



УДК 543.544

УДАЛЕНИЕ НЕИОННЫХ ДЕТЕРГЕНТОВ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЕЙ

*Кусов Ю. Ю., Калинин Н. А., Гогилашвили Л. М.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Предложен способ удаления избытка неионных детергентов ультрафильтрацией в присутствии 20%-ного раствора глицерина. В случае Поли-Тергента S305-LF и Тритона X-100 концентрация детергента за три цикла ультрафильтрации снижается в 8 и 25 раз соответственно. Показано, что количественное определение неионных детергентов, в том числе Поли-Тергента, возможно в присутствии белка, глицерина и трис-буфера.

В последние годы нейтральные детергенты нашли широкое применение для солюбилизации компонентов мембран и клеточных стенок микроорганизмов и органов млекопитающих [1]. В связи с тем что неионные детергенты в высоких концентрациях затрудняют определение белка как по методу Лоури [2, 3], так и биуретовой реакцией [4], мешают проведению гель-электрофореза [5], а иногда вызывают инактивацию фермента [6, 7], необходим удобный метод их удаления. В литературе описано несколько способов освобождения от детергентов [8—11]. Наибольшего внимания заслуживает недавно предложенный для этих целей метод ультрафильтрации [12]. Его основной недостаток состоит в использовании этанола, который не только оказывает разрушающее воздействие на фильтрующие мембраны, но и часто способствует инактивации ферментов [13]. В связи с этим казалось целесообразным выяснить возможность использования в методе ультрафильтрации 20%-ного глицерина, широко известного своим стабилизирующим влиянием на многие солюбилизованные ферменты [14].

Мы изучили возможность удаления широко применяемого Тритона X-100, а также другого неионного детергента — Поли-Тергента S 305-LF, оказавшегося эффективным при солюбилизации некоторых гликозилтрансфераз [14]. Для количественного определения детергентов был использован недавно предложенный метод, основанный на комплексовании оксиэтиленовых звеньев полиоксиэтиленовой цепи с кобальтотриацианатом аммония [15]. Этот метод пригоден не только для Тритона X-100, но и для Поли-Тергента, о чем свидетельствует близость спектров поглощения их хромофоров (отношения D_{618}/D_{322} найдены равными 0,18 и 0,155 соответственно) (рис. 1) и линейная зависимость окраски от количества (в пределах 10—200 мкг) детергента (рис. 2, кривые 1 и 4). В присутствии трис-буфера и глицерина сохраняется линейность развития окраски от концентрации детергента. Оба соединения вызывают снижение экстинкции хромофора в случае Поли-Тергента (ср. кривые 2, 3 и 5 рис. 2) и практически не влияют на экстинкцию в случае Тритона X-100 (ср. кривые 3 и 4 рис. 2). Таким образом, метод [15] позволяет проводить количест-

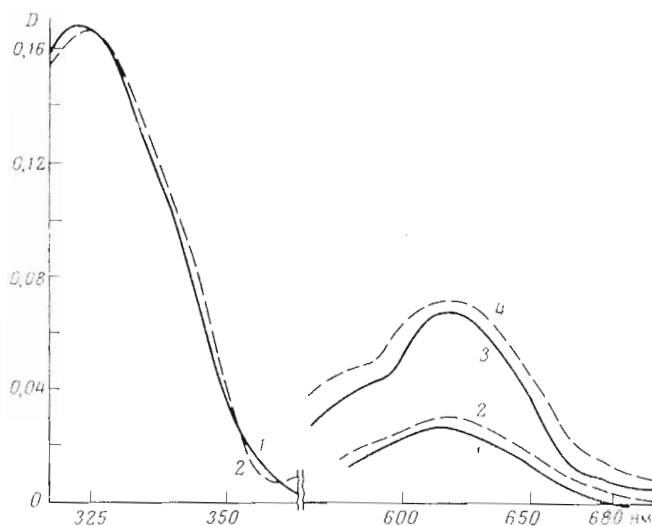


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов взаимодействия кобальтотиоцианата аммония с Поли-Тергентом (1, 3) и Тритоном X-100 (2, 4). Кривые 1 и 2 получены для 25, а 3, 4 — для 100 мкг детергентов

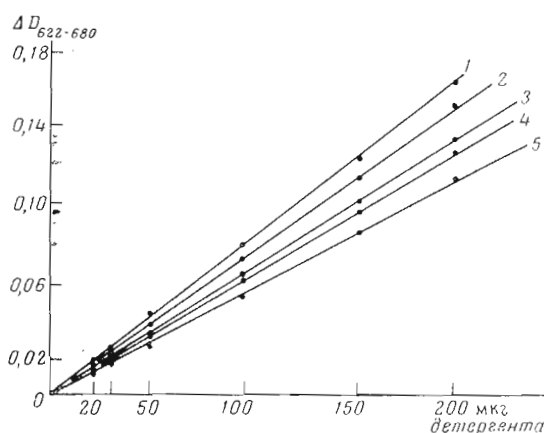


Рис. 2. Калибровочные графики для Поли-Тергента (1 — в воде, 2 — в 50 мМ трис-ацетатном буфере, 3 — в буфере А, 5 — в 40%-ном водном глицерине) и для Тритона X-100 (3 — в буфере А, 4 — в воде)

венное определение оксипэтилированных детергентов в присутствии как трис-буфера, так и глицерина — компонентов, используемых нами при ультрафильтрации. Более того, метод пригоден для определения детергентов в присутствии белка, поскольку добавление последнего к Поли-Тергенту практически не изменяло разность между поглощением при 622 и 680 нм.

Ультрафильтрацию неионных детергентов осуществляли через мембрану, пропускающую полимеры с $M \leq 25000$. Выбор этого типа мембран объясняется необходимостью концентрирования основных белков, содержащихся в препарате солиubilизированных трансфераз [16]. По-видимому, мембраны, концентрирующие полимеры с меньшим молекулярным весом, также могут быть использованы для ультрафильтрации детергентов. Приведенные в таблице данные показывают, что применение 20%-ного раствора глицерина позволяет снизить концентрацию детергента в 2—3 раза за один цикл ультрафильтрации. Несколько меньшая

Удаление детергентов ультрафильтрацией

Удаляемый детергент	Циклы ультра-фильтра-ции	Исходный раствор		Остаточный раствор		Степень фильтра-ции *
		концентра-ция детер-гента, %	кол-во, мл	концентра-ция детер-гента, %	кол-во, мл	
Тритон X-100	1	1,52	0,20	0,50	0,25	3,0
	2	0,50	0,20	0,125	0,25	4,0
	3	0,125	0,20	0,06	0,20	2,0
Поли-Тергент	1	1,64	0,23	1,02	0,27	1,6
	2	1,02	0,18	0,37	0,33	2,7
	3	0,37	0,20	0,21	0,15	1,7

* Степень фильтрации детергента рассчитана как отношение концентраций детергентов в исходном и остаточном растворах.

степень фильтрации наблюдается для Поли-Тергента. В результате трех последовательных циклов удается снизить концентрацию детергента в 8—25 раз, что бывает вполне достаточно для устранения мешающего влияния детергента при определении белка, постановке гель-электрофо-реза и исследовании ферментативных свойств.

Разработанный метод был применен для удаления избыточного де-тергента из ферментных препаратов, полученных при хроматографии солюбилизованных гликозилтрансфераз в присутствии 0,65%-ного Поли-Тергента. В результате 4—5 последовательных циклов ультра-фильтрации содержание Поли-Тергента в сконцентрированных растворах удается снизить с 10—20 до 0,3—1,4%. Более высокая степень фильтра-ции детергента может быть достигнута либо проведением дополнительных циклов, либо включением 10%-ного этанола (там, где это возможно) в буфер для ультрафильтрации, как это описано в работе [12].

Таким образом, в настоящей работе предложен удобный способ уда-ления избытка неионных детергентов ультрафильтрацией в присутствии 20%-ного глицерина. Поскольку связанный с белком детергент, по-ви-димому, не удаляется этим способом (ср. [12]), предлагаемый метод может быть полезен для получения комплекса белок — детергент после удале-ния избытка последнего; в случае гомогенных белковых препаратов это позволяет определить стехиометрию связывания детергента с белком.

Экспериментальная часть

Количественное определение неионных детергентов (Тритон X-100, Serva, ФРГ, и Поли-Тергент S 305-LF, Olin Chemical Corp., Connecticut, США) осуществляли по методу [15] в следующем варианте: к аликвоте (10—200 мкг детергента) в 0,3 мл 30—70%-ного водного этанола добав-ляли 0,4 мл реактива, содержащего 17,8 г NH_4SCN и 2,8 г $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды. Через 5 мин при комнатной температуре к смеси приливали 3 мл дихлорэтана и интенсивно перемешивали (миксер, модель МП, ЭМИБ, Киев) в течение 2 мин. После расслоения фаз кратковременным центрифугированием при 1000 g измеряли (Unicam SP-8000, Англия) разность поглощения органической (нижней) фазы при 622 и 680 нм.

При изучении влияния белка на определение детергента к 100 мкг Поли-Тергента добавляли препарат солюбилизованных гликозилтранс-фераз [16], содержащий 50 мкг белка; при этом $\Delta D_{622-680}$ найдено равным 0,045, что всего на 0,003 выше, чем в контрольном образце, не содержа-щем белка.

Ультрафильтрация детергентов. 0,2 мл препарата солюбилизован-ных гликозилтрансфераз в 50 мМ трис-ацетатном буфере, pH 8,5 (буфер А), в котором концентрация неионного детергента повышена до $\sim 1,5\%$, добавляли 5 мл буфера А, содержащего 20% глицерина, и концентриро-

вали ультрафильтрацией через мембрану, пропускающую глобулярные полимеры с $M \leq 25\,000$ (PSED, Pellicon, США) с использованием ячейки на 25 мм фирмы Millipore. Ультрафильтрацию повторяли на той же мембране, каждый раз добавляя по 2,5 мл буфера А с 20%-ным глицерином. В аликвотах остаточных растворов, полученных после каждого цикла, определяли количество детергента по описанной выше методике. Ультрафильтрацию проводили при 8–10° под давлением азота 2 атм (таблица).

ЛИТЕРАТУРА

1. Helenius A., Simons K. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **415**, 29–79.
2. Wang C. S., Smith R. L. (1975) *Anal. Biochem.*, **63**, 414–417.
3. Sagawara K. (1976) *Agr. Biol. Chem.*, **59**, 2429–2430.
4. Futterman S., Rollins M. H. (1973) *Anal. Biochem.*, **51**, 443–447.
5. Hearing V. J., Klingler W. G., Ekel T. M., Montague P. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 113–122.
6. Sano M. (1976) *Biochim. et biophys. acta.*, **428**, 525–531.
7. Higashi Y., Strominger J. L., Sweeley C. C. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 3697–3702.
8. Razin S. (1972) *Biochim. et biophys. acta.*, **265**, 241–296.
9. Rottem S., Stein O., Rasin S. (1968) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **125**, 46–56.
10. Loach P. A., Sekura D. L., Hadsell R. M., Stemer R. (1970) *Biochemistry*, **9**, 724–733.
11. Holloway P. W. (1973) *Anal. Biochem.*, **53**, 304–308.
12. Frasch C. E. (1976) *Dialog. Amicon*, **13**, 1–2.
13. Rundell K., Shuster C. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 5436–5442.
14. Osborn M. J., Cynkin M. A., Gilbert J. M., Muller L., Singh M. (1972) in *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), **28 B**, pp. 583–601, Acad. Press, N. Y.—London.
15. Goldstein S., Blecher M. (1975) *Anal. Biochem.*, **64**, 130–135.
16. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 47–56.

Поступила в редакцию
10.XI.1977

REMOVAL OF NON-IONIC DETERGENTS BY ULTRAFILTRATION

KUSOV Yu. Yu., KALINCHUK N. A., GOGILASHVILI L. M.

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

A procedure for non-ionic detergent removal has been proposed which is based on ultrafiltration in the presence of 20% glycerol solution. The concentration of Poly-Tergent S 305 LF or Triton X-100 is diminished 80-fold or 25-fold, respectively, after three ultrafiltration cycles. It is shown that proteins, glycerol or Tris-buffer do not interfere with quantitation of Poly-Tergent and some other non-ionic detergents.