. Оценку механических свойств ПААГ проводили органолептически по пятибалльной системе. Полученный гель продавливали через медицинский шприц без иглы и промывали 10 раз декантацией в соответствующем буферном растворе. До биосинтеза буферный раствор удаляли фильтрацией пробы через нутч-фильтр.

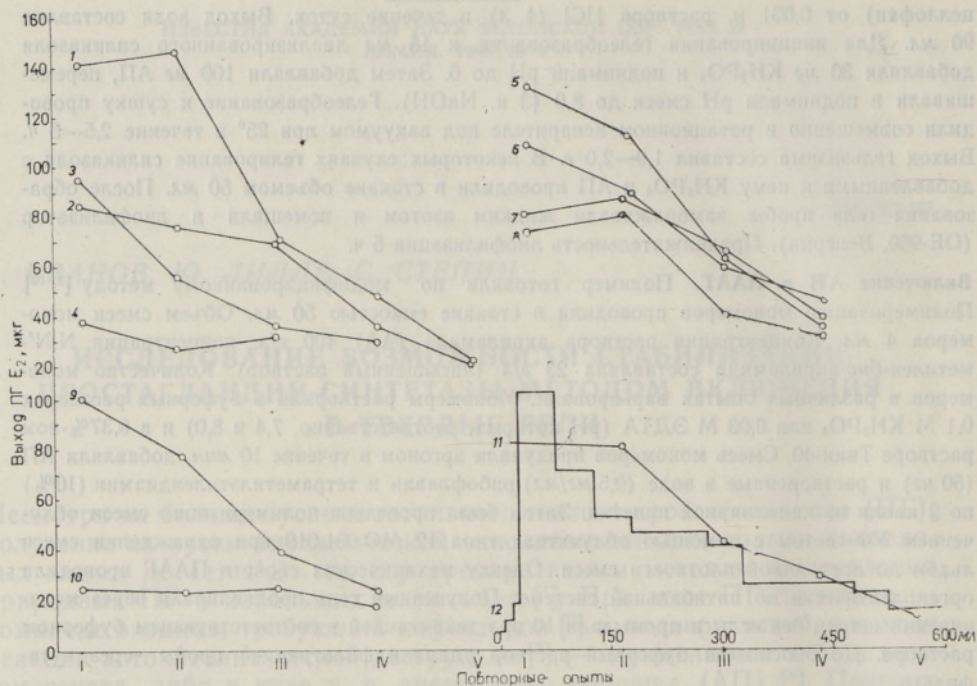
**Опыты с АП, включенным в ПААГ, в колонке.** Опыты проводили в стеклянной термостатированной при 31° колонке (внутр. диам. 7 мм), содержащей 7,5 г гелянзима (150 мг АП). Высота столба гелянзима — 10 см. Инкубационная смесь (30 мМ ЭДТА, pH 8,3; 2 мМ GSH; 0,5 мМ GX; 0,28 мМ АК) подавалась в колонку снизу посредством перистальтического насоса со скоростью 0,5 мл/мин и собиралась сверху фракциями по 10 мл. Фракции подкисляли 2 н. лимонной кислотой до pH 3—4 и определяли содержание образовавшегося ПГ  $E_2$ .

**Эксперименты с трипсином.** Трипсин (фирмы SOFA, Чехословакия; активность по гидролизу  $\alpha$ -бензониларгинина — ЭЭБА — 0,025 г-экв./г-мин) включали в силикагель аналогично АП. В опытах с гелянзимом в колонке использовали фракцию 0,2—0,63 мМ, активность которой составляла 35,3% активности нативного трипсина. Через термостатированную при 25° стеклянную колонку с внутренним диаметром 5 мм (1,36 г гелянзима и 3,95 мг трипсина) пропускали раствор, содержащий 1 г/л ЭЭБА, 680 мг/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 400 мг/л  $\text{SiO}_2$  (1,8933 г/л  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), pH раствора 8,0. Средняя скорость подачи раствора в течение 4 сут составляла 0,3 мл/мин.

## Результаты экспериментов

По внешнему виду гелянзим, полученный путем включения АП в силикагель, представлял собой бледно-желтоватые крупинки (обезвоживание в ротационном испарителе) или белый пылевидный порошок (лиофилизация). Активность гелянзима, независимо от способа обезвоживания, составляла 50—60% от активности свободного АП (по выходу ПГ  $E_2$ ; рисунок, 1, 2, 9), что соответствует результатам [7]. Однако при повторных инкубациях активности обеих проб снижались и постепенно принимали близкие значения. Добавка в процессе иммобилизации АК и ПГ  $E_2$  (по 0,14 мМ) или варьирование pH инкубационной смеси не привели к постоянному значению активности гелянзима при повторных





Выход ПГ  $E_2$  в зависимости от условий иммобилизации и инкубации. 1 — АП; 2—10 — АП, включенный в силикагель; 11—12 — АП, включенный в ПААГ; 3—4 — добавка при иммобилизации соответственно ПГ  $E_2$  и АК; 5—8 — рН инкубации, соответственно, 7,6; 8,0; 7,5 и 8,5; 9, 10 — соответственно лиофилизированный гелъэнзим и он же после хранения в течение 15 сут; 12 — содержание ПГ  $E_2$  в инкубационной смеси после колонки.

инкубациях (рисунок, 3—8). При хранении при  $-5^\circ$  под аргоном несколько более стабильным оказался лиофилизированный гелъэнзим, хотя и он после 15 сут сохранил лишь 25% от соответствующей активности АП (рисунок, 10).

Таким образом, методом включения в силикагель не удалось добиться стабилизации активности синтетазы. В то же время включенный в аналогичных условиях в силикагель трипсин (с выходом 50% от первоначальной активности) не терял в непрерывно работающей колонке своей активности в течение 4 сут, при этом было гидролизировано около 0,85 г ЭЭБА (около 50% от всего пропущенного через колонку количества).

Механические свойства ПААГ после включения АП улучшаются с увеличением как общего содержания мономеров, так и относительного содержания АА (табл. 1). Однако более активными оказались менее стойкие гели. Длительное время полимеризации в основном отрицательно отражалось на активности геля. Поэтому в присутствии гемоглобина (1 мкМ) и триптофана (1 мМ) образовались весьма нестойкие гели. Применение некоторых добавок в смеси мономеров полностью препятствовало гелеобразованию. Например, при добавлении к смеси мономеров диэтилдитиокарбамата (5 мМ) или ГХ (0,5 мМ) гелеобразование не началось даже по прошествии 60 мин. Попытки заменить АП на более активные гомогенат или микросомную фракцию семенных пузырьков по той же причине были безуспешными. Изменение активности гелъэнзима при его многократном использовании аналогично по своему



Таблица 1

## Результаты включения синтетазы в ПААГ

| Вес мономеров на 100 мл раствора, г | N,N'-метилен-бис-акриламид в смеси мономеров, % | Растворитель                   | Время гелеобразования, мин | Качество ПААГ | Активность гелъэнзима, % |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------|--------------------------|
| 21,1                                | 5,4                                             | 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 4                          | 5             | 29,5                     |
| 14,8                                | 10,3                                            | "                              | 2                          | 4             | 10,6                     |
| 14,8                                | 10,3                                            | "                              | 3                          | 3             | 73,5                     |
| 14,8                                | 10,3                                            | 0,03 М ЭДТА                    | 12                         | 2             | 44,0                     |
| 9,8                                 | 18,7                                            | 0,1 М $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 20                         | 3             | 57,3                     |
| 14,2                                | 10,3                                            | 0,37%-ный Твин-40              | 8                          | 3             | 0                        |

Таблица 2

## Результаты хранения синтетазы, включенной в ПААГ, в течение 10 сут при 4°C

| Среда                       | Выход ПГ $E_2$ |       |
|-----------------------------|----------------|-------|
|                             | мкг            | %     |
| 0,03 М ЭДТА, pH 8,0         | 25,2           | 41,0  |
| ЭДТА—глицерин 1:1           | 17,3           | 28,2  |
| Глицерин—вода 1:1           | 28,4           | 46,2  |
| Глицерин—вода 1:5           | 23,7           | 38,6  |
| 0,25 М раствор сахарозы     | 34,7           | 56,7  |
| Насыщенный раствор сахарозы | 59,9           | 97,5  |
| Контроль (без хранения)     | 61,5           | 100,0 |

характеру изменению активности АП, включенного в силикагель (рисунк, 11). Вследствие неустойчивости гелъэнзима общий выход ПГ  $E_2$ , полученного в колонке после 20 ч непрерывной работы, — одного порядка с выходом после десятикратного применения АП [4] (рисунок, 12).

Добавление к инкубационной смеси гемоглобина и триптофана не

привело к существенным изменениям характера кривой выхода ПГ  $E_2$ , приближающейся после пропускания 300 мл смеси асимптотически к нулю.

Для хранения гелъэнзима наиболее подходящим оказался насыщенный раствор сахарозы (табл. 2).

При изучении кинетики поглощения кислорода были получены для обоих изученных типов гелъэнзимов кривые, характерные для биохимического окисления в присутствии ПГ-синтетазы. Значение коэффициента инактивации для гелъэнзима на базе силикагеля составляло  $0,48 \text{ мин}^{-1}$ .

Полученные результаты показали, что включение АП в ПААГ или силикагель не стабилизирует его каталитической активности в процессе биосинтеза ПГ.

## Заключение

Включение ПГ-синтетазы в виде АП в такие твердые гели, как силикагель и ПААГ, позволяет в принципе улучшить ее физические свойства и тем самым облегчить применение синтетазы в биосинтезе ПГ. Однако избежать автокаталитической инактивации синтетазы в ходе биосинтеза этим методом пока не удалось. Для решения проблемы стабилизации ПГ-синтетазы требуются дальнейшие исследования роли кофакторов, механизма инактивации и привлечение более эффективных методов иммобилизации.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Colbert, J. C. Prostaglandins. Isolation and synthesis. VIII. New York, London, 1973, p. 68—96.
2. Hemler, M. E., Lands, W. E. M. Biosynthesis of prostaglandins. — *Lipids*, 1977, v. 12, N 7, p. 591—595.
3. Egan, R. W., Paxton, J., Kuehl, Fr. A. Jr. Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. — *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, N 23, p. 7329—7335.
4. Wallach, D. P., Daniels, E. G. Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from sheep seminal vesicles. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, v. 231, p. 445—457.
5. Messing, R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors. New York, San Francisco, London, 1975.
6. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. Имобилизованные ферменты. Т. 1, 2. М., 1976.
7. Boldingh, J., Okkerse, P. P. SFV, N 19993447, 1970.
8. Лилле Ю., Смородин Е., Марвет Р. О кинетических свойствах простагландин-эндопероксид синтетазы. — *Изв. АН ЭССР. Хим.*, 1979, т. 28, № 2, с. 108—112.
9. Hicks, G. P., Updike, S. J. The preparation and characterization of lyophilized polyacrylamide enzyme gels for chemical analysis. — *Analyt. Chem.*, 1966, v. 38, p. 726—728.
10. Паппель К. Э., Кестнер А. И., Тихомирова А. С. Получение иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы. — *Тр. Таллинск. политех. ин-та*, 1974, № 367, с. 35—40.

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
6/IV 1979

A. IVANOV, U. LILLE, S. STJOPIN

# PROSTAGLANDIINI SÜNTETAASI STABILISEERIMISE VÕIMALUSTEST TÄHKETESSE GEELIDESSE SISESTAMISE TEEL

Artikkel käsitleb prostaglandiini  $E_2$  saagise suurendamise võimalusi preparatiivses biosünteesis järga seemnepõiekestest atsetoonipulbrina eraldatud ja immobiliseeritud prostaglandiini süntetaasi toimel. Silikageeli ja polüakrüülamiidgeeli baasil saadud geelensüümid omasid 50—60% lähteensüümi aktiivsusest ja inaktiveerusid biosünteesis analoogiliselt viimasega.

A. IVANOV, U. LILLE, S. STYOPIN

# ON THE POSSIBILITIES OF STABILIZATION OF PROSTAGLANDIN SYNTHETASE BY ENTRAPMENT IN SOLID GELS

PG-synthetase in the state of acetone powder was entrapped in silica gel and polyacrylamide gel with yields of 50—60% from initial activity. Cycling the entrapped enzymes in batch and fluidized bed reactors showed a loss of activity analogous to that of acetone powder. Addition of cofactors and other ingredients did not prevent the inactivation of synthetase taking place during the course of biosynthesis.