

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАСТВОРИМЫХ КОМПЛЕКСОВ
ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ
С ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМ ДЕКСТРАНСУЛЬФАТОМ
ГЕЛЬХРОМАТОГРАФИЕЙ**

***Н. В. Глазова, Р. Б. Пономарева, А. Т. Меленевский,
Г. Э. Елькин, Г. В. Самсонов***

В последние годы сильно возросло теоретическое и практическое значение исследований взаимодействующих систем макромолекул, среди которых значительный интерес представляют комплексы ферментов с синтетическими полимерами в растворе. Количественный анализ закономерностей связывания в таких системах может проводиться на основе использования динамических (в том числе хроматографических), мембранных, калориметрических и других методов. Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия РНКазы с высокомолекулярным полисахаридом — декстрансульфатом (ДС), который является модификатором активности РНКазы; это изучение проведено методом гельхроматографии на сепарозе B6.

Для анализа качественных и количественных закономерностей связывания в данной системе мы воспользовались хроматографическим методом, разработанным нами ранее [1, 2], в основу которого положена теория равновесной элютивной хроматографии. Теория позволяет рассчитать равновесную константу реакции комплексообразования K (для реакции 1-го порядка) по формуле

$$K = \frac{V_2 - V^*}{V^* - V_1}, \quad (1)$$

где V_1 — элюционный объем белка, V_2 — элюционный объем полимера и стабильного комплекса белок — полимер, V^* — элюционный объем диссоциирующего комплекса, мл ; $K = K' / [c_{\Pi}]$ (K' — равновесная константа диссоциации $\text{мл}/\text{мл}$, которая для реакции белок (Б) + полимер (П) \rightleftharpoons комплекс (БП) выражается $K' = [c_B] [c_{\Pi}] / [c_{B\Pi}]$, где $[c_B]$, $[c_{\Pi}]$ и $[c_{B\Pi}]$ — равновесные концентрации белка, полимера и комплекса соответственно).

Для случая, когда хроматографический эксперимент проводится в отсутствие химического и межфазного равновесия в системе, нами был проведен теоретический анализ, дающий возможность определения равновесных и кинетических констант реакции комплексообразования [3]. Анализ основан на решении системы уравнений материального баланса с учетом химических источников при внутридиффузионном лимитировании кинетики. Равновесная константа реакции комплексообразования K в этом случае может быть определена по положению центра тяжести кривой элюции комплекса V_{cp} с помощью формулы

$$K = \frac{V_{cp} - V_0}{V_0 - V_{cp} + (1 - \alpha) K_d V_{kol}}, \quad (2)$$

где V_{cp} — объем, соответствующий положению центра тяжести кривой элюции комплекса, V_0 — удерживаемый объем, V_{kol} — объем колонки, мл ; $(1 - \alpha)$ — доля неподвижной фазы, K_d — коэффициент распределения.

Кинетические константы прямой и обратной реакции комплексообразования k_{+1} и k_{-1} : $B + P \rightleftharpoons B\Pi$ могут быть рассчитаны с помощью полного решения системы уравнений при предположениях о мгновенном установлении межфазного равновесия в системе и избытке полимера в растворе (константа k_{+1} , как и K , включает в себя, как постоянную концентрацию c_{Π}). Расчет показывает, что форма выходной кривой зависит от обобщенной длины колонки

$$L = 3(1 - \alpha) K_d \frac{x}{v}, \quad (3)$$

(x — длина колонки, см; v — скорость протекания раствора через колонку, см/сек) и что существует характерная для данной системы величина L_0 , от значения которой зависит количество максимумов на выходной кривой: при $L > L_0$ — один, а при $L < L_0$ — два максимума. Используя экспериментально найденные значения L_0

и K (рис. 1), можно определить нормированные кинетические константы скорости прямой и обратной реакции комплексообразования k и r . Они связаны с константами k_{+1} и k_{-1} формулами

$$r = k_{-1}/q \quad (4)$$

$$k = k_{+1}/q, \quad (5)$$

где $q = 3(1 - \alpha) K_d$.

В работе использовали РНКазу производства завода медикорпаратов при объединении Ленмасопром, дополнительно очищенную гельхроматографией на сепадексе G-75. Активность фермента измеряли, используя в качестве субстрата дрожжевую РНК [4] и уридин 2',3'-циклофосфат [5]. ДС производства «Serva» с $M = 5 \cdot 10^6$ также дополнительного очищали от низкомолекулярных фракций на сепарозе В6. Очищенную фракцию ДС осаждали 96%-ным этанолом; $[\eta] = 0,9 \text{ дL/g}$, содержание серы 15,8%. Опыты по изучению комплексов методом гельхроматографии проводили на колонке из сепароза В6 ($1,1 \times 61 \text{ см}$). Место выхода ДС из колонки определяли

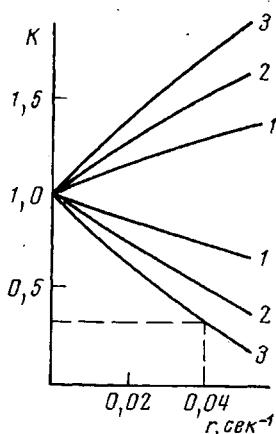


Рис. 1. Семейство изолиний L_0 (K, r) при $L_0 = 10$, 20 (2), 30 (3). Пунктиром показан способ графического определения r при $K = 0,308$

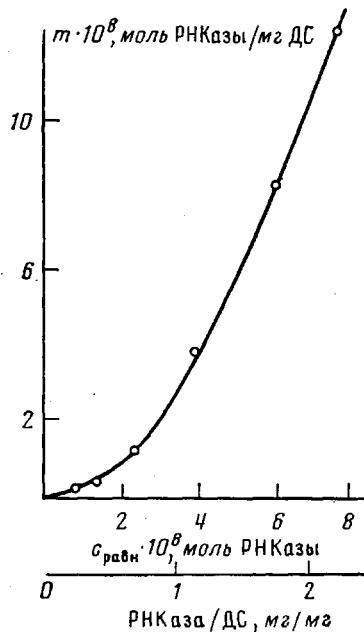


Рис. 2. Изотерма связывания РНКазы высокомолекулярным ДС при $\text{pH } 7$ и 20° (верхний ряд цифр на оси абсцисс относится к равновесной концентрации РНКазы в растворе, нижний — к весовому соотношению белок : полимер)

цветной реакцией по методу [6], а белковую зону — по методу Лоури [7]. Хроматографический эксперимент проводили на фоне постоянной концентрации полимера; объем пробы 1,5 мл.

Мы применили метод элютивной хроматографии [1—3] для изучения взаимодействия ДС_{500} с панкреатической РНКазой при $\text{pH } 7$ в 0,133 н. боратном буферном растворе и температуре 20° . Изотерма связывания, полученная для этой же системы изучением диффузии РНКазы через полиструю мембранный «миллипор» по методу [7], представлена на рис. 2. Как видно из рисунка, она не линейна. Такой ход изотермы может быть обусловлен кооперативностью процесса взаимодействия РНКазы с высокомолекулярным ДС. В связи с этим нам предсталось интересным провести хроматографический анализ комплексов, полученных при различных весовых соотношениях белок — полимер и соответствующих точкам различных участков изотермы связывания (рис. 2). Было изучено влияние весового соотношения РНКазы и ДС в комплексе на скорость перемещения белкового максимума по колонке и на изменение кинетики обратимого взаимодействия полимеров.

В хроматографических экспериментах, представленных на рис. 3, мы сохраняли постоянную концентрацию РНКазы в пробе комплекса, наносимой на колонку, и меняли концентрацию ДС (соответственно в пробе и фоне). Хроматографический анализ комплексов с различным весовым соотношением РНКазы и ДС проводили, варьируя скорость пропускания раствора через колонку для получения выходных кривых с одним и двумя максимумами (рис. 4). Такая постановка эксперимента позволяет анализировать процесс комплексообразования в изучаемой системе в соответствии с изложенной выше теорией. Из кривой 3 рис. 2 следует, что скорость пере-

Рис. 3. Влияние весового соотношения РНКазы и ДС в комплексе на скорость перемещения белкового комплекса по колонке

Рис. 4. Выходные кривые комплексов РНКазы с ДС при весовом соотношении компонентов 0,55 (1, 3) и 1,2 (2, 4) и при скоростях пропускания раствора через колонку сефарозы В6, мл/час: 1 — 16, 2 — 3,5, 3 — 20, 4 — 4,8; диаметр колонки 1,1, высота — 61 см; V_e _{ДС} = 18, V_e _{РНКазы} = 52 мл

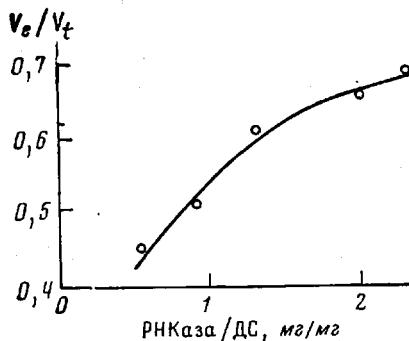


Рис. 3

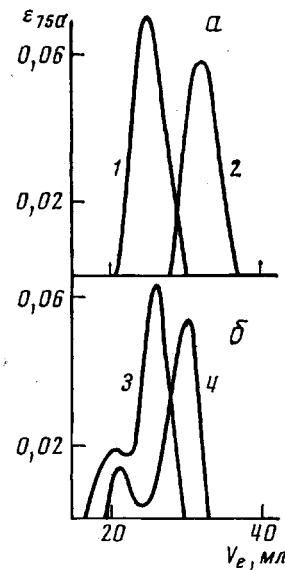


Рис. 4.

мещения белкового максимума на хроматограмме, которую мы характеризуем отношением объема колонки V_t к объему элюции комплекса V_e падает с увеличением отношения белок : полимер. Однако по изотерме связывания (рис. 2) видно, что при этом резко возрастает значение m (количество молей РНКазы, связанной миллиграммом ДС). Поэтому данные хроматографии (рис. 3) можно объяснить уменьшением (уплотнением) размеров частиц комплекса с возрастанием содержания в нем РНКазы (по мере протекания кооперативного процесса). Это предположение хорошо согласуется и с результатами вискозиметрических измерений.

Сопоставление скорости пропускания раствора через колонку со скоростью обратимого процесса комплексообразования позволяет по экспериментальным данным, представленным на рис. 4, оценить характерное время реакции ассоциации — диссоциации (величину, обратную константе скорости реакции 1-го порядка) анализируемых систем комплексов. Как следует из рис. 4, б, появление двух белковых максимумов на хроматограмме для системы с исходным весовым соотношением белок : полимер = 0,55 мг/мг наблюдается при скорости пропускания раствора через колонку 20 мл/час, а для системы с соотношением 1,2 мг/мг — при 4,8 мл/час. По этим данным и известным объемам элюции диссоциирующих комплексов (когда на хроматограмме наблюдается один белковый максимум, рис. 4, а) было найдено, что характерное время реакции комплексообразования изучаемых систем комплексов возрастает от 1,3 часа до 6,7 час. при изме-

нении весового отношения исходных компонентов в анализируемой пробе от 0,55 до 1,2 мг/мг.

Для начального участка изотермы связывания (рис. 2), когда зависимость близка к линейной, мы воспользовались данными хроматографического анализа комплексов с исходным весовым соотношением компонентов 0,55 мг/мг и провели оценку равновесной и кинетических констант реакции комплексообразования этой системы, считая, что реакция в этом случае идет по 1-му порядку: $K = 0,308$ по формуле (1) и $K = 0,27$ по формуле (2). Близость значений K , рассчитанных по формулам (1) и (2), показывает, что условия эксперимента близки к равновесным. Для оценки нормированных кинетических констант скоростей прямой и обратной реакций комплексообразования k и r мы произвели предварительно расчет значений L_1 и L_2 по формуле (3) (L_1 — обобщенная длина колонки, при которой выходная кривая 3 на рис. 4, б имеет два максимума, а L_2 — обобщенная длина колонки, при которой выходная кривая 1 на рис. 4, а имеет один максимум). Подставляя значения скорости $v_1 = 4,56 \cdot 10^{-3}$, $v_2 = 5,84 \cdot 10^{-3}$ см/сек, $\alpha \approx 0,35$, $V_{\text{кол}} = 0,2$, $K_d \approx 0,85$, $x = 61$ см в формулу (3), получаем $L_1 = 28700$, $L_2 = 23300$ сек и находим $L_0 = (L_1 + L_2)/2$. Теоретический анализ работы [3] показывает, что в случае мгновенного установления межфазного равновесия зависимость L_0 от r близка к обратнопропорциональной. Поэтому, определив значение r' по кривой 3 (рис. 1) с учетом K , можно определить истинное значение r , характерное для данной системы, по формуле $r = r'L_0'/L_0$ (L_0' — величина, по которой определяется значение для r' по кривой 3 рис. 1). По найденному значению $r = (2 \pm 1) \cdot 10^{-5}$ сек⁻¹ находим $k = (8 \pm 1) \cdot 10^{-5}$ сек⁻¹. Отсюда константы $k_{+1} = (16 \pm 1) \cdot 10^{-5}$ и $k_{-1} = (4 \pm 1) \cdot 10^{-5}$ сек⁻¹.

Таким образом, показана возможность вычисления равновесных и кинетических констант реакции комплексообразования по приведенной выше методике. Полученные значения свидетельствуют о том, что характерное время реакции образования комплекса велико (порядка 6 час.)

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
17 III 1975

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. В. Самсонов, Р. Б. Пономарева, Биофизика, 13, 213, 1968.
2. Г. В. Самсонов, Р. Б. Пономарева, Р. Г. Лучко, Биофизика, 14, 63, 1969.
3. Г. Э. Елькин, А. Т. Меленевский, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., Б16, 871, 1974.
4. M. Kunitz, J. Gen. Physiol., 33, 349, 1950.
5. E. M. Crook, A. P. Mathias, B. R. Rabin, Biochem. J., 74, 234, 1950.
6. M. Dubois, A. Cilles, J. K. Hamilton, P. Robers, F. Smith, Analyt. Chem., 28, 350, 1956.
7. D. H. Lowry, N. I. Rosenbrough, A. L. Farr, R. I. Randall, J. Biol. Chem., 265, 1963, 1951.
8. Т. И. Рожанская, Л. В. Дмитренко, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., Б14, 370, 1972.