

А. МУРЕЛЬ, В. ФЕДОСЕЕВ,
Марет ПАНК, О. КИРРЕТ

ОПТИМИЗАЦИЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ХИМОТРИПСИНА НА СЕФАДЕКСЕ G-200

A. MUREL, V. FEDOSSEIEV, Maret PANK, O. KIRRET. KUMOTRÜPSIINI SEPHADEXILE G-200
IMMOBILISEERIMISE OPTIMEERIMINE

A. MUREL, V. FEDOSEYEV, Maret PANK, O. KIRRET. OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION
OF CHYMOTRYPSIN ON SEPHADEX G-200

Иммобилизованные ферменты находят все более широкое применение в науке и промышленности [1]. Значительную их часть составляют протеиназы, единственно эффективным методом иммобилизации которых является ковалентное связывание.

Целью данной работы являлось определение возможности использования выпускаемых отечественных препаратов (сефадекса G-75, в перспективе G-100 и G-200, цианурхлорида) для связывания химотрипсина. В качестве носителя выбран сефадекс G-200 из-за его крупнопористости и, следовательно, доступности для молекул белка-субстрата большого молекулярного веса.

Методика

Использовались химотрипсин (ХТ) фирмы «Olaïne», активность по АТЭЭ $250 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} / \text{мг}^{-1}$, казеин по Гаммерстену фирмы «Reapa» (Венгрия) и сефадекс G-200 фирмы «Pharmacia» (Швеция). Активность ХТ измерялась с помощью рН-стата, построенного в нашей лаборатории на основе отечественного комплекта титровального оборудования «Т-106». Иммобилизацию ХТ проводили по методике, рекомендованной в [2]. Сефадекс G-200 (2,5 г) кипятили 30 мин в дистиллированной воде и фильтровали. Гель перемешивали в течение 5 мин с раствором А (2 г 2-амино-4,6-дихлортриазина (синтезирован нами по методике [2]), растворили в 50 мл ацетона при 50°C, после чего добавляли 50 мл воды), а затем после добавления раствора В (0,4 части 15%-ного Na_2CO_3 и 0,6 частей 1 н НСl) перемешивали еще 5 мин. Смесь быстро подкисляли до рН ниже 3 концентрированной НСl, фильтровали, затем промывали водным ацетоном (1 : 1) и дистиллированной водой. Навеску ХТ растворяли в соответствующем буфере и перемешивали с активированным гелем сефадекса.

Результаты и обсуждение

Исследовалась зависимость активности полученного продукта иммобилизации от времени связывания при рН 8,8. Из рис. 1 видно, что актив-

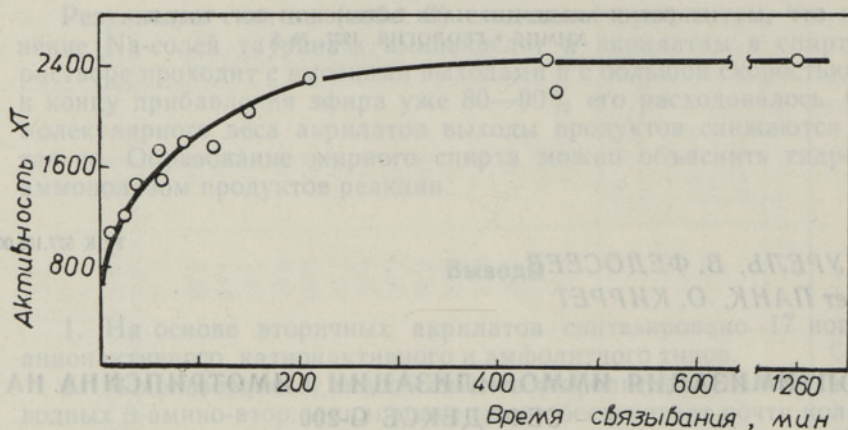


Рис. 1. Активность ХТ ($\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \text{г}^{-1}$ сухого носителя) в зависимости от времени связывания ($\text{pH } 8,8$, $t^\circ = 20^\circ \text{C}$, $0,2 \text{ M}$ боратный буфер, 300 мг ХТ на 1 г носителя).

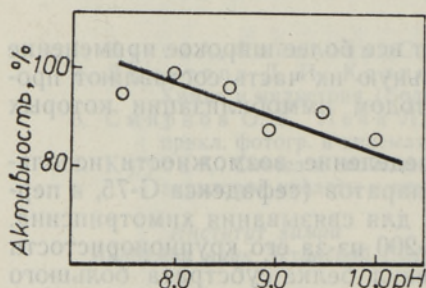
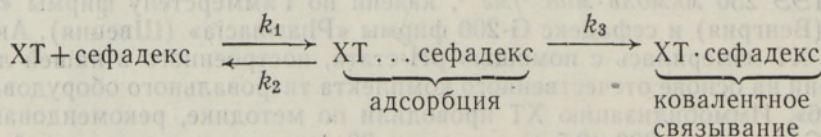


Рис. 2. Потеря активности иммобилизованного ХТ в течение 5 ч, в зависимости от pH (концентрация ХТ $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $0,15 \text{ M}$ фосфатный буфер).

ность пробы растет с увеличением времени связывания до 200—240 мин, а затем остается практически неизменной. В ходе процесса иммобилизации может иметь место спонтанная инактивация ХТ. Однако вклад ее для выбранных условий связывания в суммарный процесс (рис. 2) незначителен.

Можно предположить, что связывание ХТ (рис. 3) протекает через стадию обратимой адсорбции фермента в геле сефадекса по схеме:



Тогда для стационарных условий можно записать:

$$k_1 c (1 - \Theta) = k_2 \Theta + k_3 \Theta, \quad (1)$$

где Θ — доля объема геля, занятого ХТ, $1 - \Theta$ — доля свободного объема сефадекса, c — концентрация ХТ (мг/г сухого носителя).

Если провести преобразования, аналогичные выводу уравнения Ленгмюра для мономолекулярной адсорбции, получим уравнение:

$$m = \frac{M}{1 + \frac{K}{c}}, \quad (2)$$

где m — количество активного ХТ, иммобилизованного в геле, M — мак-

Рис. 3. Зависимость активности иммобилизованного ХТ (мкмоль·мин⁻¹/г носителя) от количества исходного фермента (мг/г носителя, $t^{\circ}=20^{\circ}\text{C}$; 0,2 М боратный буфер, рН 8,8, время связывания 1 ч).

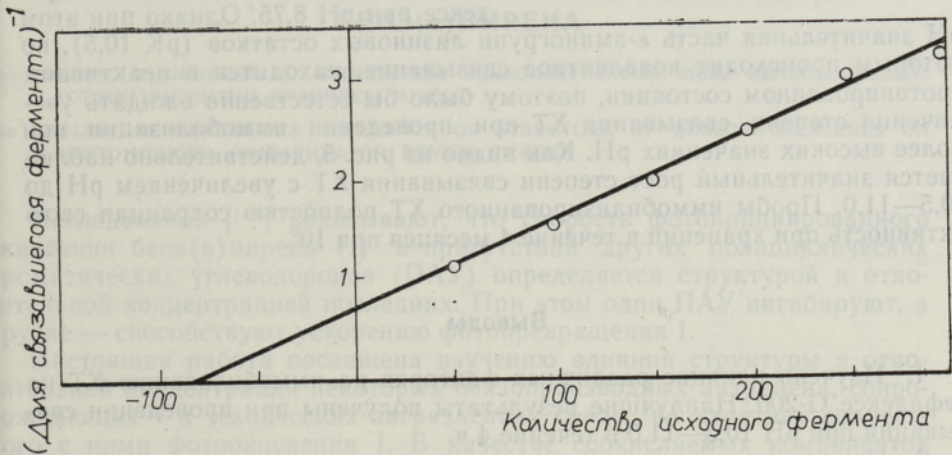
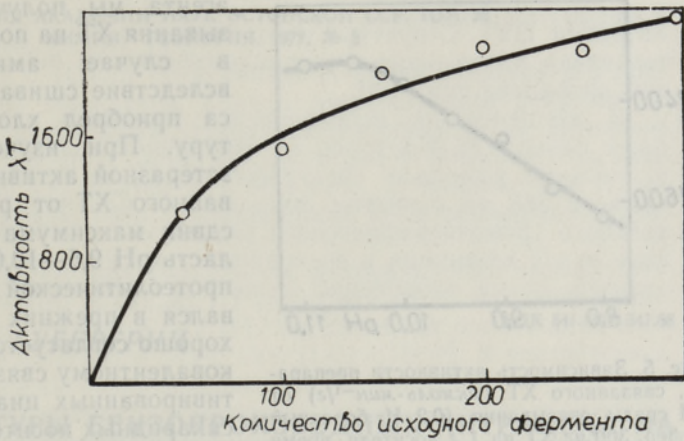


Рис. 4. Влияние концентрации фермента (мг/г носителя) на отношение исходного ХТ к иммобилизованному ферменту.

симально возможное связывание ХТ (мг/г сухого носителя), $K = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ из уравнения (1).

Из графика, построенного в координатах $\frac{c}{m} - c$ или $\frac{1}{m} - \frac{1}{c}$, можно высчитать K и M . На рис. 4 полученная прямая линия подтверждает правильность нашего предположения о том, что связывание ХТ проходит через равновесную стадию. Таким образом, для выбранных условий ($t^{\circ}=20^{\circ}$, $t=60$ мин, рН 8,8) $M=121$ и $K=85$ мг. При $c=K$; $m=M/2$. Такой графический прием использован в [3] при нахождении величины максимального связывания белка на активированном целлофане, однако причины обнаруженной зависимости авторы не объяснили. Пересчет данных работы [4] по иммобилизации ХТ на активированном периодатным окислением сфадексе позволяет также получить прямые линии в координатах $\frac{c}{m} - c$ и вычислить K и M .

При использовании цианурхлорида [5] в качестве активирующего

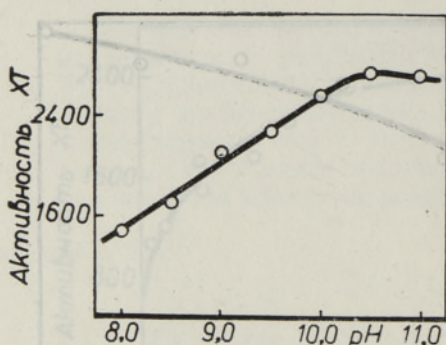


Рис. 5. Зависимость активности препарата, связанного ХТ ($\mu\text{кмоль} \cdot \text{мин}^{-1}/\text{г}$) от pH среды связывания (0,2 М боратный буфер, 300 мг ХТ на 1 г носителя, время связывания 1 ч).

pH значительная часть ϵ -аминогрупп лизиновых остатков (pK 10,5), по которым происходит ковалентное связывание, находится в неактивном протонированном состоянии, поэтому было бы естественно ожидать увеличения степени связывания ХТ при проведении иммобилизации при более высоких значениях pH. Как видно из рис. 5, действительно наблюдается значительный рост степени связывания ХТ с увеличением pH до 10,5—11,0. Пробы иммобилизованного ХТ полностью сохранили свою активность при хранении в течение 4 месяцев при 10° .

агента мы получили степень связывания ХТ на порядок меньше, чем в случае аминоканурхлорида; вследствие шивания гель сефадекса приобрел хлопьевидную структуру. При изучении зависимости эстеразной активности иммобилизованного ХТ от pH мы наблюдали сдвиг максимума активности в область pH 9,5—10,0, причем оптимум протеолитической активности оставался в прежних пределах pH, что хорошо согласуется с данными [6] по ковалентному связыванию ХТ на активированных цианбромидом полисахаридных носителях. Кей и Лилли [2] проводили связывание ХТ на сефадексе при pH 8,75. Однако при этом

Выводы

1. Изучено влияние различных факторов на иммобилизацию ХТ на сефадексе G-200. Наилучшие результаты получены при проведении связывания при pH 10,5—11,0 в течение 4 ч.

2. На основании экспериментальных данных предложена модель процесса иммобилизации ХТ в геле сефадекса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mausbach, K., FEBS Lett, **62**, E 80 (1976).
2. Kay, C., Lilly, M. D., Biochem. Biophys. Acta, **198**, 276 (1970).
3. Smith, N., Lenhoff, H., Anal. Biochem., **61**, 392 (1974).
4. Торчилин В. П., Бобкова А. С., Смирнов В. Н., Чазов Е. И., Биоорганическая химия, **2**, 116 (1976).
5. Kay, C., Crook, E. M., Nature, **216**, 514 (1967).
6. Axen, R., Ernback, S., Eur. J. Biochem. **18**, 351 (1971).

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
6/VII 1976