

УДК 541.84:547.96

**О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ
С КАРБОКСИЛЬНЫМИ МАКРОСЕТЧАТЫМИ СМОЛАМИ**

*Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р.,
Самсонов Г. В.*

Исследовано связывание белков сывороточного альбумина, гемоглобина и химотрипсиногена с карбоксильными макросетчатыми катионитами, синтезированными на основе метакриловой кислоты и этилендиметакриламида. Показано, что изменение степени ионизации катионита в диапазоне $\alpha=0,15-0,4$, сопровождающееся разрушением вторичной структуры цепей ПМАК между химическими узлами в сетке, приводит к возрастанию емкости сорбции белков, которое достигает своего максимального значения при $\alpha=0,35$. Изучена сорбция белков на карбоксильных катионитах при двух степенях ионизации $\alpha=0$ и $0,4$, при которых полимерные цепи сетчатой структуры находятся в разных конформационных состояниях. Изотермы сорбции исследуемых белков на катионите в неионизированной форме, когда цепи ПМАК плотно упакованы во вторичную структуру, имеют кооперативный характер; в случае сорбции белков на катионите при $\alpha=0,4$ наблюдается обычная изотерма типа изотермы Ленгмюра.

Исследование особенностей взаимодействия белков с сетчатыми полиэлектролитами имеет большой научный и практический интерес, связанный с вопросами очистки белков и с их иммобилизацией [1].

Данная работа посвящена исследованию взаимодействия ряда белков с карбоксильными макросетчатыми катионитами, синтезированными на основе акриловой или метакриловой кислот и этилендиметакриламида (ЭДМА) в качестве спивающего агента. В слабосшитых карбоксильных полиэлектролитах, как было показано ранее [2-4], фрагменты цепей полиметакриловой кислоты (ПМАК) в ходе ионизации претерпевают конформационный переход, обусловленный разрушением вторичной структуры. Эти изменения проходят в том же диапазоне степеней ионизации α , что и для линейной ПМАК ($0,15-0,35$). При этом влияние сетчатой структуры выражается в заторможенности подвижности полимерных цепей по сравнению с линейным аналогом [5]. В макросетчатых полиэлектролитах на основе акриловой кислоты при низких степенях ионизации (до $\alpha=0,2$) происходит разрушение меж- и внутримолекулярных контактов, обусловленных водородными связями, что также способствует увеличению подвижности полимерных цепей [5]. Эти особенности ионизации карбоксильных макросетчатых полиэлектролитов проявляются в резком изменении набухания, предельное значение которого достигается при степени ионизации $\alpha \sim 0,4$, когда уже полностью разрушена вторичная структура ПМАК в сетке (рис. 1).

Для сравнения и характеристики электрохимических свойств карбоксильных катионитов¹ используются значения $pK_{\alpha=0,5}$, которые для исследуемых нами катионитов приведены в табл. 1. Как и следовало ожидать, на значения $pK_{\alpha=0,5}$ оказывают влияние природа мономерного звена, количество спивающего агента, степень дисперсности.

Исследование сорбции белков на карбоксильных катионитах типа Биокарб обнаружило влияние степени ионизации катионита на связывание белков [6].

¹ Авторы благодарят К. П. Папкузову и К. М. Рожецкую за предоставление образцов карбоксильных макросетчатых катионитов.

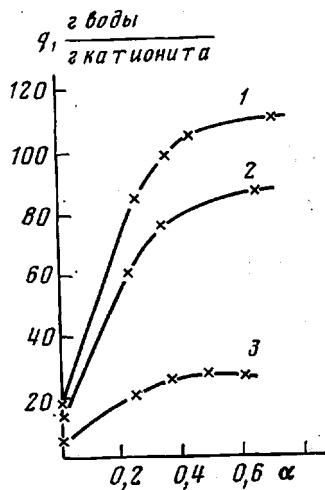


Рис. 1

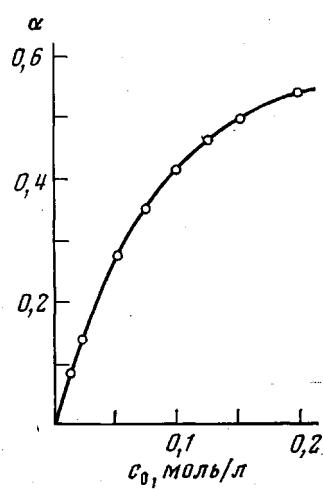


Рис. 2

Рис. 1. Набухание q макросетчатых кационитов типа КМДМ-2 при изменении степени ионизации: 1 - 0,5, 2 - 1 и 3 - 2,5% ЭДМА

Рис. 2. Соотношение между исходной концентрацией фосфатного буферного раствора (pН 7,1) и степенью нейтрализации кационита КМДМ-2 (2,5% ЭДМА)

В представляемой работе нами сделана попытка проследить за влиянием на сорбцию белков, во-первых, конформационного перехода полиелектролитных цепей (т. е. разрушения вторичной структуры ПМАК) и, во-вторых, определенного конформационного состояния полимерных цепей в сетчатой структуре ($\alpha=0$ и $0,4$).

Использовали бычий сывороточный альбумин ($M=69\,000$, рI 4,7), гемоглобин человека ($M=65\,000$, рI 6,8), химотрипсиноген ($M=25\,000$, рI 9,4). Белки предварительно очищали гель-хроматографией и отдиализовывали против воды. Исследования проводили в диапазоне степеней ионизации кационитов 0–0,4. Чтобы избежать конформационных изменений в белках и минимально влиять на их электрохимические свойства при взаимодействии с карбоксильными кационитами, различную степень нейтрализации сетчатого полиелектролита создавали обработкой его растворами фосфатного буфера разной концентрации. При таком способе проведения эксперимента неизначительно меняется pH равновесного раствора и предотвращается гидролиз солевой формы кационита. Условия эксперимента были во всех случаях одинаковыми. К 20 мг кационита (H^+ -форма, зернение 0,08–0,125 мм) приливали 1,5 мл фосфатного буфера с pH 7,1 (концентрация от 0 до 0,2 моль/л) и затем добавляли 3 мл 1%-ного раствора белка (pH 6,0–6,2), предварительно отдиализированного против воды. Сорбцию проводили при постоянном перемешивании в течение 18 ч. В контроле вместо белка добавляли 3 мл воды.

На рис. 2 представлены результаты контрольного эксперимента по влиянию концентрации фосфатного буферного раствора на степень нейтрализации кационита КМДМ-2 (2,5% ЭДМА).

Таблица 1
Состав и электрохимические характеристики ряда карбоксильных макросетчатых кационитов

Кационит	Основное звено	[ЭДМА], %	pK _{α=0,5}
КАДМ-2	Акриловая кислота	2,5	6,5
КМДМ-2	Метакриловая кислота	0,5	6,8
КМДМ-2	»	1,0	6,8
КМДМ-2	»	2,5	7,1
КМДМ-2	»	4,0	7,1
КМДМ-2 (сuspensionia с размером частиц ~10 мкм)	»	2,5	6,6

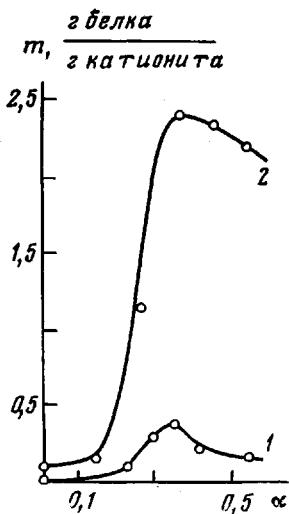


Рис. 3

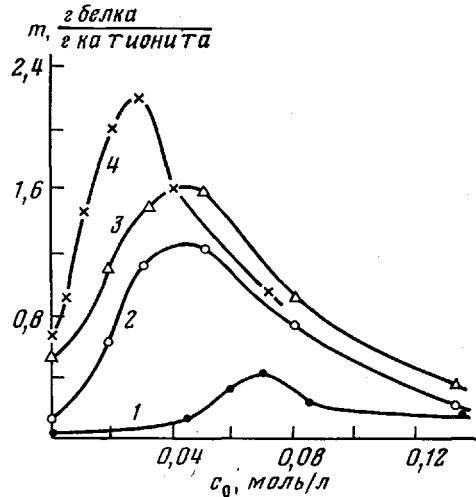


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость емкости сорбции m белков сывороточного альбумина (1) и химотрипсиногена (2) от степени нейтрализации катионита КМДМ-2

Рис. 4. Сорбция m сывороточного альбумина на катионитах типа КМДМ-2 разной степени спшивания и зернения: 1 – 2,5% ЭДМА, $pK_{\alpha=0,5}=7,1$; 2 – 1% ЭДМА, $pK_{\alpha=0,5}=6,8$; 3 – 0,5% ЭДМА, $pK_{\alpha=0,5}=6,8$; 4 – 2,5% ЭДМА, сuspension (размер частиц ~ 10 мкм), $pK_{\alpha=0,5}=6,6$

трализации сетчатого полизелектролита (определенную титрованием). При такой постановке эксперимента (полная обменная емкость карбоксильного катионита КМДМ-2 составляет 10 мг-экв Na/g) степень нейтрализации макросетчатого катионита варьировали от 0 до 0,5, что охватывает область конформационного перехода цепей ПМАК в КМДМ-2.

Исследование сорбции сывороточного альбумина и химотрипсиногена на КМДМ-2 в зависимости от степени его нейтрализации показало, что процесс описывается кривой с максимумом (рис. 3). Максимум емкости сорбции для обоих белков (независимо от величины их изоэлектрической точки) соответствует 35%-ной нейтрализации карбоксильных групп катионита ($\alpha=0,35$). Как было отмечено ранее, в области изменения степеней ионизации 0,15–0,35 происходит разрушение вторичной структуры цепей ПМАК в сетчатом катионите вплоть до полного растяжения матрицы, что приводит к увеличению проницаемости сетки и к доступности для белка новых функционально активных центров макросетчатого катионита. Емкость сорбции белков возрастает симбатно увеличению подвижности полимерных цепей между химическими узлами в сетчатой структуре в ходе конформационных превращений (рис. 3). Различия в изоэлектрических точках белков, в размерах их макромолекул, а также во вкладах в полифункциональное взаимодействие с матрицей макросетчатого катионита не оказывают влияния на положение максимума сорбции, а обусловливают различную величину максимальной сорбционной емкости. Вариация в значениях $pK_{\alpha=0,5}$ карбоксильных катионитов проявляется в смещении максимума сорбции белков. Это продемонстрировано на примере связывания альбумина с катионитами типа КМДМ-2, имеющими разную степень спшивания и зернения (рис. 4). Емкость сорбции возрастает при уменьшении количества спивающего агента или при его измельчении. Из рис. 4 видно, что максимум сорбции белков смещается в зависимости от величины $pK_{\alpha=0,5}$ катионита, так как исходная водородная форма катионитов имеет разную степень ионизации. Если отложить значения концентраций буферного раствора, соответствующие максимуму сорбции белка, для каждой исследуемой системы белок – катионит КМДМ-2 от величины $pK_{\alpha=0,5}$ сетчатого полизелектролита, то полученная прямая (рис. 5) однозначно покажет, что величина максимального связывания разных белков достига-

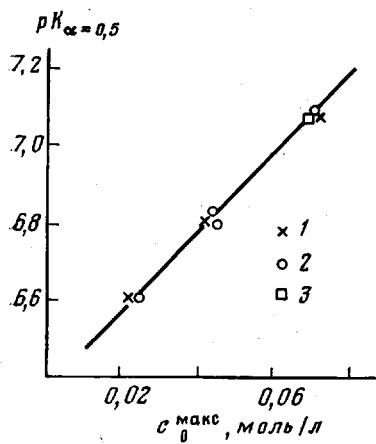


Рис. 5

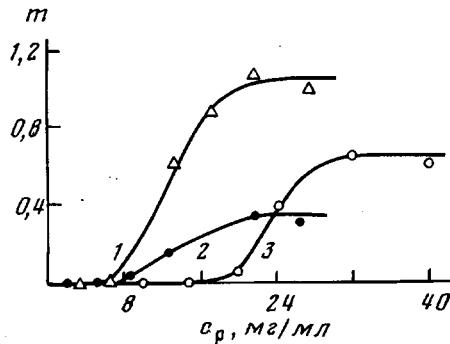


Рис. 6

Рис. 5. Соотношение между концентрацией буферного раствора, при которой емкость сорбции белка максимальна, и величиной $pH_{\alpha=0,5}$ катионитов типа КМДМ-2: 1 – гемоглобин, 2 – альбумин, 3 – химотрипсиноген

Рис. 6. Изотермы сорбции белков на неионизированной форме КМДМ-2 ($\alpha=0$): 1 – химотрипсиноген, 2 – альбумин, 3 – гемоглобин. c_p – равновесная концентрация белка

ется при одной определенной степени нейтрализации макросетчатых катионитов ($\alpha=0,35-0,40$).

Конформационное состояние полимерных цепей макросетчатых катионитов должно влиять на сорбционное поведение белков. С целью изучения этого влияния были исследованы изотермы сорбции белков на катионите КМДМ-2 (2,5% ЭДМА) в неионизированной форме ($\alpha=0$, цепи ПМАК плотно упакованы во вторичную структуру) и в ионизированной форме ($\alpha=0,4$, конформационный переход полностью закончился, и полиэлектролитные цепи сетки находятся в максимально растянутом состоянии из-за электростатического отталкивания).

На рис. 6 приведены изотермы сорбции белков на катионите КМДМ-2 ($\alpha=0$). Во всех случаях наблюдается кооперативный характер связывания: отсутствие сорбции при низких концентрациях белка и резкое увеличение емкости с возрастанием концентрации белка. При этом, чем выше величина изоэлектрической точки белка, тем больше его максимальная емкость сорбции. На кооперативный характер изотермы связывания пепсина с Биокарбом при $pH \sim 2,5$ указывалось ранее [7].

Кооперативные процессы можно описать эмпирическим уравнением Хилла [8]

$$y/(1-y) = k(c_0)^n,$$

где y – степень заполнения катионита белком, т. е. $y=m/m_{max}$ (от 0 до 1), c – исходная концентрация белка, k – коэффициент пропорциональности, n – показатель степени, характеризующий меру кооперативности процесса и определяемый графически по наклону прямой зависимости $\lg(y/1-y)$ от $\lg c_0$ в интервале степеней заполнения катионита 0,2–0,8. Для изотермы типа Ленгмюра $n \sim 1$, для кооперативных процессов $n > 1$, т. е. связывание с катионитом последующей молекулой белка предпочтительнее в присутствии уже сорбированной молекулы. Возможно, в случае сорбционного процесса на карбоксильных катионитах при $\alpha=0$ это обусловлено частичным разрыхлением структуры сетки первыми сорбированными макромолекулами белка за счет их полифункционального взаимодействия с матрицей. Основной характеристикой кооперативного процесса помимо вели-

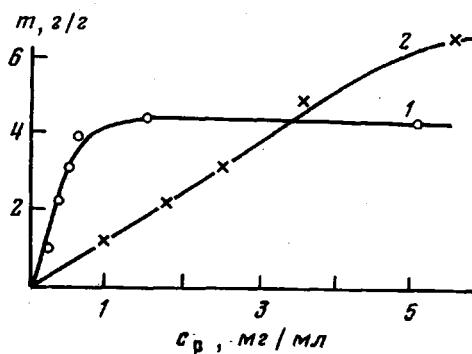


Рис. 7. Изотермы сорбции белков на катионите КМДМ-2 при $\alpha=0,4$: 1 – гемоглобин, 2 – химотрипсиноген

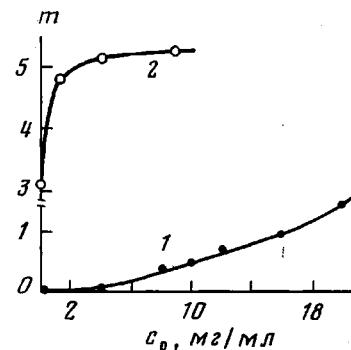


Рис. 8. Изотермы сорбции гемоглобина на катионите КМДМ-2 при $\alpha=0$ (1) и $0,3$ (2)

чины n является значение исходной концентрации белка c_{50} , при котором заполнение ионита происходит наполовину.

В табл. 2 представлены результаты исследования ряда кооперативных систем. Ионизация матрицы катионита, сопровождаемая разрушением вторичной структуры цепей ПМАК в сетке, приводит к обычным изотермам типа изотермы Ленгмюра (рис. 7).

Аналогичный характер изотерм наблюдается и для катионита на основе акриловой кислоты КАДМ-2. При $\alpha=0$ сорбция белка на неионизованной форме катионита способствует получению кооперативной изотермы, а разрушение водородных связей фрагментов поликариловой кислоты в сетчатой структуре ($\alpha \sim 0,3$) – изотермы типа изотермы Ленгмюра. На рис. 8 представлены изотермы сорбции гемоглобина на катионите КАДМ-2 при разных степенях ионизации.

Таблица 2
Основные характеристики кооперативных систем

Система	$m_{\text{макс}},$ г белка г катионита	$c_{50} \cdot 10^6,$ моль/л	n	pI белка
КМДМ-2 – альбумин	0,35	0,19	4,5	4,7
КМДМ-2 – гемоглобин	0,65	0,39	10,0	6,8
КМДМ-2 – химотрипсиноген	1,10	0,57	3,5	9,4

Таким образом, приведенные результаты показывают определяющую роль конформационного состояния сетчатого полизэлектролита (обусловленного ионизацией) в связывании белков. Наблюданное в случае кооперативных изотерм отсутствие связывания белка на начальных участках обусловлено, по всей вероятности, практическим отсутствием центров связывания даже на поверхности зерна ($\alpha=0$) и недоступностью объема зерна для макромолекул белка вследствие структурирования полимерных цепей сетчатых полизэлектролитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Samsonov G. V., Ponomareva R. B., Melenevsky A. T. Pure and Appl. Chem., 1979, v. 51, № 1-2, p. 1409.
2. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Гудкин Л. Р., Ануфриева Е. В., Паутов В. Д., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1977, т. 19, № 1, с. 107.
3. Ануфриева Е. В., Кузнецова Н. П., Краковская М. Г., Мишаева Р. Н., Паутов В. Д., Семисотнов Г. В., Шевелева Т. В. Высокомолек. соед. А, 1977, т. 19, № 1, с. 102.
4. Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н., Кузнецова Н. Н., Муравьева Т. Д., Папукова К. П., Рожецкая К. М., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. А, 1978, т. 20, № 3, с. 629.
5. Ануфриева Е. В., Паутов В. Д., Кузнецова Н. П., Мишаева Р. Н. Высокомолек. соед. Б, 1981, т. 23, № 7, с. 557.
6. Шагаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э. В кн.: Карбоксильные катиониты в биологии / Под ред. Самсонова Г. В. Л.: Наука, 1979, с. 93, 213.
7. Шагаева Л. К., Писарев О. А., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1980, т. 22, № 7, с. 502.
8. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A. Advances Protein Chem., 1964, v. 19, p. 163.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
15.VI.1982

SOME FEATURES OF BINDING OF PROTEINS WITH CARBOXYLIC MACRONETWORK RESINS

Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Гудкин Л.Р., Самсонов Г.В.

Summary

Binding of proteins: serum albumin, haemoglobin and chymotrypsinogen with carboxylic macronetwork cationites synthesized from methacrylic acid and ethylene-dimethacrylamide has been studied. The change of the degree of ionization of cationite in the $\alpha=0.15-0.4$ range accompanied by the fracture of secondary structure of chains of polymethacrylic acid between chemical crosslinks in the network is shown to result in increase of sorptional capacity of proteins attaining its maximal value at $\alpha=0.35$. The sorption of proteins on carboxylic cationites has been studied for two degrees of ionization $\alpha=0$ and 0.4, when polymer chains of network structure are in different conformational states. For $\alpha=0$, when chains of polymethacrylic acid are tightly packed into secondary structure, the isotherms of sorption have the cooperative character, while for $\alpha=0.4$ the usual Langmuir sorption isotherm is observed.