

УДК 541.64:547.962.3

**АЦИЛИРОВАНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
ХЛОРАНГИДРИДАМИ НЕПРЕДЕЛЬНЫХ КИСЛОТ**

***Платэ Н. А., Постников В. А., Лукин Н. Ю.,
Эйсмонт М. Ю., Грудкова Г.¹***

Электрофокусированием в акриламидном геле и препаративным электрофокусированием определены изоэлектрические точки сывороточного альбумина, ацилированного хлорангидридами акриловой и метакриловой кислот. Установлено, что при введении максимально возможного числа двойных связей в белок его изоэлектрическая точка изменяется от 4,91 до 4,68 ($\pm 0,03$). Обнаружено, что в первую очередь ацилируется концевая аминогруппа белка — аспарагин. Все ненасыщенные производные ацилированного сывороточного альбумина легко вступают в сополимеризацию с акриламидом.

Ранее [1] было показано, что взаимодействие хлорангидрида метакриловой кислоты с молекулами ферментов (трипсином, α -химотрипсином, фибринолизином) приводит к их ацилированию, в результате чего возникает непредельное производное соответствующих белков, своеобразный «макромономер», способный к гомо- и сополимеризации с другими мономерами.

Подобная реакция представляет интерес, например, для синтеза гидрогелей, содержащих иммобилизованные физиологически активные вещества, биоспецифических адсорбентов, а также других производных молекул белков с сохранением в ряде случаев физиологической активности модифицируемого соединения [2].

Предполагается, что в реакцию ацилирования с хлорангидридами кислот вступают свободные аминогруппы белка.

Хотя подобная реакция хорошо известна в органической химии, однако до сих пор в литературе не было никаких данных относительно того, по каким именно аминогруппам она осуществляется и какова эффективность этой реакции. Выяснение этих вопросов необходимо для того, чтобы решать проблемы модификации биомолекул, превращая их в реакционные производные с целью иммобилизации в полимерных матрицах.

Цель настоящей работы — изучение некоторых закономерностей ацилирования белков на примере сывороточного альбумина и хлорангидридов акриловой и метакриловой кислот (ХАК и ХМАК) соответственно.

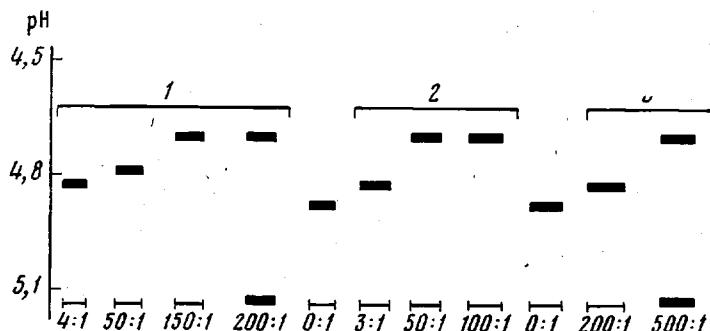
Как видно из рисунка, по данным электрофокусирования, на поликариламидных пластинах с амфолинами при соотношениях хлорангидрид кислоты:белок от 4:1 до 200:1 моль/моль наблюдается смещение изоэлектрических точек белка в более кислую область, что указывает на изменение основности белка.

Изоэлектрические точки полученных белков зависят от исходного соотношения ацилирующий агент:белок до определенных значений, однако при достижении соотношений более 150:1 для ХМАК и более 50:1 для ХАК изоэлектрические точки не изменяются. Кроме того, при больших соотношениях ацилирующий агент:белок, по-видимому, происходит денатурация сывороточного альбумина. На электрофорограммах при больших соотношениях хлорангидрид:белок появляется белок, не смещающийся со старта (рисунок). В модельных опытах было установлено, что альбумин, растворенный в 8 моль/л растворе мочевины, вообще не смещается со старта при электрофокусировании на поликариламидных пла-

¹ Институт макромолекулярной химии ЧСАН, Прага.

стинах с амфолинами. Из рисунка также видно, что для синтеза ацетильных производных альбумина требуется существенно больший избыток хлорангидрида уксусной кислоты, чем в случае хлорангидридов непредельных кислот, что связано, по-видимому, с большей скоростью гидролиза этого хлорангидрида в условиях синтеза [3]. Различие же в ацилировании белка с помощью ХМАК и ХАК, проявляющееся в достижении постоянства изоэлектрических точек продуктов при меньших относительных количествах ХАК, может быть обусловлено различной активностью этих хлорангидридов при ацилировании.

Для точного определения изоэлектрических точек ацилированных белков были проведены опыты по препаративному электрофокусированию



Электрофорограммы ацилированного сывороточного альбумина в зависимости от исходного соотношения ацилирующий агент : белок: 1 – ХМАК, 2 – ХАК, 3 – хлорангидрид уксусной кислоты

N-метакрилоильных производных альбумина. Результаты представлены в таблице.

Как уже отмечалось, во всех случаях, начиная с соотношения ацилирующий агент : белок = 4 : 1 моль/моль, электрофорограммы продуктов реакции указывают на отсутствие исходного сывороточного альбумина. Из этого следует, что по крайней мере одна группа белковой молекулы ацилируется легко. Среди групп сывороточного альбумина, которые могут быть проацилированы при pH 7–9 и 0°, можно выделить 59 ε-аминогрупп

Изоэлектрические точки N-метакрилоильных производных альбумина

Исходное соотношение ХМАК : альбумин, моль/моль	Фракция, №	pI±0,03	Исходное соотношение ХМАК : альбумин, моль/моль	Фракция, №	pI±0,03
0 4:1	15–17 16–18	4,91 4,85	7:1 150:1	17–19 20–22	4,81 4,68

остатков лизина и одну концевую α-аминогруппу остатка аспарагина [4]. Ранее было показано [3], что среди имеющихся в молекуле сывороточного альбумина групп оказываются доступными для титрования $18,5 \pm 0,5$, причем ацилируются именно аминогруппы. Отсюда можно сделать вывод о том, что в сывороточном альбумине, ацилированном при больших соотношениях ацилирующий агент : белок, содержится максимум около 19 доступных для реакции двойных связей. Судя по нашим данным, при этом изоэлектрическая точка сывороточного альбумина может изменяться приблизительно на 0,2.

Принимая во внимание различие в рК аминогрупп концевого остатка аспарагина и ε-аминогрупп остатков лизина, можно ожидать, что аминогруппа остатка аспарагина будет отличаться по активности в ацилировании и может прореагировать в первую очередь. Действительно, анализ концевой аминогруппы методом Эдмана [5] (отщепление концевой аминокислоты фенилизотиоцианатом) показал, что в образцах, синтезирован-

ных при малых соотношениях ацилирующий агент : белок (4:1, 7:1), аминогруппа аспарагина отсутствует, тогда как в исходном альбумине она определяется легко. Таким образом, концевая группа аспарагина ацилируется в первую очередь, а затем при увеличении соотношения хлорангидридов : белок последовательно ацилируются остальные доступные аминогруппы лизина. Это согласуется с постепенным изменением изоэлектрических точек белков, получаемых в интервале соотношений ХМАК : альбумин более 4:1 и менее 150:1.

Все синтезированные ацилированием ненасыщенные производные сывороточного альбумина легко вступают в сополимеризацию с акриламидом и образуют сополимеры при любом исходном соотношении ацилирующий агент : белок. Как следует из данной работы, по-видимому, числомест связывания белка в трехмерной сетке геля растет при увеличении исходного соотношения ацилирующий агент : белок.

В работе использовали сывороточный альбумин человека фирмы «Reanal» (Венгрия) и «Koch – Light» (ФРГ).

Ацилирование белков хлорангидридами непредельных кислот проводили в водном бикарбонатном буфере при pH 8 (концентрация белка 50 мг/мл, мольные соотношения ацилирующий агент : белок от 4:1 до 200:1) согласно методике [1].

По окончании ацилирования реакционную смесь для очистки от солей пропускали через колонку, наполненную сефадексом G-25, выделяя фракцию, содержащую белок, которую подвергали лиофилизации.

За эффективностью реакции следили по изменению изоэлектрических точек ацилированного белка методом электрофокусирования в акриламидном геле с амфолинами (pH 3,5–9,5), а также используя препаративное электрофокусирование с амфолинами на установке для электрофореза «Multiphor» фирмы LKB (Швеция). Концентрация амфолинов (pH 4–6) составляла 3%, навеска белка 100 мг, градиент плотности поддерживали сахарозой. Начальное напряжение 450 В, начальный ток 10 мА, конечное напряжение 450 В, конечный ток 1,5 мА, время препаративного электрофокусирования 21 ч, pH фракций по 3 мл определяли на pH-метре «Orion-701» (США).

Концевую аминогруппу альбумина определяли методом Эдмана [5], анализируя тонкослойные хроматограммы фенилтиогидантоновых производных аминокислот. Для получения последних использовали реакцию фенилизотиоцианата с N-концевой аминокислотой белка с последующим отщеплением фенилтиогидантонового производного.

ЛИТЕРАТУРА

- Платэ Н. А., Валуев Л. И., Егоров Н. С., Аль-Нури М. А. Прикл. биохим. и микробиол., 1977, т. 13, № 5, с. 673.
- Plate N. A., Valuev L. I. J. Polymer Sci. Polymer Symp., 1979, № 66, p. 149.
- Платэ Н. А., Вакула А. В., Валуев Л. И., Лыс Я. И., Федосеев В. М. Прикл. биохим. и микробиол., 1982, т. 18, № 1, с. 81.
- Meloun B., Moravek L., Kostka W. FEBS Letters, 1975, v. 58, № 1, p. 134.
- Девени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1976, с. 281.

Институт нефтехимического синтеза
им. А. В. Топчиева АН СССР

Поступила в редакцию
29.V.1981

ACYLATION OF SERUM ALBUMINE BY UNSATURATED CHLORIDES

Plate N. A., Postnikov V. A., Lukin N. Yu.,
Eismont M. Yu., Grudkova G.

Summary

Isoelectrical points of serum albumine acylated by acrylic and methacrylic chlorides have been determined by electrofocusing in acrylamide gel and preparative electrofocusing. The change of isoelectrical point from 4.91 to 4.68 (± 0.03) with introducing of maximal number of double bonds was found. The acylation of the end aminogroup of protein – asparagine – for the first turn was shown.