

допущение в принципе объяснимо, поскольку значения электродных потенциалов золота и платины в рассматриваемых системах не определены экспериментально. Приведенные в таблице значения ΔU представляют собой разность электрохимических потенциалов между электродом и находящимся с ним в контакте водным электролитом; они могут лишь качественно характеризовать соотношение истинных электродных потенциалов в системе Mt1 – Π – Mt2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронежцев Ю. И., Гольдаде В. А., Пинчук Л. С. // Изв. АН БССР. Сер. физ.-техн. наук. 1985. № 3. С. 48.
2. Гольдаде В. А., Пинчук Л. С. Электретные пластмассы: физика и материаловедение. Минск, 1987. 231 с.
3. Воронежцев Ю. И., Гольдаде В. А., Пинчук Л. С. // Докл. АН БССР. 1984. Т. 28. № 6. С. 534.
4. Ieda M., Sawa G., Nakamura S., Nishio Y. // J. Appl. Phys. 1975. V. 46. № 6. P. 2796.
5. Radhakrishna S., Haridoss S. // J. Appl. Phys. 1978. V. 49. № 1. P. 301.
6. Pillai P. K. C., Mollah M. // J. Macromolec. Sci. Phys. 1979. V. 16. № 3. P. 327.
7. Juhasz C., Gil-Zambrano J. L. // J. Phys. D. Appl. Phys. 1982. V. 15. № 1. P. 327.
8. Shareef A. U., Saraf K. K., Srivastava A. P. // Phys. Stat. Solid. A. 1983. V. 77. № 2. P. 381.
9. Bhardwaj R. P., Quamara J. K., Nagpaul K. K., Sharma B. L. // Phys. Stat. Solid. A. 1983. V. 80. № 2. P. 325.
10. Vrij A. K. // J. Appl. Phys. 1978. V. 49. № 6. P. 3621.
11. Гольдаде В. А., Воронежцев Ю. И., Неверов А. С., Пинчук Л. С. // Изв. АН БССР. Сер. физ.-техн. наук. 1983. № 3. С. 58.
12. Crine J.-P., Vrij A. K. // Mater. Chem. and Phys. 1984. V. 11. № 1. P. 85.

Институт механики металлокомплимерных
систем АН БССР

Поступила в редакцию
29.II.1988

УДК 541.64 : 547.96

СТАТИСТИЧЕСКИЕ И РЕГУЛЯРНЫЕ ГЕТЕРООЛИГОПРОТЕИНЫ НА ОСНОВЕ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА И ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Горячева Л. К., Пономарева Р. Б., Кузнецова Н. П.,
Самсонов Г. В.

Реакции поликонденсации при взаимодействии биополимеров с бифункциональным спивающим агентом позволяют получать высокомолекулярные гетеролигомеры белков, обладающие комплексом новых свойств [1]. Проведение подобных процессов основано на способности бифункциональных реагентов образовывать ковалентные связи с функциональными группами белков. Часто в качестве спивателя используют глутаровый альдегид. Ввиду химической неоднородности глутарового альдегида, представляющего собой смесь мономеров и продуктов собственной полимеризации [2], механизм процесса поликонденсации белков с диальдегидом до сих пор не ясен. Предполагается несколько механизмов взаимодействия альдегида с белками [3–5]. Известно, что при модификации глутаровым альдегидом белков, реакция идет с участием аминогрупп N-концевых и ε-лизиновых аминокислотных остатков, при этом образуется альдиминная связь, которая в результате сопряжения с двойной этиленовой связью на молекуле альдегида оказывается стабильной к кислотному гидролизу [2]. В присутствии восстановителя, например боргидрида натрия, происходит восстановление альдиминной связи $-\text{CH}=\text{N}-$ в более стабильную

$-\text{CH}_2-\text{NH}-$, а избыток реакционноспособных альдегидных групп восстанавливается до спиртовых. Сывороточный альбумин является удобным белком-носителем для модификации ферментов благодаря наличию большого числа лизиновых аминокислотных остатков, биосовместимости, способности к биодеградации в организме [6].

В настоящей работе получены высокомолекулярные растворимые конъюгаты сывороточного альбумина человека (СА) и панкреатической рибонуклеазы (РНКазы) реакцией поликонденсации с использованием глутарового альдегида (ГА). С целью достижения высокого выхода активного продукта были рассмотрены два способа проведения поликонденсации. При статистической поликонденсации (способ А) РНКазу, СА и ГА одновременно вводили в реакционную смесь. При осуществлении направленной конденсации (способ В) фермент вводили в реакционную смесь, содержащую предварительно спитый глутаровым альдегидом сывороточный альбумин.

В работе использовали глутаровый альдегид фирмы «Реанал», предварительно очищенный перегонкой в вакууме. Концентрацию глутарового альдегида в расчете на мономер, содержащий две альдегидные группы ($M=100$), определяли методом дифференциальной pH-метрии с гидроксиленом [7]. Использовали сывороточный альбумин человека производства ЛНИИЭМ им. Пастера ($M=68\,000$). Для работы препарат белка диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Панкреатическую рибонуклеазу ($M=13\,700$) завода медицинских препаратов Ленинградского производственного объединения мясной промышленности использовали без дополнительной очистки, активность препарата составляла ~ 300 условных оптических единиц на 1 мг белка. Реакцию поликонденсации останавливали добавлением боргидрида натрия.

В результате реакции поликонденсации белков с глутаровым альдегидом образуется набор макромолекул, полидисперсных по размеру; к такой системе можно применить способы молекулярно-массового усреднения, т. е. использовать среднечисленную \bar{M}_n и средневесовую \bar{M}_w величины молекулярных масс. Для расчета средних ММ растворимых белковых конъюгатов использовали данные по ММР, полученному методом ГПХ на колонке с сепарозой 6Б, калиброванной по белкам известной ММ [8, 9]. Определение трансферазной активности панкреатической рибонуклеазы и продуктов реакции поликонденсации проводили по методу Анфинсена [10]; активность выражали в условных единицах, определяемых, как оптическая плотность при 260 нм кислотоустойчивых продуктов гидролиза РНК, отнесенную на 1 мг белка; исходную активность рибонуклеазы принимали за 100%, а активность продуктов реакции – в % от исходной.

Ранее было показано, что на процесс поликонденсации существенное влияние оказывают в основном следующие факторы: исходные концентрации реагентов, их количественное соотношение в реакционной смеси, pH среды, в которой осуществляется реакция, продолжительность процесса, температура и ионная сила раствора [9, 11, 12]. В зависимости от этих факторов возможно направить процесс в сторону либо преимущественного межмолекулярного, либо внутримолекулярного спшивания; величина ММ конъюгированных продуктов также определяется исходными условиями. Получали конъюгаты с $\bar{M}\sim 200\,000$.

Процесс соконденсации РНКазы и СА в присутствии глутарового альдегида можно условно назвать статистическим, так как при наличии в смеси молекул разных белков возможность контактирования белковых молекул между собой подчиняется статистическим законам. В отличие от метода А при осуществлении метода В процесс образования конъюгатов осуществляется в две стадии: на первой проводится формирование блоков СА с $\bar{M}\sim 200\,000$, которые затем используют как матрицы для пришивки РНКазы; на второй стадии в реакционную смесь, содержащую олигомеры сывороточного альбумина, вносится фермент, присоединение которого идет по реакционноспособным группам на поверхности активированного глутаровым альдегидом белкового олигомера. Вероятно, в этом случае можно говорить о том, что образуемые по методу В гетероолигомеры имеют регулярное строение.

Гель-хроматография на сепарозе 6Б продуктов реакции, полученных разными методами, показала, что анализируемые пробы содержат смеси конъюгатов, ММ которых изменяется в пределах $68\cdot 10^3\text{--}890\cdot 10^3$ (рис. 1). ММР конъюгатов, полученных статистической и направленной конденса-

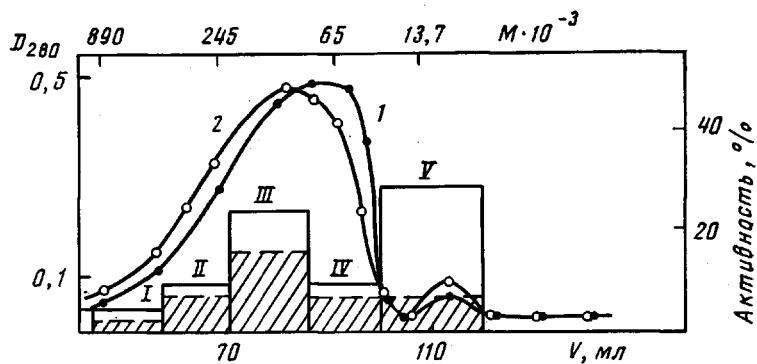


Рис. 1. Гель-хроматографическое разделение реакционной смеси, содержащей конъюгат альбумина с РНКазой на колонке с сефарозой 6Б: 1 — оптическая плотность при 280 нм продуктов реакции, полученных по методу А; 2 — оптическая плотность продуктов, полученных по методу В. Столбцами обозначено количественное распределение по фракциям (I—V) рибонуклеазной активности, выраженной в % от исходной: заштрихованные столбцы показывают распределение активности продуктов, полученных по методу А, не заштрихованные — по методу В

цией в одинаковых условиях, не зависит от способа поликонденсации. Наличие РНКазной активности во фракции V, соответствующей объему выхода свободного фермента, показывает, что не все количество внесенного в реакцию фермента находится в связанном состоянии. Большая доля активности РНКазы распределяется по фракциям I—IV, представляющим собой олигомеры СА. При проведении реакции методом А наблюдается значительное понижение общей РНКазной активности до 35% (табл. 1). Вероятно, в этом случае при наличии в смеси двух разных мономерных веществ реакция может идти как в сторону образования гомополимеров каждого из компонентов $-[-\text{СА}]_x-$, $-[-\text{РНКаза}]_y-$, так и в сторону формирования разнозвездных полимеров со случайной последовательностью мономерных звеньев в гетерополимере $-[\text{СА}]_x - [-\text{РНКаза}]_y - [\text{СА}]_z - [-\text{РНКаза}]_n-$.

В результате включения молекул фермента в структуру олигомеров СА может происходить блокирование активных центров фермента и, как следствие, резкое понижение энзиматической активности продуктов. Уменьшение активности при статистической поликонденсации биополимеров наблюдалось и ранее [13]. Проведение реакции по способу В дает практически полное сохранение активности фермента, которая составляет 80—100% от исходной. Реакция поликонденсации по двустадийному механизму наиболее благоприятна для получения конъюгатов в отношении сохранения ферментативной активности, так как в этом случае присоединение фермента происходит главным образом по поверхности блоков альбумина и практически не происходит включения фермента внутрь структуры конденсированного альбумина.

Из анализа данных по кинетике конденсации фермента с олигомерным носителем в условиях направленной конденсации следует (табл. 2),

Таблица 1

Характеристика гетероолигопротеинов, включающих сывороточный альбумин и панкреатическую рибонуклеазу, полученных разными методами

Способ поликонденсации	Общая РНКазная активность продуктов, %	Активность связанный РНКазы, %	Активность свободной РНКазы, %	$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$\bar{M}_n \cdot 10^{-3}$
A	35	28	7	200	120
B	80—100	48—60	32—40	200	130

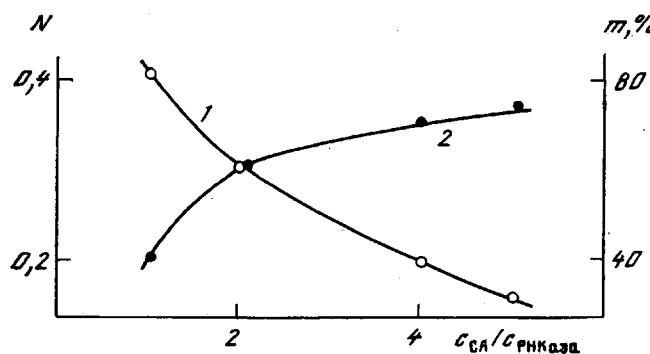


Рис. 2. Зависимость мольного соотношения РНКазы и альбумина в конъюгате N от исходного соотношения концентрации СА:РНКаза в реакционной смеси $c_{\text{СА}}:c_{\text{РНКаза}}$ (1) и изменение количества связанный с альбумином РНКазы m от состава исходной смеси (2)

что за 15 мин реакции процесс распределения РНКазы между олигомерами СА и раствором не завершен, так как наблюдается дальнейшее уменьшение содержания в реакционной смеси свободного фермента (фракция V). Понижение суммарной энзиматической активности во времени может быть объяснено инактивацией фермента в процессе непрекращающейся модификации. Увеличение значений средних ММ продуктов реакции (\bar{M}_w и \bar{M}_n), сопровождающееся перераспределением активности во фракциях, происходит, вероятно, вследствие слияния небольших блоков олигоальбумина в более крупные по имеющимся реакционноспособным группам. РНКазная активность фракций, соответствующих мономеру, димеру, тримеру СА, сшитому с ферментом (фракции III и IV), понижается, в то время как активность более высокомолекулярных конъюгатов (фракции I и II) растет. При исследовании влияния исходного соотношения СА и РНКазы на мольное соотношение фермента и белка в конъюгате (рис. 2) обнаружено некоторое оптимальное соотношение исходных концентраций для максимально полного связывания РНКазы в конъюгат, равное 2,0.

Таким образом, продемонстрирована возможность получения высокомолекулярных конъюгатов панкреатической рибонуклеазы, включающих макромолекулы фермента и сывороточного альбумина, с высокой энзиматической активностью путем предварительного образования блоков сывороточного альбумина и конденсацией на них молекул фермента. В то же время статистический способ с одновременным присутствием фермента и белка-носителя в реакционной среде приводит к образованию конъюгатов с резко пониженной энзиматической активностью.

Таблица 2
Кинетика конденсации панкреатической рибонуклеазы с олигомерами сывороточного альбумина по методу В

Время конденсации РНКазы, мин	Активность реакционной смеси, %	Активность фракций (разделение на колонке с сефарозой 6Б), %					$\bar{M}_w \cdot 10^{-3}$	$\bar{M}_n \cdot 10^{-3}$	\bar{M}_w/\bar{M}_n
		I	II	III	IV	V			
15	96,6	0,5	3,9	31,9	14,3	46,0	170	117	1,45
30	96,6	0,7	8,6	37,0	8,9	41,4	200	126	1,60
60	84,0	1,1	4,3	29,6	11,1	37,9	200	126	1,60
240	80,0	2,7	14,0	23,1	9,7	30,5	220	133	1,65

ЛИТЕРАТУРА

1. Poznansky M. Y. // Appl. Biochim. Biotechnol. 1984. V. 10. P. 41.
2. Monsan P., Puzo G., Mazargull H. // Biochimie. 1975. V. 57. P. 1281.
3. Richardst F. M., Knowles Y. R. // J. Molec. Biol. 1968. V. 37. P. 231.
4. Peters K., Richard F. M. // Ann. Rev. Biochem. 1977. V. 46. P. 523.
5. Hardy P. M., Hughes G. Y., Rydon H. N. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1979. № 9. P. 2282.
6. Chem. and Engng News. 1985. V. 63. № 39. P. 19.
7. Roe H. R., Mitchel G. // Analyt. Chem. 1951. V. 23. № 12. P. 1758.
8. Catsimpoolas N. // Analyt. Biochem. 1974. V. 61. № 1. P. 101.
9. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1985. Т. 27. № 12. С. 2611.
10. Anfinsen C. B., Redfield R. R., Choate W. L., Page Y., Carroll W. B. // J. Biol. Chem. 1954. V. 207. P. 201.
11. Payne Y. // Biochem. J. 1973. V. 135. № 4. P. 867.
12. Кузнецова Н. П., Самсонов Г. В. // Высокомолек. соед. А. 1986. Т. 28. № 3. С. 643.
13. Paillot B., Remy M. H., Thomas D., Broun G. // Pathol. Biol. 1974. V. 22. № 6. P. 491.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
1.III.1988

УДК 541.64:542.952

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМУЛЬСИОННОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

Налчаджян С. О., Асланян А. С.

Согласно теории Смита и Эварта [1–3], повышенная скорость эмульсионной полимеризации (ЭП) и высокая степень полимеризации являются следствием снижения скорости обрыва из-за разобщенности радикалов, находящихся в составе полимерно-мономерных частиц (ПМЧ). Роль ПАВ сводится к обеспечению диспергированного состояния мономера в водной фазе. Среднее число свободных радикалов (СР) в частице при отсутствии обмена между ними выражается [3] уравнением

$$\bar{n} = (q/4) [I_0(q)/I_1(q)], \quad (1)$$

где $q = \sqrt{8\rho V/k_0 N}$, ρ — скорость поступления СР в N частиц, V — средний объем частиц, k_0 — константа скорости обрыва, $I_0(q)$ и $I_1(q)$ — модифицированные бесселевые функции первого рода соответственно нулевого и первого порядка по аргументу. Количество образующегося полимера в единице времени в одной частице $w_p = k_p \bar{n} [M]$ (k_p — константа скорости роста, $[M]$ — концентрация мономера), а в единице объема мономера скорость полимеризации $w_p = w_n/V$.

Ввиду того, что $\rho/NV = w_n$, имеем

$$q = \sqrt{8w_n/k_0 V} \quad (2)$$

и

$$w_p = k_p [M] \sqrt{w_n/2k_0} \Phi(q), \quad (3)$$

где w_n — скорость инициирования, отнесенная к мономерной фазе, а $\Phi(q) = I_0(q)/I_1(q)$. Параметр $k_p [M] \sqrt{w_n/2k_0} = (w_p)_m$ выражает скорость полимеризации в массе. Тогда

$$w_p = (w_p)_m \Phi(q), \quad (4)$$

где $\Phi(q)$ — степень ускорения, вызываемая ограничением обрыва.

С. С. Медведевым [4–8] была развита другая точка зрения о механизме ЭП и роли ПАВ в нем, согласно которой адсорбционный слой на поверхности ПМЧ является кинетически активной средой, чем и обусловлены особенности ЭП.