



УДК 577.152.344.042

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ
 α -ХИМОТРИПСИНА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ИНГИБИТОРОМ
ИЗ СЕМЯН ФАСОЛИ

Флатова Т. Н.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

Для изучения механизма комплексообразования ферментов с их специфическими лигандами широко применяется аффинная хроматография [1–3]. В данной работе предлагается новый подход к определению константы равновесия таких процессов (K) на примере образования комплекса химотрипсина с его белковым ингибитором, выделенным из семян фасоли [4] и иммобилизованным на АН-сефарозе 4В (I-АН-сефароза). Элюирование фермента из аффинного комплекса с ингибитором проводили не растворами конкурентного ингибитора, как это принято в работах по расчету констант равновесия (например, [2, 3]), а буферными растворами при различных величинах рН.

На колонку (1×5,5 см) с I-АН-сефарозой, уравновешенной буферными растворами с соответствующими значениями рН, наносили фермент (1 мл; $[E] 2 \cdot 10^{-8}$ М) в том же буферном растворе (0,6 М NaCl в 0,05 М трис-малеатном или ацетатном буфере). Активность десорбированного химотрипсина определяли на регистрирующем спектрофотометре при 237 нм, в качестве субстрата использовали этиловый эфир ацетил-*L*-тирозина в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,0.

Как видно из рис. 1а, по мере роста рН элюирующего буферного раствора имело место увеличение объемов элюирования фермента с колонки, причем изменение характера кривых элюирования по мере роста рН аналогично, например, приведенному в работе [2] изменению характера таких кривых при уменьшении концентрации конкурентного ингибитора в элюирующем растворе. В данном случае для каждого значения рН буферного раствора мы находили величину K по уравнению, выведенному Касаи и Ишии [3] (методом фронтального анализа): $K = [L_i / (V - V_0)] - E_0$, где L_i — общее количество иммобилизованного лиганда (ингибитора), равное $2,2 \cdot 10^{-7}$ моль, которое определяли, исходя из емкости колонки по химотрипсину; V — значение объема элюирующего раствора для нисходящей ветви кривой элюирования (см. рис. 1а), при котором активность десорбированного фермента составляет 50% от максимальной при данном рН активности (рис. 1б); V_0 — рассчитанный таким образом объем, но при отсутствии взаимодействия между ферментом и иммобилизованным ингибитором (при рН 1,5–2,0 $V_0 = 4,7$ мл).

Величина K практически не зависела от начальной концентрации химотрипсина (в интервале $[E]_0 = 10^{-9} - 2 \cdot 10^{-8}$ М). Из кривой зависимости между величинами rK , рассчитанными по вышеприведенному уравнению, и рН элюирующего раствора, видно (рис. 2), что если в интервале рН 2,5–4,0 величина K уменьшалась незначительно, то при достижении рН 4,5 она резко снижалась до $2,8 \cdot 10^{-6}$ М. Далее опять наблюдалось относительно медленное снижение константы до $1 \cdot 10^{-6}$ М (рН 5,25). Определить объемы элюирования фермента при рН > 5,25 представляло значительную трудность из-за «размывания» белкового пика (рис. 1а). Поэтому, чтобы определить rK при рН 7,0–7,5, т. е. в условиях оптимальной устойчивости комплексов химотрипсина с различными белковыми ингибиторами, мы экстраполировали верхний прямолинейный участок кривой (рис. 2). Полученная таким образом константа имеет величину $(0,6 - 0,8) \cdot 10^{-7}$ М.

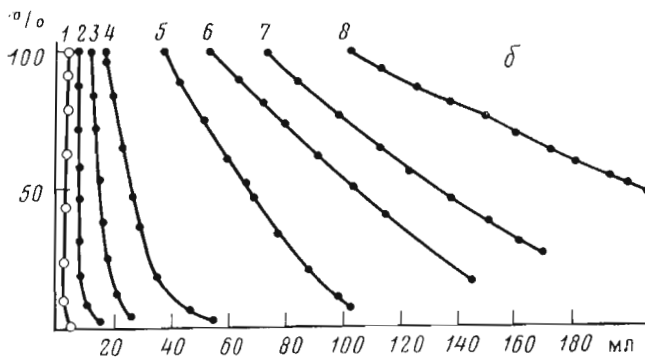
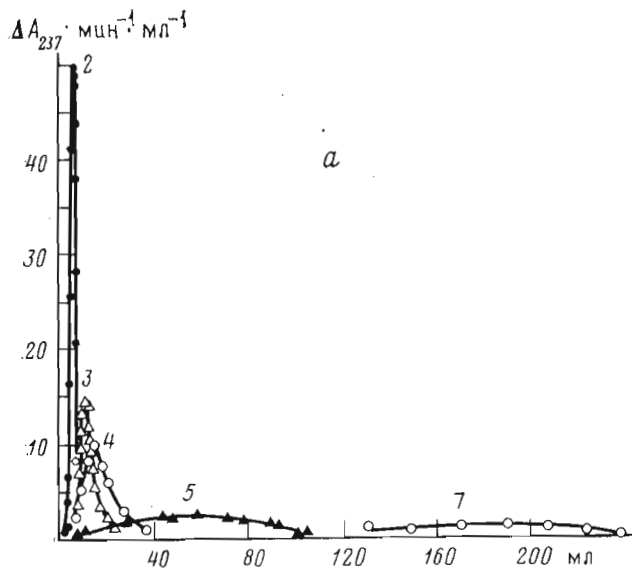


Рис. 1. Аффинная хроматография химотрипсина на колонке (1×5,5 см) с I-АН-сефарозой при элюировании буферными растворами с рН 1,5–2,0 (1), 3,0 (2), 4,0 (3), 4,25 (4), 4,5 (5), 4,75 (6), 5,0 (7), 5,25 (8). На оси ординат отложена активность десорбированного фермента, определенная по гидролизу *L*-Тур-ОЕт (а), и активность нисходящей ветви кривой рис. 1а, выраженная в процентах от максимальной активности (б). Скорость потока 4,5 мл/ч

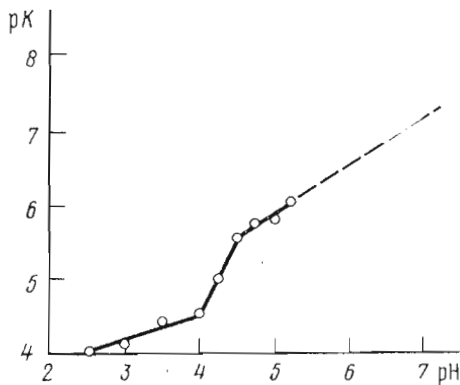


Рис. 2

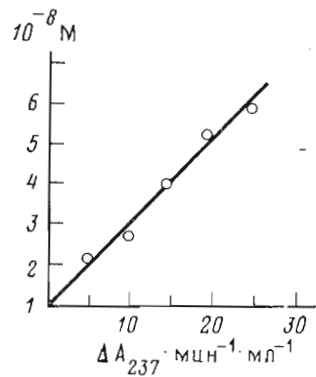


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость величины рК для комплекса химотрипсин – иммобилизованный ингибитор от рН элюирующего раствора

Рис. 3. Определение константы ингибирования для комплекса химотрипсин – ингибитор в растворе (по методу Майерса [5]). На оси абсцисс – активность химотрипсина, соответствующая его начальным концентрациям ($1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ М), на оси ординат – $[I]_{0,5}$ – концентрация ингибитора, при которой активность фермента уменьшалась наполовину

Правомерность этой экстраполяции следует прежде всего из хорошего совпадения приведенного выше значения константы с величиной K , полученной по методу Майерса [5] для того же комплекса в тех же условиях, но не с иммобилизованным ингибитором, а в растворе ($1 \cdot 10^{-8}$ М) (рис. 3). Константа ингибирования на рис. 3 — отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат [5]. Все измерения проводили в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,0. Использовали химотрипсин марки А Олайнского завода после обессоливания на G-25 и последующей очистки методом аффинной хроматографии на сефарозе 4В с иммобилизованным ингибитором из фасоли.

Совпадение этих двух значений величины K комплекса химотрипсина с его ингибитором из семян фасоли, находящимся в растворе и в иммобилизованном состоянии, свидетельствует, что ковалентная посадка ингибитора на АН-сефарозу не оказывает существенного влияния на устойчивость исследуемого комплекса.

Таким образом, используемая нами методика дала разумное значение величины константы диссоциации для комплекса химотрипсина с ингибитором из фасоли. Вопрос о природе связей, обуславливающих высокую прочность специфических комплексов протеиназа — белковый ингибитор, не выяснен окончательно до настоящего времени [6]. Полученная в данной работе зависимость pK исследуемого комплекса от рН элюирующего буферного раствора с резким изменением прочности комплекса в сравнительно узком интервале рН (4,0—4,5) позволяет предположить, что значительный вклад в его устойчивость вносят, очевидно, межбелковые связи понного характера.

Выражаю искреннюю благодарность В. В. Тополеву и И. А. Черкасову за обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cherkasov I. A., Kravchenko N. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 206, № 2, p. 289—294.
2. Dunn B. M., Chaiken J. M. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 11, p. 2343—2349.
3. Kasai K., Ishii S. *J. Biochem. (Tokio)*, 1975, v. 77, № 1, p. 261—264.
4. Орлов Б. Н., Гелашвили Д. В., Хургин Ю. И., Филатова Т. Н., Тюкина А. А., Савинов Г. М. *Хим.-фарм. ж.*, 1982, т. 8, № 1, с. 18—23.
5. Myers D. K. *Biochem. J.*, 1952, v. 51, № 2, p. 303—311.
6. Мосолов В. В., Валугева Т. А., Соколова Е. В., Антонов В. К. *Докл. АН СССР*, 1975, т. 221, № 2, с. 484—486.

Поступило в редакцию
8.VII.1983
После доработки
4.X.1983

SPECIFIC INTERACTION OF α -CHYMOTRYPSIN WITH IMMOBILIZED INHIBITOR FROM THE KIDNEY BEAN SEEDS

FILATOVA T. N.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The equilibrium constant (K) of the chymotrypsin complex with an immobilized inhibitor was obtained by frontal analysis method ($K=4-6 \cdot 10^{-8}$ М). The bound enzyme was eluted with buffer solutions of different pH, and the eluted volumes were determined. The stability of the immobilized complex (pK) heavily depends on the pH value of the eluting buffer solutions, especially in the pH region of 4,0—4,5. This is indicative of considerable contributions of ionic type bonds into stabilization of the enzyme-inhibitor complex.