



УДК 577.412.4:577.452.441*.47'44

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА
ДОСТУПНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ С ПОМОЩЬЮ
o-ДИАНИЗИДИНА И ВОДОРАСТВОРИМОГО КАРБОДИМИДА.
ВЫЯВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ
ГРУПП В ПЕРОКСИДАЗЕ ХРЕНА

*Рогожин В.В., Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н.,
Березин И.В.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии*

На примере пероксидазы хрена показана перспективность и преимущества использования *o*-дианизидина в качестве реакционноспособного нуклеофила для количественного определения степени модификации карбоксильных групп в белках по методу Кошланда. Количество присоединенного *o*-дианизидина определяют спектрофотометрически (ϵ_{305} 19,0 мМ⁻¹см⁻¹). Наиболее целесообразно *o*-дианизидин использовать для модификации гемоглобинов, в спектрах поглощения которых при 300–320 нм наблюдается минимум. Показано, что при pH 5,0 *o*-дианизидин максимально модифицирует четыре СООН-группы пероксидазы, а при pH 4,0 – семь. Изучена зависимость степени модификации СООН-групп от длительности реакции и соотношения карбодимид / фермент. Дифференцированы два типа СООН-групп в пероксидазе, различающиеся по расположению в глобуле. Показано, что функционально важными для процесса пероксидазного окисления донора водорода, *o*-дианизидина, являются три СООН-группы фермента, модификация которых снижает его активность на 70%. В то же время модификация этих же СООН-групп не влияет на процесс окисления донора электронов – ферроцианида калия. Изучены pH-зависимости каталитических констант окисления *o*-дианизидина (k_3 и K_s) для модифицированной пероксидазы. Модификация трех СООН-групп фермента *o*-дианизидином примерно в 10 раз уменьшает k_3 и в 1,5 раза K_s (pH 4,0–6,0). Высказаны предположения о роли СООН-групп фермента в пероксидажном катализе.

Метод количественного определения степени модификации карбоксильных групп в белках, предложенный Кошландом [1, 2], основан на активации СООН-групп водорастворимым карбодимидом с последующим замещением карбодимида нуклеофилом – метиловым эфиром глицина. Число модифицированных групп определяется либо с помощью аминокислотного анализа, что весьма трудоемко и не позволяет детектировать малые степени модификации, либо методом меченых атомов, что требует использования реагентов, содержащих радиоактивные изотопы. Ранее был предложен ряд методов спектрофотометрического определения модифицированных карбоксильных групп с помощью карбодимидов или нуклеофилов, содержащих хромофорные заместители [3, 4]. Однако эти реагенты имеют ряд существенных недостатков. Окрашенный нуклеофил – динитрофенилгексаметилендиамин (DPG-диамин) мало реакционноспособен и, кроме того, сильно сорбируется на белке [5]. Его полоса поглощения (360 нм) перекрывается с полосой Сорс в гемовых белках, что затрудняет количественное определение числа присоединившихся остатков DPG-диамина и спектрофотометрическое определение концентрации модифицированного гембелка. Водорастворимый карбодимид, содержащий хромофорную группу (иодметилат-*N-n*-фенилазофенил-*N'*-(*N,N'*-диметиламинопропил)карбодимид) нередко образует с белками неустойчивые соединения, которые разрушаются при хроматографической очистке модифицированного белка [5].

Для определения числа доступных в данных условиях карбоксильных групп в белках в известной реакции их с водорастворимым карбодимидом мы предлагаем использовать в качестве нуклеофильного агента

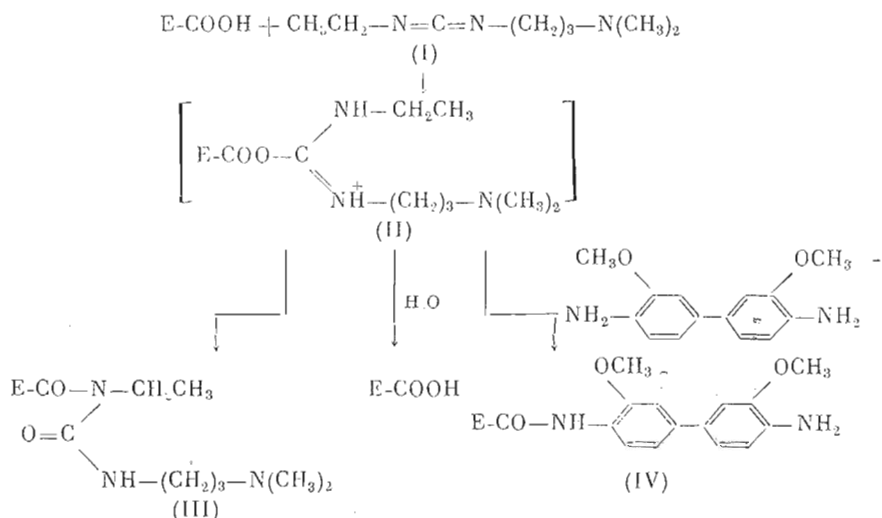
o-дианизидин (3,3'-диметоксибензидин). Этот реагент содержит две аминогруппы с pK 3,6 и 4,7 [6], имеет максимум поглощения при 300 нм (ϵ_{300} 16,5 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ в 0,05 М NaCl), не поглощает в видимой области (рис. 1) и, как будет показано ниже, высокореакционноспособен. Его особенно целесообразно использовать для исследования гемсодержащих белков и ферментов, у которых в спектрах при 300–320 нм наблюдается минимум поглощения, что дает возможность с большей точностью определять степень модификации COOH-групп белка, чем при использовании нуклеофилов, поглощающих в области полосы Core. Например, для пероксидазы хрена минимум поглощения в УФ-области спектра наблюдается при 315 нм (ϵ_{315} 15,0 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$, см. рис. 1а). При использовании же в качестве нуклеофила DPG-диамина измерение поглощения проводят при 360 нм ($\epsilon_{360}^{\text{DPG}}$ 15 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$), где пероксидаза имеет ϵ_{360} 45 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

Ранее было показано [5], что модификация карбоксильных групп пероксидазы хрена водорастворимыми карбодимидами уменьшает константы k_3 и k_4 , характеризующие скорости переноса электрона с донора водорода — *o*-дианизидина на промежуточные формы E_1 и E_2 пероксидазы. Однако число функционально важных карбоксильных групп пероксидазы не было установлено.

Целью настоящей работы была разработка метода спектрофотометрического определения числа доступных карбоксильных групп в белках с использованием *o*-дианизидина и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида (EDP-карбодимид) и выявление с помощью этого метода числа доступных и функционально важных карбоксильных групп в пероксидазе хрена.

Реакция с o-дианизидином и карбодимидом как удобный метод определения доступных карбоксильных групп в белках

Перспективность использования *o*-дианизидина в качестве высоко-реакционного нуклеофила для определения доступных COOH-групп в белках наглядно видна на примере модификации пероксидазы хрена. Пероксидазу модифицировали по методу Кошланда [1], используя 0,01 и 0,1 М EDP-карбодимид и 0,43 мМ *o*-дианизидин. Реакция протекает по схеме [1]:



Растворимость *o*-дианизидина в воде мала [6], поэтому исходный раствор его (4,3 мМ) готовили в абсолютном этиловом спирте, в результате чего реакционная смесь при модификации содержала примерно 10% спирта.

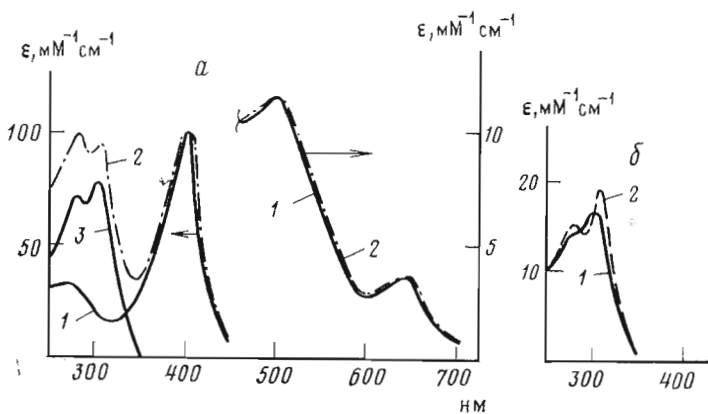


Рис. 1. *a* — спектры поглощения нативной (1) и модифицированной (4 COOH-группы) *o*-дианизидином (2) пероксидазы, их разностный спектр (3); *б* — спектры *o*-дианизидина в растворе (1) и *o*-дианизидина, связанного с белком (2). Условия: 0,05 М NaCl, 22° С

Для модифицированной EDP-карбодимидом и *o*-дианизидином пероксидазы увеличивается поглощение в УФ-области и не наблюдается изменений в поглощении ни в области полосы Core, ни в видимой области. Спектр пероксидазы, модифицированной только EDP-карбодимидом, тождествен спектру нативной пероксидазы. Разностный спектр модифицированного и нативного фермента свидетельствует о том, что остатки *o*-дианизидина, ковалентно связанные с белком, имеют максимум поглощения при 305 нм, а не при 300 нм, как исходный *o*-дианизидин в растворе (рис. 1б). Модельное соединение — N-ацетил-*o*-дианизидин — имеет спектр поглощения той же формы, что и *o*-дианизидин, ковалентно связанный с белком. Молярный коэффициент поглощения модельного соединения, который принимали в качестве ϵ для спектральной характеристики остатков *o*-дианизидина, ковалентно связанных с белком, при 305 нм равен $19,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (см. рис. 1б).

Модифицированный фермент не содержит примеси нативного белка, как показано хроматографией на CM-целлюлозе при pH 5,0 и 4,4 в градиенте Na-ацетатного буфера (0,005–1,5 М). Из-за увеличения общего положительного заряда молекулы модифицированной пероксидазы элюируется при большей ионной силе, чем нативная, и тем позже, чем выше степень модификации карбоксильных групп (рис. 2). Ранее мы показали, что при модификации пероксидазы DPG-диамином и карбодимидом основная часть DPG-диамина связывается с пероксидазой нековалентно и отделяется от белка при хроматографии на CM-целлюлозе [5]. В данном случае число остатков *o*-дианизидина, связанных с белком, после хроматографии не изменяется, что свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции *o*-дианизидина на белке. Методом гель-хроматографии на сефадексе G-100 мы показали, что модифицированная *o*-дианизидином и

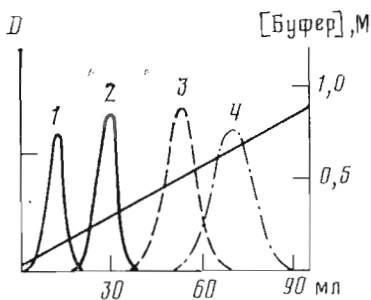


Рис. 2. Хроматография на CM-целлюлозе нативной и модифицированной 0,01 М EDP-карбодимидом пероксидазы (1), пероксидазы, модифицированной в течение 1,5 ч 0,1 М EDP-карбодимидом (2), и пероксидазы, модифицированной EDP-карбодимидом в присутствии *o*-дианизидина (3, 4); 3 — модифицировано 4 COOH-группы, 4 — модифицировано 7 COOH-групп. Условия модификации и хроматографии см. в «Экспер. части». Прямой линией показан градиент буферного раствора

ЕДР-карбодимидом пероксидаза не содержит межмолекулярных сшивок, в то время как при использовании в качестве нуклеофилов других диаминов образовывалось до 20% димеров фермента.

Следует отметить ряд других преимуществ *o*-дианизидина как нуклеофила в реакциях модификации СООН-групп белков при участии карбодимидов.

1. *o*-Дианизидин обладает гораздо большей реакционной способностью, чем другие, обычно используемые нуклеофилы — амины и диамины, поскольку, как было показано нами, при концентрациях, в десятки раз меньших (и прочих равных условиях), модифицирует в пероксидазе большее число карбоксильных групп. Таким образом, используя малые (0,4–0,6 мМ) концентрации *o*-дианизидина, можно осуществить модификацию всех доступных СООН-групп в компактной нативной конформации белковой глобулы, в то время как при обычно используемых концентрациях нуклеофилов (до 1 М) нативная структура белка может быть нарушена.

2. Максимум поглощения *o*-дианизидина, ковалентно связанного с белками, лежит в области минимального поглощения гемсодержащих белков, что уменьшает ошибку при расчете малых степеней модификации СООН-групп. Кроме того, для гемопroteinов молярный коэффициент поглощения в области полосы Сорс после присоединения *o*-дианизидина не изменяется. Это позволяет определять концентрацию модифицированного белка, как и нативного, спектрофотометрически по поглощению в области полосы Сорс.

На примере трипсина мы показали, что *o*-дианизидин удобно использовать также для модификации СООН-групп в других, не содержащих гем белках, поскольку их поглощение при 305 нм не превышает 15% поглощения при 280 нм.

3. С помощью двойной модификации: сначала используя нуклеофил, не несущий хромофорной группы, а затем проводя модификацию повторно в присутствии *o*-дианизидина, можно определять число модифицированных первым нуклеофилом СООН-групп белка; в частности, можно определить число СООН-групп, модифицирующихся одним карбодимидом.

Применение *o*-дианизидина может быть ограничено лишь тем, что из-за его малой растворимости в воде реакционная среда должна содержать около 10% спирта. Однако, несмотря на это, все сказанное выше показывает преимущества и перспективность использования *o*-дианизидина как нуклеофила по сравнению с другими обычно используемыми нуклеофилами для быстрого определения количества доступных СООН-групп в белках и для изучения их расположения в молекуле при различных условиях.

Доступность и функциональная роль карбоксильных групп в пероксидазе

Известно, что при активации карбоксильных групп карбодимидами образуются неустойчивые промежуточные производные *O*-ацилизо мочевины [1] (см. соединение (II) в схеме). В отсутствие нуклеофила эти производные либо гидролизуются водой (если СООН-группы полностью экспонированы в растворитель), либо перегруппировываются в устойчивые производные *N*-ацилмочевины (III), если они маскированы для растворителя и нуклеофила [7] (см. схему).

В присутствии нуклеофила активированные СООН-группы, экспонированные в растворитель, либо гидролизуются, либо ковалентно присоединяют молекулу нуклеофила (соединение (IV)), а активированные СООН-группы, которые маскированы для растворителя и нуклеофила, претерпевают перегруппировку в *N*-ацилмочевину, причем последний процесс протекает во много раз медленнее, чем реакция с нуклеофилом [1]. Таким образом, в зависимости от расположения в глобуле и условий модификации карбоксильные группы белка либо совсем не модифици-

Зависимость числа присоединившихся к пероксидазе остатков *o*-дианизидина и активности модифицированной пероксидазы от концентрации модифицирующих агентов
 Условия реакции модификации: 22° С, 1,5 ч, рН 5,0, концентрация пероксидазы 0,025 мМ

Концентрация модифицирующих агентов		Число присоединенных остатков <i>o</i> -дианизидина	Активность, % от нативного фермента
EDP-карбодимида, М	<i>o</i> -дианизидина, мМ		
0,01	—	—	100
0,1	—	—	45
0,01	0,65	3	30
0,1	0,43	4	20
{ 0,1	{ —	—	45
{ 0,1	{ —		
{ 0,1	{ —		
{ 0,1	{ 0,43	2	20

руются, если находятся вдали от поверхности молекулы и стерически недоступны, либо могут модифицироваться только карбодимидом, либо только нуклеофилом, либо и тем и другим. Мы смогли дифференцировать модифицируемые СООН-группы пероксидазы по их расположению в глобуле фермента, проводя модификацию EDP-карбодимидом в отсутствие и в присутствии *o*-дианизидина.

При реакции пероксидазы с EDP-карбодимидом в отсутствие *o*-дианизидина о степени модификации СООН-групп EDP-карбодимидом можно судить по изменению подвижности модифицированного фермента при хроматографии на СМ-целлюлозе. Пероксидаза, обработанная 0,01 М EDP-карбодимидом при рН 5,0 в течение 1,5 ч, хроматографируется подобно нативному ферменту (рис. 2, 1). Однако объем элюции пероксидазы, модифицированной 0,1 М EDP-карбодимидом в тех же условиях, больше, чем нативной (рис. 2, 2).

Следовательно, при 0,01 М концентрации EDP-карбодимида и рН 5,0 за 1,5 ч не происходит модификации СООН-групп пероксидазы с образованием устойчивых производных *N*-ацилмочевины. 0,1 М EDP-карбодимид в тех же условиях модифицирует некоторое количество СООН-групп пероксидазы.

Изучена зависимость числа присоединяемых молекул *o*-дианизидина от концентрации EDP-карбодимида (таблица), времени модификации и рН среды при постоянной концентрации пероксидазы и *o*-дианизидина (соотношение *o*-дианизидин/пероксидаза=17,2). При рН 5,0 и 0,01 М EDP-карбодимиде (соотношение EDP-карбодимид/пероксидаза=400) модификация протекает медленно и не заканчивается даже за 4 ч. При этом к ферменту присоединяется до трех остатков *o*-дианизидина (рис. 3, 1). В присутствии 0,1 М EDP-карбодимида (соотношение EDP-карбодимид/пероксидаза=4000) уже за 1,5 ч достигается максимальная степень модификации *o*-дианизидином (четыре СООН-группы), и далее число модифицированных СООН-групп не увеличивается (рис. 3, 2). При использовании 0,1 М EDP-карбодимида, в 1,5 раза большей концентрации *o*-дианизидина и прочих равных условиях в ферменте также модифицируются только четыре СООН-группы. Следовательно, при рН 5,0 и 22° С конформация молекулы пероксидазы такова, что экспонированными и доступными модифицирующим агентам являются лишь четыре (из 31) СООН-группы фермента. Остальные СООН-группы, вероятно, маскированы и недоступны в этих условиях модифицирующему агенту.

При рН 4,0 и 0,1 М EDP-карбодимиде 0,43 мМ *o*-дианизидин в пероксидазе максимально модифицирует семь СООН-групп. Различие в степени модификации фермента при рН 5,0 и 4,0 объясняется, по-видимому, тем, что при уменьшении рН происходит некоторое «разрыхление» белко-

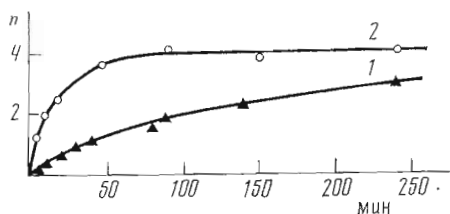


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость числа присоединенных к пероксидазе молекул *o*-дианизидина (n) от длительности модификации. Условия модификации: 22° С, рН 5,0, 25 мкМ пероксидаза, 0,43 мМ *o*-дианизидин, концентрация EDP-карбодимидов 0,01 (1), 0,1 М (2)

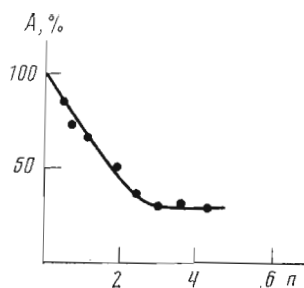


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость относительной активности пероксидазы от числа присоединенных остатков *o*-дианизидина (n)

вой глобулы пероксидазы, в результате чего доступность COOH-групп возрастает.

Таким образом, благодаря высокой реакционной способности *o*-дианизидина мы смогли изучить кинетику реакции модификации и определить максимальное число доступных COOH-групп в пероксидазе при рН 5,0 и 4,0.

Количество COOH-групп пероксидазы, которые модифицируются EDP-карбодимидом в отсутствие нуклеофила, мы определили методом повторной модификации. Сначала фермент инкубировали 1,5 ч с 0,1 М EDP-карбодимидом при рН 5,0 в отсутствие *o*-дианизидина, отделяли избыток реагента, затем проводили повторную модификацию, используя 0,1 М EDP-карбодимид и 0,43 мМ *o*-дианизидин. При этом *o*-дианизидин модифицировал не четыре, а лишь две COOH-группы (таблица). Следовательно, в отсутствие *o*-дианизидина EDP-карбодимид модифицирует две частично маскированные для растворителя COOH-группы с образованием *N*-ацилмочевины. Две карбоксильные группы, которые модифицируются только *o*-дианизидином, по-видимому, более экспонированы в растворителе, чем две другие COOH-группы, которые модифицируются как карбодимидом, так и нуклеофилом в присутствии карбодимида.

Следовательно, четыре максимально доступные модификации *o*-дианизидином при рН 5,0 карбоксильные группы пероксидазы мы смогли отнести к двум типам: две COOH-группы полностью экспонированы в растворителе и две частично маскированы.

Используя 0,01 М EDP-карбодимид и варьируя длительность реакции модификации и концентрации *o*-дианизидина, мы получили препараты модифицированного фермента, содержащие различное число присоединенных остатков *o*-дианизидина. Фракции с одинаковой степенью модификации выделяли хроматографически на СМ-целлюлозе. Мы показали, что препараты с одинаковым числом модифицированных COOH-групп имели одну и ту же активность независимо от того, достигали мы необходимую степень модификации варьированием концентрации *o*-дианизидина или длительности реакции. Причем, как было показано выше, в этом случае не происходит модификации COOH-групп пероксидазы EDP-карбодимидом с образованием *N*-ацилмочевины.

Зависимость активности пероксидазы от степени модификации COOH-групп *o*-дианизидином в присутствии 0,01 М EDP-карбодимида показана на рис. 4. При увеличении числа модифицированных групп до трех активность фермента падает до 30% и далее не уменьшается, хотя число модифицированных COOH-групп может быть увеличено до четырех. Эти три COOH-группы функционально не совсем равноценны: модификация первой снижает активность пероксидазы на 30%, а каждой следующей — на 20%. Возможно, COOH-группа, модифицирующаяся *o*-диани-

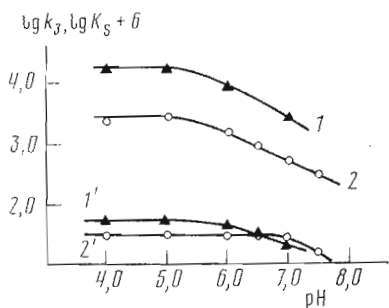


Рис. 5. pH-зависимости каталитических констант k_3 (1, 2) и K_s (1', 2') окисления *o*-дианизидина перекисью водорода для нативной (1, 1') и модифицированной (2, 2') *o*-дианизидином (3 COOH-группы) пероксидазы, полученные при совместном окислении *o*-дианизидина и ферроцианида калия. Условия: 22° С, 0,01 М буфер (pH 4,0–5,0 — Na-ацетатный, pH 6,0–8,0 — Na-фосфатный), 0,1 М KNO₃, 0,1–0,4 нМ пероксидазы, 0,1 мМ K₄Fe(CN)₆, 7,8–172 мкМ *o*-дианизидин, 0,7 мМ H₂O₂.

зидином первой, и есть та единственная группа, модификация которой карбодимидом, содержащим хромофорную группу, уменьшает на 35% активность пероксидазы (см. [5]).

Используя 0,1 М EDP-карбодимид и *o*-дианизидин, мы также получили фермент с тремя модифицированными *o*-дианизидином группами, однако активность его составляла лишь 20% от нативной. Время удерживания модифицированного таким образом фермента на колонке с CM-целлюлозой также значительно увеличивалось. Следовательно, в этом случае происходит модификация дополнительных COOH-групп пероксидазы EDP-карбодимидом с образованием N-ацилмочевины, что несколько уменьшает каталитическую активность фермента.

Обработка пероксидазы 0,1 М EDP-карбодимидом снижает ее активность до 45% от нативной. Повторная обработка карбодимидом не изменяет активности фермента (таблица). Как было показано выше, при этом карбодимидом модифицируются две из трех функционально важных COOH-групп пероксидазы. Последующая модификация данного препарата *o*-дианизидином уменьшает активность фермента до 20% за счет модификации еще одной функционально важной COOH-группы, так же как и в случае, когда первоначально для модификации используют 0,1 М EDP-карбодимид и *o*-дианизидин. Таким образом, из четырех доступных при pH 5,0 COOH-групп пероксидазы функционально важными для процесса окисления *o*-дианизидина являются три группы.

pH-зависимости каталитических констант окисления o-дианизидина из реакции совместного пероксидазного окисления *o*-дианизидина и ферроцианида калия были получены для пероксидазы с тремя модифицированными *o*-дианизидином COOH-группами (рис. 5). Константы индивидуальных стадий пероксидазного окисления *o*-дианизидина (k_3 и k_4), характеризующие скорости переноса электронов с субстрата на промежуточные формы E_1 и E_2 пероксидазы, а также константа связывания субстрата *o*-дианизидина формой E_1 пероксидазы (K_s) были определены как описано ранее [8]. Модификация трех функционально важных COOH-групп пероксидазы уменьшает значения k_3 и k_4 (k_3 примерно в 10 раз, а k_4 в 1,5 раза) во всем диапазоне pH, при этом связывание субстрата несколько улучшается (K_s уменьшается в 1,5 раза) и в меньшей степени зависит от pH, чем для нативной пероксидазы. В то же время каталитические параметры реакции пероксидазного окисления ферроцианида калия для пероксидазы с тремя модифицированными COOH-группами не отличаются от параметров для нативного фермента так же, как и в работе [5].

Таким образом, из четырех доступных модификации COOH-групп фермента три группы, хотя и в не совсем равной степени, функционально важны для пероксидазного окисления *o*-дианизидина — донора водорода, но не участвуют в окислении донора электрона — ферроцианида калия. Одна из трех групп полностью экспонирована в раствор и модифицируется только нуклеофилом — *o*-дианизидином. Две другие несколько маскированы для растворителя и могут быть модифицированы как нуклеофилом, так и карбодимидом с образованием устойчивых производных N-ацилмочевины (в отсутствие нуклеофила).

После модификации трех функционально важных СООН-групп пероксидазы остаточная активность составляет 30% активности нативного фермента. По-видимому, эти группы непосредственно не входят в активный центр пероксидазы, но расположены вблизи него и важны для процесса переноса электронов с органического субстрата — донора водорода — на промежуточные формы E_1 и E_2 пероксидазы. В результате модификации *o*-дианизидином изменяется заряд, увеличивается объем и гидрофобность СООН-групп, поэтому уменьшение констант k_3 и k_4 может быть обусловлено также затруднением диссоциации и выхода продукта в раствор. В то же время связывание органического субстрата, *o*-дианизидина, с ферментом по этим же причинам может облегчаться. На пероксидазное окисление субстратов, в процессе окисления не взаимодействующих с белком (неорганические субстраты), модификация СООН-групп фермента не оказывает влияния.

Экспериментальная часть

Использовали изофермент С пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7), выделенный из коммерческого препарата (Reanal, ВНР) по методу [9]. Очищенный фермент характеризовался величиной $D_{403}/D_{280}=3,2$. Без дополнительной очистки использовали 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (Serva, ФРГ). *o*-Дианизидин, марки ч., очищали возгонкой в вакууме; солянокислый гидроксилламин дважды перекристаллизовывали. Остальные реактивы соответствовали квалификации ос. ч. Для приготовления растворов использовали трижды перегнанную в стекле воду.

Концентрацию пероксидазы определяли спектрофотометрически по поглощению при 403 нм (ϵ_{403} 102 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [10]) или с использованием пиридингеохромогена [11].

Спектральные измерения выполняли на двухлучевом спектрофотометре В-2-25 (Beckman, США); рН измеряли на рН-метре рНМ-64 (Radiometer, Дания).

Модификацию пероксидазы EDP-карбодимидом проводили по методу Кошланда [1]. В 2,9 мл 0,05 М раствора NaCl (22°С) вносили 5,8 или 58 мг EDP-карбодимида (концентрация в реакционной смеси 0,01 или 0,1 М), затем добавляли 0,1 мл 0,75 мМ раствора пероксидазы (концентрация в реакционной смеси 0,025 мМ). В ходе реакции (1,5–4,0 ч) рН 5,0 поддерживали добавлением микроколичеств 1 М HCl. Избыток реагентов удаляли гель-фильтрацией раствора через колонку (1×30 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,05 М раствором NaCl.

Модификацию пероксидазы o-дианизидином проводили аналогично, вводя дополнительно в реакционную смесь *o*-дианизидин, растворенный в абсолютном этиловом спирте, до получения концентраций 0,43 или 0,65 мМ. Реакционная смесь при этом содержала до 10% этанола.

Активность нативной и модифицированной пероксидазы определяли при 22°С по начальной скорости окисления в их присутствии *o*-дианизидина перекисью водорода [12]. К 2,1 мл 0,01 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,1 М KNO_3 (рН 7,0), добавляли 0,2 мл 5 нМ раствора пероксидазы и 0,1 мл 0,43 мМ *o*-дианизидина в 96%-ном этаноле.

Реакцию инициировали введением 0,1 мл 16 мМ H_2O_2 . Увеличение поглощения раствора при 460 нм (ϵ_{460} 30 $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ для продукта окисления *o*-дианизидина [12]) после быстрого перемешивания реагентов регистрировали на спектрофотометре. За меру активности фермента принимали количество мкмоль *o*-дианизидина, окисленного за 1 с таким количеством нативного и модифицированного фермента, в котором содержался 1 мкмоль гемина.

Число присоединившихся к пероксидазе остатков o-дианизидина (n) определяли по поглощению модифицированной пероксидазы при 305 нм, используя формулу

$$n = \frac{D_{305} - [E] \cdot \epsilon_{315}^E}{[E] \cdot \epsilon_{305}^D}$$

где D_{305} — поглощение модифицированной пероксидазы при 305 нм; $[E]$ — концентрация пероксидазы, ϵ_{305}^E — молярный коэффициент поглощения пероксидазы при 305 нм, равный $16,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ϵ_{305}^D — молярный коэффициент поглощения присоединенных к ферменту остатков *o*-дианисидина в $0,05 \text{ M NaCl}$, равный $19,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, определенный для модельного соединения — *N*-ацетил-*o*-дианисидина.

Хроматографию нативной и модифицированной пероксидазы на *CM*-целлюлозе проводили, нанося 5 мл раствора фермента (1 мг/мл) в 5 мМ *Na*-ацетатном буфере (рН 4,4) на колонку (1×9 см) с *CM*-целлюлозой, предварительно уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации *Na*-ацетатного буфера (рН 4,4) от 0,005 до 1,5 М (объем смесителя 160 мл, скорость элюции 22 мл/ч).

рН-Зависимости каталитических констант нативной и модифицированной пероксидазы при окислении *o*-дианисидина и ферроцианида калия получали как описано ранее [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoare D. G., Koshland D. E. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 10, p. 2447–2453.
2. Carraway K. L., Koshland D. E. In: Methods in Enzymology. N. Y.—London: Acad. Press, 1972, v. 25, part B, p. 616–623.
3. Матяш Л. Ф., Оглоблина О. Г., Степанов В. М. Биохимия, 1972, т. 37, № 5, с. 1067–1073.
4. Балаидина Г. Н., Лысогорская Е. Н., Морозова Е. А., Степанов В. М. Химия природн. соединений, 1975, т. 11, № 2, с. 198–201.
5. Угарова Н. Н., Кутузова Г. Д., Рогожин В. В., Савицкий А. П., Скурда Л. А. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1180–1188.
6. Möller K. M., Ottolenghi P. Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 1966, v. 35, № 16, p. 369–389.
7. Timkovich R. Anal. Biochem., 1977, v. 79, № 1, p. 135–143.
8. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Биохимия, 1981, т. 46, № 7, с. 1202–1209.
9. Березин И. В., Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М., Бровко Л. Ю. Биохимия, 1975, т. 40, № 2, с. 297–301.
10. Ogawa S., Shiro Y., Morishima I. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 2, p. 674–678.
11. Falk J. E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Amsterdam — N. Y.—London: Elsevier, 1964, p. 236.
12. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. Биохимия, 1977, т. 42, № 8, с. 1372–1379.

Поступила в редакцию
24.XI.1982

SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATION OF ACCESSIBLE CARBOXYLIC GROUPS IN PROTEINS WITH *o*-DIANISIDINE AND WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDE. DETECTION OF FUNCTIONALLY IMPORTANT CARBOXYLIC GROUPS IN HORSE RADISH PEROXIDASE

ROGOZHIN V. V., KUTUZOVA G. D., UGAROVA N. N., BEREZIN I. V.
Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The perspective of *o*-dianisidine as a reactive nucleophile and its advantages for quantifying the degree of carboxyl modification by the Koshland method has been demonstrated with horse radish peroxidase. The number of attached *o*-dianisidine molecules is determined spectrophotometrically ($\epsilon_{305} 19,0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). *o*-Dianisidine appears especially promising for hemoprotein modification, in the absorption spectra of which the minimum is observed at 300–320 nm. *o*-Dianisidine modifies four COOH-groups of the peroxidase at pH 5,0 and seven at pH 4,0. The degree of modification as a function of the reaction time and of the carbodiimide / enzyme ratio has been studied. Two types of carboxyl groups have been distinguished which differ in their arrangement in the protein globule. Three COOH-groups of the enzyme, modification of which lowers its activity by 70%, have been shown to be functionally important for the peroxidase oxidation of the hydrogen donor, *o*-dianisidine. Modification of the same COOH-groups does not affect the oxidation of the electron donor, potassium ferrocyanide. The pH-dependencies of the catalytic constants for *o*-dianisidine oxidation (k_3 and K_s) have been studied with the modified peroxidase. Modification of three COOH-groups by *o*-dianisidine decreases k_3 about 10 times and K_s 1,5 times (pH 4,0–6,0). A possible role of COOH-groups in the peroxidase catalysis is discussed.