



УДК 577.15.04

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ  
НА АЛЬДЕГИДОСИЛОХРОМАХ*Кумарев В. Ш., Райт А. С., Райт В. К.,  
Салганик Р. И.*

*Новосибирский институт цитологии и генетики СО АН СССР,  
Специальное конструкторско-технологическое бюро  
биологически активных веществ,  
Новосибирский государственный университет*

Описан способ получения производных силикатных материалов с остатками пропионового альдегида, связанного с носителем Si—С-связью. Производные силохромов (альдегидосилохромы) использованы для иммобилизации белков и ферментов. Предложено стабилизировать связь, образуемую альдегидными группами носителя и аминогруппами белков, восстановлением боргидридом натрия. Обсуждены результаты испытаний альдегидосилохромов.

Из множества методов ковалентного связывания белков с водонерастворимыми носителями выделяется исключительно мягкими условиями иммобилизации метод, основанный на взаимодействии аминов и альдегидов [1—10]. Обычно альдегидные группы входят в состав носителя и связывание белков достигается их реакцией с  $\epsilon$ -аминогруппами остатков лизина с образованием, как полагают, продуктов типа имина или карбиноламина [1—5].

Водонерастворимые носители, содержащие альдегидные группы, получают различными способами: обработкой АЕ-целлюлозы [1, 4], полиакриламидного геля [6] или сополимера акриламида и метилакрилата [7] глутаровым альдегидом; частичным окислением полисахаридов [8, 9], а также синтетическим путем [3, 5, 10].

Широко использующиеся носители органической природы обладают, однако, существенными недостатками: чувствительностью к смене растворителей и изменению pH, подверженностью к действию микроорганизмов и пр. [11]. В связи с этим более предпочтительны неорганические носители — силикагель, силикатное стекло, нержавеющая сталь, окись титана. Кроме того, ферменты, иммобилизованные на неорганических носителях, более долговечны, чем связанные с органическими матрицами [12].

К настоящему времени многие ферменты иммобилизованы на неорганических носителях [13], в том числе и посредством взаимодействия аминов и альдегидов [14]. При использовании в качестве носителей силикатных материалов их активация осуществляется действием  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана [15], а образующийся при этом алкиламин обрабатывают глутаровым альдегидом [14]. Удельное содержание остатков алкиламина, введенного таким образом на поверхность частиц пористого

96%-ного стекла (с диаметром пор 2000 Å), варьирует в пределах 30—35 мкмоль/г и в улучшенном варианте — 80—90 мкмоль/г [14]. Количественность превращений на стадии обработки глутаровым альдегидом не определялась, а продукты реакции до сих пор не идентифицированы. Не исключено, что при этом идут несколько реакций, так как препараты глутарового альдегида не индивидуальны в химическом смысле [16]. С 1 г активированного пористого стекла ковалентно связывается обычно от 2 до 20 мг белка.

Нами разработан способ введения остатков алифатического альдегида на поверхность силикатных материалов путем хлорирования их силанольных групп с последующим действием 3,3-диметоксипропилмагнийхлоридом и переводом ацетала в альдегид в кислой среде (см. «Экспериментальную часть»). Этим способом была осуществлена активация выпускаемых промышленностью силохромов, нашедших недавно применение для хроматографии биологически активных соединений [17], а также для иммобилизации ферментов [18]. Характеристики полученных производных силохромов (далее они будут называться альдегидосилохромами) приведены в табл. 1, из которой следует, что удельное содержание остатков пропионового альдегида, связанного с носителем Si—C-связью, находится в пределах 34,7—94,9 мкмоль/г в зависимости от типа силохрома, но в среднем составляет около 4,1 мкмоль/м<sup>2</sup> поверхности.

Таблица 1

Характеристики альдегидосилохромов

Тип силохрома	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г *	Размер пор, Å *	Содержание остатков пропионового альдегида, мкмоль/г
С-1	29	2200—2500	33,7
С-2	59	1600—1800	61,8
С-3	95	700—1000	94,9

\* Характеристики определены в Институте катализа СО АН СССР.

Альдегидосилохромы были испытаны при иммобилизации трех белков: бычьего сывороточного альбумина (БСА), α-химотрипсина (КФ 3.4.4.5) и полинуклеотидфосфорилазы (КФ 2.7.7.8). Выбор первых двух белков был обусловлен в основном тем, что они детально изучены; иммобилизация же полинуклеотидфосфорилазы представляла для нас практический интерес — для ее использования в технологически наиболее простом способе получения синтетических полирибонуклеотидов. Все три белка обеспечили широкий набор параметров, влияющих на процесс иммобилизации: различные молекулярные веса, аминокислотные составы, субъединичное строение и др.

Использованная нами процедура иммобилизации (см. также [19]) заключалась в следующем: поверхность альдегидосилохрома насыщалась белком из раствора, избыточный нековалентно связавшийся белок удалялся повышением ионной силы, а затем проводилась обработка восстанавливающим реагентом, боргидридом натрия. Необходимость последней операции связана с лабильностью образуемых альдегидными группами носителя и аминоклуппами белков шиффовых оснований, диссоциирующих, как известно, при низких значениях рН. Кроме того, нами было замечено, что иммобилизованная без обработки боргидридом полинуклеотидфосфорилаза при хранении в трис-НСl-буфере, рН 8, переходит в раствор, по-видимому, благодаря замене в составе шиффового основания аминоклупп фермента аминоклуппами трис(гидроксиметил)аминометана. Аналогичный факт — замещение иммобилизованного на частично окисленной целлюлозе трипсина субстратом (БСА) — отмечен также в работе

## Иммобилизация белков на силикохромах

Иммобилизуемый белок	Альдегидосилохром	рН иммобилизации	Количество белка *				Удельная активность иммобилизованного фермента, % от исходной
			удержанного, мг/г носителя	десорбированного, % от удержанного	ковалентно связанного		
					мг/г носителя	мг/микомоль альдегидных групп	
$\alpha$ -Химотрипсин	С-2	5	462	67,3	152	2,46	100
		7	458	43,2	178	2,88	100
		8	526	87,3	67	1,08	91
БСА	С-2	5	274	10,9	244	3,95	—
		7	240	26,7	176	2,85	—
		8	176	33,0	119	1,92	—
	С-1	8	46	56,5	20	0,59	—
	С-3	8	144	11,8	116	1,22	—
Полинуклеотидфосфорилаза	С-3	8	215	26,3	160	1,69	—
	С-2	8	212	41,5	123	1,99	—
	С-1	8	53	41,5	31	0,92	64,8
		8	86	62,8	32	0,95	65,0
		8	52	48,1	27	0,80	68,0

\* Средние данные экспериментов. Относительная вариации количества белка, ковалентно связанного с 1 г носителя,  $\pm 10\%$ .

[8]. Вероятно, по этой причине ферменты, иммобилизованные с помощью глутарового альдегида, используют в буферных средах, не содержащих амины.

Стабилизация ковалентной связи между белком и альдегидосилохромом должна осуществляться в таких условиях, чтобы не происходило восстановления дисульфидных мостиков, важных для проявления ферментативных функций. Этим требованиям удовлетворяют условия, найденные в работе [20] и используемые также для восстановления алкилирования аминокрупп белков [21]. Обработывая растворы полинуклеотидфосфорилазы при 4—6° боргидридом натрия (1 мг/мл), мы убедились, что изменений в активности фермента не происходит, а применение этой процедуры к иммобилизованным ферментам обеспечивало необратимость их связывания. Потеря нативным трипсином половины активности, наблюдаемая в работе [8], при действии восстановителя объясняется, по-видимому, более высокой (в 5—10 раз) концентрацией боргидрида натрия.

Экспериментальные данные по иммобилизации БСА,  $\alpha$ -химотрипсина и полинуклеотидфосфорилазы на альдегидосилохромах (табл. 2) позволяют сделать ряд заключений. В интервале рН 5—8, в котором функционирует большинство ферментов, с альдегидосилохромами связывается ковалентно 13—89% общей массы белков, удерживаемых на поверхности носителя до процедуры десорбции. Адсорбция, осуществляемая за счет полярных взаимодействий и водородных связей [22], в данном случае способствует пространственному сближению реакционноспособных центров белка и носителя.

Как было показано в работе [22], адсорбируемость белков силикатной поверхностью зависит от их изоэлектрических точек: чем выше рI, тем больше адсорбируемость. Известно, что рI  $\alpha$ -химотрипсина 8,1 [23], а рI БСА — 4,9 [24], и в соответствии с этим до десорбции на поверхности альдегидосилохрома удерживается почти вдвое большее количество  $\alpha$ -химотрипсина, чем БСА (табл. 2). С увеличением рН от 5 до 8 адсорбция  $\alpha$ -химотрипсина практически не меняется, тогда как адсорбция БСА падает в 1,5 раза. Вместе с тем как при рН 5, так и при рН 8 ковалентно связывается с альдегидосилохромами больше БСА, чем  $\alpha$ -химотрипсина, причем с повышением рН количество ковалентно связываемого белка уменьшается примерно в 2 раза.

Отмеченные особенности мы склонны объяснять индивидуальными свойствами белков, прежде всего их аминокислотным составом и третичной структурой. Так, различия в ковалентном связывании белков являются, очевидно, следствием большего ( $\sim$  в 1,4 раза) количества остатков лизина, приходящихся на единицу веса, у БСА, чем у  $\alpha$ -химотрипсина. Кроме того, при изменении pH не исключена конформационная перестройка белковой глобулы, при которой может произойти и перераспределение полярных участков на ее поверхности, что в свою очередь должно влиять на ориентацию глобулы при посадке на носитель. Известно, например, что вблизи pH 8 депротонируется N-концевая аминогруппа В-цепи  $\alpha$ -химотрипсина, что влечет за собой образование нового pH-конформера [25]. В области кислых значений pH структурные изменения наблюдаются и у БСА [26].

Влияние типа носителя на иммобилизацию исследовалось нами на примере БСА и полинуклеотидфосфорилазы при pH 8. С ростом емкости при переходе от С-1 к С-3 удельное ковалентное связывание растет (табл. 2). Количество белка, ковалентно связываемого с 1 мкмоль альдегидных групп, зависит от индивидуальных характеристик как используемых белков, так и носителей. Не исключено, что падение величины этого параметра при переходе от С-2 к С-3 частично обусловлено лимитирующим влиянием диффузии белков внутрь пор силикохромов.

Емкость альдегидосилохромов по белку в интервале pH 5—8 варьирует от 20 до 244 мг/г, что на порядок выше, чем этого удается достичь способами, обсуждавшимися нами [14, 15].

Наиболее важной характеристикой иммобилизованного фермента является доля сохраненной им при иммобилизации активности. Так,  $\alpha$ -химотрипсин, связанный через глутаровый альдегид с аммосилианизированным стеклом, теряет ровно половину активности [14]. В нашем случае этот фермент сохраняет активность почти полностью (табл. 2). Это означает, что связывание с носителем идет лишь по поверхностным участкам молекул  $\alpha$ -химотрипсина и не затрагивает гидрофобного, упрятого внутрь молекулярной структуры, активного центра [27].

При иммобилизации полинуклеотидфосфорилазы, молекулярный вес которой почти в 10 раз больше молекулярного веса  $\alpha$ -химотрипсина и которая имеет сложное субъединичное строение [28], удается сохранить до 68% активности. Потерю активности можно объяснить как многоточечностью связывания, так и полярным характером активного центра. Отметим, что при иммобилизации этого фермента на активированной бромцианом целлюлозе сохраняется лишь 26% активности [29].

В настоящей работе нами использован только один способ иммобилизации на альдегидосилохромах. Другой способ непосредственной иммобилизации на таких носителях осуществим в присутствии изоцианатов [30]. В этом случае в реакцию будут вступать также и карбоксильные группы белков.

На основе альдегидосилохромов могут быть приготовлены также адсорбенты для биоспецифической хроматографии [31]. Адсорбционные свойства собственно силикатной поверхности являются, как было показано, преодолимым препятствием [32].

Благодаря легкой конвертируемости альдегидной группы на основе альдегидосилохромов могут быть получены другие производные силикохромов с реакционноспособными группами, наиболее часто используемыми при иммобилизации белков.

### Экспериментальная часть

В качестве силикатных материалов использованы силикохромы С-1, С-2 и С-3. Активацию носителей проводили следующим образом: в двугорлой круглодонной колбе на 1 л, снабженной обратным холодильником и

механической мешалкой, кипятили 100 г сухого силохрома в 300 мл хлористого тионила в течение 24—48 ч. После охлаждения и декантации основной массы хлористого тионила остатки его удаляли под вакуумом (10 мм рт. ст., 50°, 2 ч). 3,3-Диметоксипропилмагнийхлорид получали по методу работы [33]. В трехгорлую колбу, снабженную капельной воронкой, обратным холодильником и механической мешалкой, помещали 0,066 г-атома магниевых стружек, промывали их кипящим абсолютным тетрагидрофураном, добавляли 30 мл тетрагидрофурана и активировали стружки йодом и дибромэтаном. Затем в один прием добавляли 0,015 моль хлорацетата. Если реакция не начиналась, реакционную смесь осторожно нагревали до кипения. После начала реакции прибавляли еще 0,045 моль хлорацетата в 30 мл тетрагидрофурана со скоростью, поддерживающей равномерное кипение (обычно 30—60 мин). По окончании добавления кипятили еще 20—30 мин до почти полного растворения магниевых стружек. Смесь разбавляли 300 мл тетрагидрофурана и заливали ею высушенный хлорированный силохром. После встряхивания реакционной смеси в течение 1 ч растворитель отсасывали с обратным фильтром, промывали дважды порциями по 300 мл тетрагидрофурана и в последней порции переносили силохром на воронку с пористым фильтром. Далее промывали метиловым или этиловым спиртом, 1 н. HCl, водой, снова спиртом и сушили в вакууме. Содержание остатков пропионового альдегида в образцах альдегидосилохромов определяли по реакции с солянокислым гидроксиметином, оттитровывая щелочью выделившуюся кислоту с потенциометрической индикацией (прецизионный pH-метр ОР-205, «Radelkis», Венгрия).

Полинуклеотидфосфорилаза была выделена из биомассы *E. coli*. В по методу, включающему следующие стадии очистки: получение грубого экстракта действием лизоцима в присутствии ДНКазы, обработка стрептомицисульфатом, фракционирование сульфатом аммония (40—55% насыщения), хроматография на DEAE-сефадексе А-50. Использовали БСА фирмы «Biomer» (Польша),  $\alpha$ -химотрипсин — фирмы «Srofa» (Чехословакия).

Активность полинуклеотидфосфорилазы определяли по реакции полимеризации аденозин-5'-дифосфата, принимая за единицу активности такое количество фермента, которое за 10 мин превращает 1 мкмоль ADP в полиадениловую кислоту. Активность  $\alpha$ -химотрипсина определяли, используя *n*-нитрофенилацетат, как описано в [34].

Концентрацию белка в растворах устанавливали по методу Лоури [35].

Иммобилизацию проводили следующим образом: порцию альдегидосилохрома заливали водой и тщательно дезаэрировали в вакууме, затем упаковывали в колонку и уравнивали буферным раствором. Для поддержания pH 5, 7 или 8 использовали соответственно 0,1 М ацетатный, фосфатный и боратный буферы. Раствор белка с концентрацией около 10 мг/мл многократно пропускали через колонку с альдегидосилохромом при 4—6° до прекращения изменения концентрации белка (около 2 ч). Для удаления с поверхности альдегидосилохрома адсорбированного белка колонку промывали 1 М NaCl в буфере, а затем буфером. Для стабилизации ковалентной связи между белком и носителем через колонку пропускали несколько объемов раствора боргидрида натрия (1 мг/мл) в буфере. Количество белка, ковалентно связанного с альдегидосилохромами, рассчитывали по разности между удержанным на колонке и десорбированным белком. Перед определением активности иммобилизованных ферментов образцы подвергали тщательной дезаэрации. Раствор  $\alpha$ -химотрипсина готовили непосредственно перед экспериментом.

Авторы благодарят В. С. Богачева (Институт цитологии и генетики СО АН СССР) за техническую помощь в синтезе альдегидосилохромов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Habeeb A. S. F. A. (1967) Arch. Biochem. and Biophys., **119**, 264—268.
2. Haynes R., Walsh K. A. (1969) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **36**, 235—242.
3. Goldstein L., Pecht M., Blumberg S., Atlas D., Levin Y. (1970) Biochemistry, **9**, 2322—2334.
4. Glassmeyer C. K., Ogle J. D. (1971) Biochemistry, **10**, 786—792.
5. Brown E., Joyeau R. (1974) Polymer, **15**, 546—552.
6. Weston P. D., Avrameas S. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **45**, 1574—1580.
7. Jochansson A.-Ch., Moshbach K. (1974) Biochim. et biophys. acta, **370**, 348—353.
8. Van-Leemputten E., Horisberger M. (1974) Biotechnol. and Bioeng., **16**, 997—1003.
9. Flemming Ch., Gabert A., Roth P. (1974) Acta biol. et med. ger., **33**, 15—20.
10. Epton R., McLaren J. V., Thomas T. H. (1971) Biochem. J., **123**, 21P—22P.
11. Weetall H. H. (1971) Res. and Develop., **22**, 18—22.
12. Weetall H. H. (1970) Biochim. et biophys. acta, **212**, 1—7.
13. Royer G. P., Andrews J. P., Uy R. (1973) Enzyme Technol. Dig., **1**, 99—138.
14. Robinson P. J., Dunnhill P., Lilly M. D. (1971) Biochim. et biophys. acta, **242**, 659—661.
15. Weetall H. H. (1969) Science, **166**, 615—617.
16. Korn A. U., Feairheller S. H., Filachione E. H. (1972) J. Mol. Biol., **65**, 525—529.
17. Eltecov Y. A., Kiselev A. V., Khokhlova T. D., Nikitin Y. S. (1973) Chromatographia, **6**, 187—189.
18. Варламов В. П., Львова Т. Н., Ваньковский Д. Г., Мокеев В. Я., Татарская Р. И., Рогожин С. В. (1975) Биоорганич. химия, **1**, 816—820.
19. Кумарев В. П., Райт А. С., Райт В. К., Хомов В. В. (1974). Положит. решение от 20 ноября 1974 г. по заявке № 1989378/28—13.
20. Fischer E. H., Kent A. B., Snyder E. R., Krebs E. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., **80**, 2906—2907.
21. Means G. E., Feenly R. E. (1968) Biochemistry, **7**, 2192—2201.
22. Messing R. A. (1970) J. Amer. Chem. Soc., **91**, 2370—2371.
23. Штрауб Ф. Б. (1965) В кн. Биохимия, с. 68, изд. АН Венгрии, Будапешт.
24. Леншиджер А. (1974) В кн. Биохимия, с. 152, «Мир», М.
25. Mavridis A., Tulinsky A., Liebman M. N. (1974) Biochemistry, **13**, 3661—3666.
26. Нейрат Г., Бэйли К. (1958) Белки, с. 326, т. 3, ч. II, ИЛ, М.
27. Henderson R. (1970) J. Mol. Biol., **54**, 341—354.
28. Godefroy-Colburn T., Grunberg-Manago M. (1972) In The Enzymes (Boyer P. D., ed.), 3rd Ed., vol. 7, pp. 533—574.
29. Hoffman C. H., Harris E., Chodroff S., Michelson S., Rothrock J. W., Peterson E., Reuter W. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **41**, 710—714.
30. Axen R., Wretblad P., Porath J. (1971) Acta chem. scand., **25**, 1129—1132.
31. Weetall H. H. (1974) In Separation and Purification Methods (Perry E. S., Van Oss C. J., Grushka E., eds.), vol. 2, pp. 199—229.
32. Hawk G. L., Cameron J. A., Dufault L. B. (1972) Preparative Biochem., **2**, 193—203.
33. Whol A., Momber F. (1914) Ber., **47**, 3346—3358.
34. Dupaix A., Bechet J.-J., Roncons C. (1973) Biochemistry, **12**, 2559—2566.
35. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265—275.

Поступила в редакцию  
9.X.1975

### IMMOBILIZATION OF PROTEINS AND ENZYMES ON SILICA ALDEHYDES

KUMAREV V. P., RAIT, A. S., RAIT V. C., SALGANIK R. I.

*Novosibirsk Institute of Cytology and Genetics, Academy  
of Sciences of the USSR, Novosibirsk and Novosibirsk  
State University*

Silica aldehydes were obtained by chlorination of silanol groups of silica porous particles (silochromes) by treatment with 3,3-dimethoxypropyl-Mg-chloride and subsequent hydrolysis of acetal in acid medium. The capacity of propionic aldehyde attached to carrier via Si — C-linkage was 33.7—94.9  $\mu\text{m/g}$  ( $\sim 1,1 \mu\text{m/m}^2$ ). Silica aldehydes were used for immobilization of proteins and enzymes by procedure involving stabilization of the covalent linkages between aldehydes and amino groups by reduction with sodium borohydride. The total amount of protein coupled covalently to carriers was 20—244 mg/g at pH 5—8. The enzyme activity retained by the immobilized protein was more than 91% for  $\alpha$ -chymotrypsin and up to 68% for polynucleotide phosphorylase. The methods of conversion of silica aldehydes to other active derivatives commonly used for immobilization have been discussed.