

УДК 541(49+64+183.12)

**ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ ИОНОГЕННЫХ ГРУПП
СЕТЧАТОГО ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТА НА ПРОЧНОСТЬ
БЕЛКОВО-ПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА**

Шатаева Л. К., Радзявилюс К. И., Самсонов Г. В.

Изучена селективность и обратимость сорбции пепсина и α -химотрипсиногена А на пористых катионитах с сульфо-, фосфо- и карбоксильными группами. Показано, что оптимальные условия связывания белка с сетчатым полиэлектролитом зависят от изоэлектрической точки белка и от кислотности функциональных групп полиэлектролита. При повышении кислотности функциональных групп увеличивается диапазон значений рН раствора, в котором данный белково-полимерный комплекс устойчив.

Как известно, существуют два типа комплексов полиэлектролитов с белковыми макромолекулами: на основе растворимых (линейных) [1–3] и на основе нерастворимых (сетчатых) полиэлектролитов [4, 5]. На примере изучения нестехиометрических полимерных комплексов было показано, что устойчивость поликомплексов в солевых растворах зависит от химических реакций перераспределения или разрыва солевых связей между полимерными партнерами по комплексу [6]. Связывание белковых макромолекул с пористыми катионитами происходит за счет взаимодействия аминогрупп белка с ионогенными группами сорбента и осуществляется главным образом на поверхности плотносшитых участков, т. е. на внутренней поверхности пор сорбента [7, 8]. Десорбция белка с катионита (диссоциация комплекса) происходит при увеличении рН внешнего раствора, в ходе которого возрастает число отрицательных зарядов за счет диссоциации кислотных групп как на сетчатом полиэлектролите, так и на макромолекуле белка.

Данная работа посвящена изучению взаимодействия белковых макромолекул с сетчатыми полиэлектролитами, содержащими различные по силе кислотные функциональные группы.

В работе использовали стандартные пористые катиониты с сульфогруппами (КУ-23) [7], с фосфоновыми группами (СФ-5), с карбоксильными группами звеньев акриловой кислоты (КМ-2п) [8], с карбоксильными группами метакриловой кислоты (Амберлит ХЕ-64) и белковые препараты: кристаллический пепсин фирмы «Мерк» и кристаллический α -химотрипсиноген А фирмы «Сигма». Использованные катиониты в исходном состоянии имели гранулярную форму. Поскольку известно, что гранулы пористых ионитов могут иметь на поверхности уплотненный слой сополимера, понижающий проницаемость сорбента для макромолекул белков, все образцы были механически разрушены, рассевом выделена фракция 100–500 мкм. Затем катиониты дважды проводили через цикл кислотно-щелочной регенерации и использовали в водородной форме для потенциометрического титрования и сорбции белков.

Потенциометрическое титрование проводили в статических условиях при концентрации хлористого натрия 0,1 н. по методу [9]. Сорбцию белков при различных значениях рН буферного раствора осуществляли в статических условиях при ионной силе 0,1 н. и начальной концентрации белка 1 мг/мл по методу [8].

Обратимость связывания белка с полиэлектролитом изучали в динамических условиях в колонках 1×4 см, проводя сорбцию при оптимальном значении рН раствора до насыщения колонки. Затем колонку промывали 0,1 м. буферным раствором при том же значении рН (сорбции) для удаления белка, сорбированного по механизму молекулярной (неионообменной) сорбции. После этого на колонку подавали элюирующий буфер с повышенным значением рН, при котором сорбции белка в статических условиях не наблюдалось. Концентрацию белка во всех растворах определяли по методу Бредфорда [10], активность пепсина рассчитывали по гидролизу казеина [8].

Рис. 1. Потенциометрическое титрование катионитов КУ-23 (1), СФ-5 (2), КМ-2п (3) и Амберлит ХЕ-64 (4) при ионной силе 0,1 н.

Рис. 2. Зависимости селективности сорбции пепсина (а) и химотрипсиногена (б) на катионитах КУ-23 (1), СФ-5 (2), КМ-2п (3) и Амберлите ХЕ-64 (4), а также зависимости количества положительных, отрицательных и суммарных электростатических зарядов на макромолекулах пепсина (в) и химотрипсиногена (г) от pH равновесного раствора

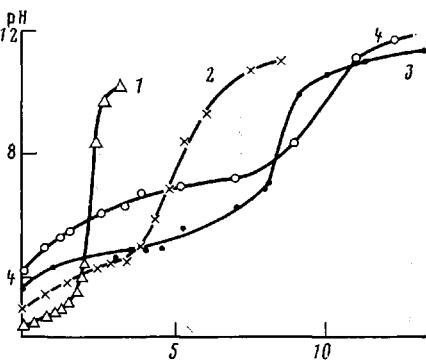


Рис. 1

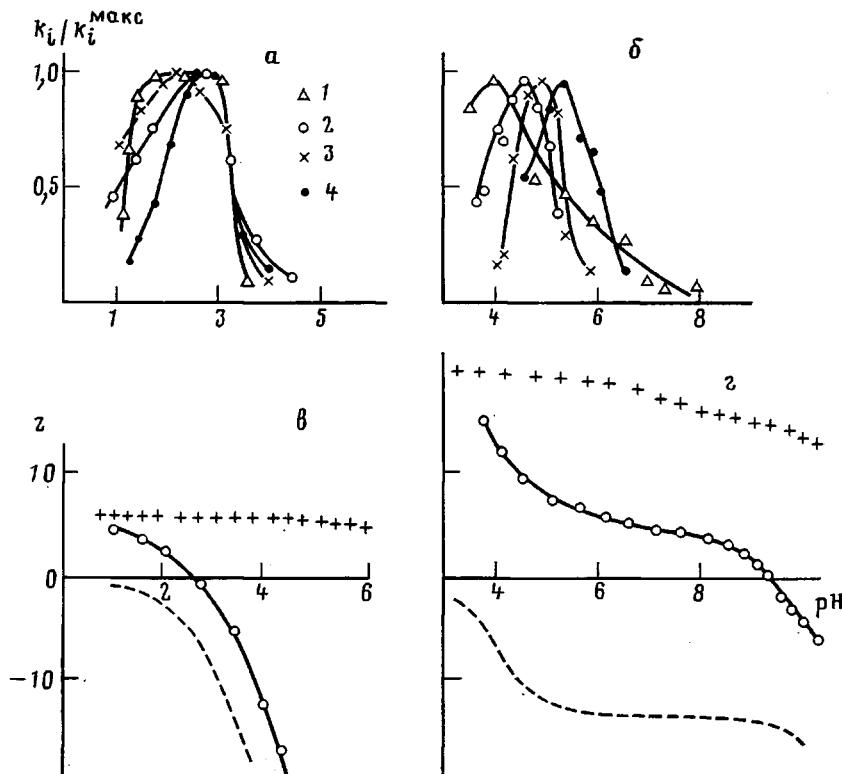


Рис. 2

На рис. 1 представлено потенциометрическое титрование изученных катионитов, а в таблице – их основные физико-химические характеристики, параметры ионизации функциональных групп $pK_{\text{ап}}$ и n в координатах Гендерсона – Гассельбаха [8] и сорбционные емкости по отношению к пепсину и химотрипсиногену при оптимальном значении pH и равновесных концентрациях белка в растворе 0,3–0,5 мг/мл. Более высокую концентрацию белков в равновесных растворах не использовали, так как самоассоциация белковых макромолекул в растворе приводит к аномальным всплескам емкости на изотермах сорбции и в каждой системе требует дополнительных исследований [11, 12]. Селективность связывания белков с катионитами определяли по начальному наклону изотермы сорбции как коэффициент распределения k_i белка между фазой набухшего катионита и равновесным раствором при данном значении pH.

На рис. 2, а, б представлены pH-зависимости сорбции пепсина и химотрипсиногена на сорбентах с разной кислотностью ионогенных групп. По оси ординат отложено отношение селективности при данном значении pH

Физико-химические и сорбционные характеристики пористых катионитов

Катионит	Удельный объем набухшего катионита, мл/г	Обменная емкость, мг-экв/г	рK _{хар}	n	Емкость сорбции белков *, мг/г	
					пепсин	химотрипсинген
Амберлит ХЕ-64	2,9	9,0	6,9	1,9	210	230
КМ-2п	4,2	7,9	5,2	1,4	277	440
СФ-5	3,2	5,0	4,2	1,2	180	152
КУ-23	4,2	2,2	2,8	1,0	230	140

* При равновесной концентрации пепсина 0,5 и химотрипсингена — 0,25 мг/мл.

к максимальной селективности k_i^{\max} на данном сорбенте при оптимальном значении pH. Экстремальный характер этих зависимостей показывает, что в процессе связывания белка с полиэлектролитом существенную роль играет изменение знака заряда макромолекулы белка. По данным об аминокислотном составе пепсина и химотрипсингена [13, 14] и по усредненным значениям рK_a для ионизации боковых групп аминокислотных остатков [15] были рассчитаны общий положительный z_+ , общий отрицательный z_- и суммарный электростатический заряд этих белков при разных pH раствора. На рис. 2, в, г представлены эти зависимости для сопоставления с pH-зависимостью селективного связывания их с катионитами.

Очевидно, что уменьшение селективности связывания пепсина и химотрипсингена со всеми катионитами (правые ветви графиков) происходит пропорционально увеличению отрицательного заряда на макромолекулах этих белков и наблюдается для пепсина при значениях pH ≥ pI, тогда как для химотрипсингена при pH < pI. Химотрипсинген в области оптимальных значений pH связывания с катионитами имеет избыточный положительный заряд, и при усилении кислотности ионогенных групп полиэлектролита оптимум pH его связывания смещается в кислую область. В то же время пепсин в области значений pH селективного взаимодействия с катионитами, как показывает расчет, имеет мало положительно заряженных аминогрупп и его макромолекула находится вблизи изоэлектрической точки. В этих условиях селективность связывания пепсина не зависит от кислотности ионогенных групп катионита.

Можно предположить, что взаимодействие протон-акцепторных групп белка с кислотными группами катионитов происходит по двум разным механизмам в разных областях pH внешнего раствора в зависимости от равновесной степени ионизации функциональных групп полиэлектролита: во-первых, за счет установления водородных связей между неионизированными (слабыми) аминогруппами белка с недиссоциированными (протонированными) кислотными группами катионита; во-вторых, за счет электростатического притяжения заряженных положительно аминогрупп белка с ионизированными группами полиэлектролита аналогично взаимодействию поликатион — полianiон в растворимых полиэлектролитных комплексах. Сорбция пепсина происходит, по-видимому, по первому механизму, а сорбция химотрипсингена — по второму. Существование двух механизмов взаимодействия белка с полиэлектролитом соответствует представлению о двух типах химических равновесий в реакциях между полиэлектролитами: обратимой реакции типа солевой связи между звеньями двух компонентов и обратимой ассоциации между макромолекулами [16]. Последний тип равновесия смещается в сторону образования комплекса при понижении pH раствора.

Существенная разница этих механизмов связывания цвиттер-ионов со сшитыми полиэлектролитными сетками проявляется в прочности связи по отношению к повышению внешнего значения pH раствора. Если связь определяется только взаимодействием неионизированных протон-донорных и протон-акцепторных групп белка и полиэлектролита (катионит входит в связь со своим протоном), то достаточно увеличить степень диссоциации ионогенных групп полимера, чтобы взаимное отталкивание отрицательных

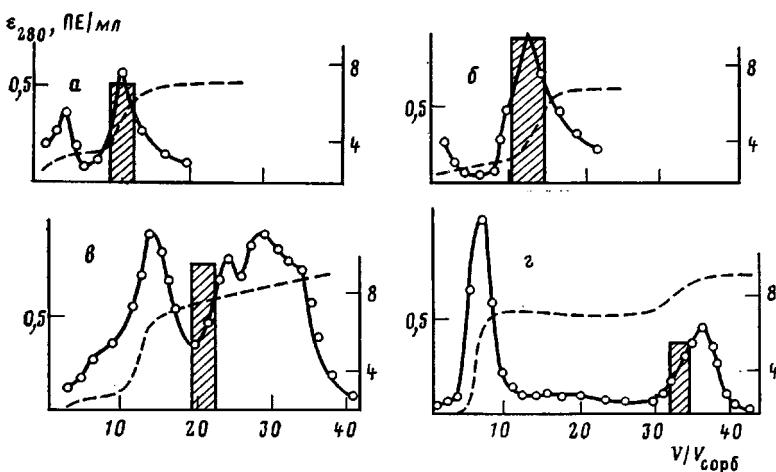


Рис. 3. Десорбция пепсина в динамических условиях с катионитов Амберлит ХЕ-64 (а), КМ-2п (б), СФ-5 (в) и КУ-23 (г) при изменении pH элюирующего раствора. Заштрихованные области соответствуют фракциям, проявляющим ферментную активность по отношению к казеину, выраженную в протеолитических единицах (ПЕ/мл) [8]; V – объем раствора, $V_{\text{сорб}}$ – объем сорбента в колонке; штриховая линия – величина pH раствора на выходе из колонки

зарядов белка и катионита привело к десорбции белка в раствор. Если же связь определяется ион-ионными взаимодействиями компонентов (ион-парное связывание), то диссоциация белково-полимерного комплекса наступает не раньше, чем произойдет деионизация аминогрупп белка, т. е. для связей с остатками лизина и аргинина при pH 9,5 и 12 соответственно.

Обратимость связывания пепсина и химотрипсиногена исследовали в динамических условиях. На рис. 3 представлены выходные кривые десорбции пепсина с карбоксильного, фосфорникислого и сульфокатионита. Заштрихованные участки соответствуют активности фермента. Видно, что чем больше кислотность групп катионита, тем при более высоком значении pH происходит диссоциация белково-полимерного комплекса и десорбция пепсина в раствор. Иными словами, чем больше степень ионизации полимера в условиях формирования комплекса, тем в более широком диапазоне pH этот комплекс устойчив. Для такого фермента, как пепсин, область десорбции с сульфокатионита находится за пределом pH-стабильности этого белка, и полученный таким образом пепсин сохраняет только незначительную часть своей ферментной активности.

Для десорбции химотрипсиногена с катионита любой кислотности в динамических условиях необходимо использовать буферные растворы с pH выше 8,0, т. е. обеспечить деионизацию по крайней мере гистидиновых и лизиновых остатков, имеющихся в структуре этого цвиттер-иона.

Сравнивая pH-зависимости сорбции и десорбции этих белков (рис. 2 и 3), можно обнаружить значительный гистерезис процессов. Пепсин, в частности, не сорбируется на сульфокатионите при pH > 5,0, но не десорбируется с него до тех пор, пока pH раствора не достигнет 8,5. По-видимому, это связано с высокими значениями констант связывания изучаемых нерастворимых комплексов и с низкими константами скорости диссоциации этих комплексов.

Таким образом, зная заряд белковой макромолекулы, можно варьировать pH-диапазон устойчивости белково-полимерного комплекса за счет варьирования кислотности ионогенных групп полизлектролита. Использование карбоксильных катионитов приводит к установлению наиболее слабых межмолекулярных взаимодействий с макромолекулами белков, которые можно регулировать только за счет степени ионизации функциональных групп катионита путем небольшого изменения pH внешнего раствора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гликина М. В., Кузнецова Н. П., Болотина И. Н., Самсонов Г. В. Молек. биол., 1970, т. 4, № 5, с. 692.
2. Кабанов В. А., Евдаков В. П., Мустафаев М. И., Антипина А. Д. Молек. биол., 1977, т. 11, № 3, с. 582.
3. Кабанов В. А., Мустафаев М. И., Белова В. В., Евдаков В. П. Молек. биол., 1978, т. 12, № 6, с. 1264.
4. Тимковская А. Ф., Миргородская О. А., Селезнева А. А., Москвичев Б. В., Самсонов Г. В. Прикл. биохимия и микробиология, 1976, т. 12, № 6, с. 886.
5. Орлиевская О. В., Костарева И. А., Пономарева Р. Б., Папукова К. П., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1982, т. 24, № 1, с. 63.
6. Кабанов В. А., Зезин А. Б., Рогачева В. В., Изумрудов В. А., Рыжиков С. В. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 6, с. 1419.
7. Островский Д. И., Дмитренко Л. В., Самсонов Г. В., Лебедев Г. А. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1976, № 3, с. 547.
8. Радзявишюс К. И., Шатаева Л. К., Самсонов Г. В., Жукова Н. Г., Зорина А. И., Ласкорин Б. Н. Высокомолек. соед. А, 1982, т. 24, № 5, с. 1066.
9. Шатаева Л. К., Чернова Н. А., Вацк И., Самсонов Г. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1977, № 2, с. 353.
10. Bradford M. M. Analyt. Biochem., 1976, v. 72, № 1-2, p. 248.
11. Селезнева А. А., Дубинина Н. И., Бабенко Г. А., Лукницкая О. Ф., Самсонов Г. В. Коллоид. журн., 1975, т. 37, № 6, с. 1138.
12. Шатаева Л. К., Писарев О. А., Самсонов Г. В. Высокомолек. соед. Б, 1980, т. 22, № 7, с. 502.
13. Bovey F. A., Yanasi S. Sam. In: The enzymes/Ed. by Boyer P. D., Lardy H., Myrbach K. N. Y.-L.: Acad. Press, 1961, v. 4, p. 63.
14. Nilcox P. E. In: Methods in enzymology. N. Y.-L.- San Francisco: Acad. Press, 1970, v. 19, p. 64.
15. Fredericq E. Acad. Press. J. Polymer. Sci., 1954, v. 12, № 1, p. 287.
16. Харенка А. В., Каюжная Р. И., Зезин А. Б., Кабанов В. А. Высокомолек. соед. А, 1981, т. 23, № 12, с. 2657.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
29.VI.1983

INFLUENCE OF ACIDITY OF IONOGENIC GROUPS OF NETWORK POLYELECTROLYTE ON THE STRENGTN OF PROTEIN-POLYMER COMPLEX

Shataeva L. K., Radzyavichyus K. I., Samsonov G. V.

Summary

The selectivity and reversibility of sorption of pepsine and α -chimotrypsinogen A on porous cationites having sulfo-, phospho- and carboxyl groups has been studied. The optimal conditions of binding of protein with network polyelectrolyte are shown to depend on the isoelectrical point of a protein and on acidity of functional groups of polyelectrolyte. The increase of acidity of functional groups is accompanied by increasing of the range of pH values where this protein-polymer complex is stable.