

В. В. МОСОЛОВ, Л. И. КРотова, Е. В. СОКОЛОВА

**АЦИЛТРИПСИНЫ. ОЧИСТКА МЕТОДОМ АФФИННОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  
С БЕЛКАМИ-ИНГИБИТОРАМИ**

(Представлено академиком А. С. Спириным 27 XI 1973)

Ацилтрипсины, полученные при обработке трипсина ангидридами кислот, сохраняют высокую активность, хотя и отличаются от исходного фермента по ряду свойств (<sup>1, 2</sup>). В обычных условиях в трипсине ацилируются  $\epsilon$ -аминные группы остатков лизина и ОН-группы тирозина (<sup>3</sup>).  $\alpha$ -Амипная группа N-концевого изолейцина может быть ацилирована только в условиях частичной денатурации фермента (<sup>4</sup>).

Трипсин с избирательно ацетилированными  $\epsilon$ -аминными группами получали, обрабатывая фермент в 0,01 M CaCl<sub>2</sub> порциями уксусного ангидрида (всего 1% от веса белка) при pH 6,7 и 0°. Ацетилированный трипсин подвергали действию гидроксилamina (<sup>3</sup>) для деацилирования остатков тирозина. Полученное производное (Ац-1) диализовали против воды в течение двух суток и лиофилизировали. Подобная обработка приводит к ацилированию всех  $\epsilon$ -аминных групп в трипсине (<sup>3</sup>). Для ацилирования  $\alpha$ -амипной группы Ац-1 растворяли в 0,1 M фосфатном буфере pH 6,8, содержащем 2 M мочевины, и повторно обрабатывали уксусным ангидридом (<sup>4</sup>). Дважды ацетилированный трипсин (Ац-2) диализовали и лиофилизировали. Сукцинилтрипсин получали по методу Клотца (<sup>5</sup>), добавляя яптарный ангидрид к раствору трипсина в 0,02 M CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0) при 0°. Далее полученный продукт обрабатывали так же, как Ац-1.

В качестве специфического сорбента для трипсина и его производных использовали овомукоид (ингибитор трипсина из яичного белка), ковалентно связанный с сефарозой. К 10 мл сефарозы 6В («Pharmacia»), активированной BrCN (<sup>6</sup>) и суспендированной в 30 мл 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, добавляли 150 мг куриного овомукоида (<sup>7</sup>). Реакцию проводили в течение 16 час при pH 9,5 и 4°. Сефарозу с присоединенным овомукоидом промывали для удаления непрореагировавшего белка, как описано в (<sup>8</sup>).

Через колонку с овомукоид-сефарозой, уравновешенную 0,1 M боратым буфером pH 7,8, содержащим 0,02 M CaCl<sub>2</sub>, пропускали раствор трипсина (препарат «Спофа»), в том же буфере. Колонку промывали буфером до прекращения вымывания веществ, поглощающих при 280 мμ, и связанный трипсин элюировали 0,2 M KCl при pH 2,0 в условиях, при которых соединение трипсина с ингибитором легко диссоциирует (<sup>9</sup>). Активность иммобилизованного овомукоида, рассчитанная на основании количества связанного при pH 7,8 трипсина, составляла в различных опытах от 60 до 80% от активности ингибитора в растворе.

Удельная активность трипсина, элюированного с колонки при pH 2,0 (компонент II, табл. 1), по своей величине, по-видимому, близка к активности фермента, свободного от продуктов автолиза и других неактивных примесей (<sup>10</sup>). В то же время материал, не задерживающийся на колонке при pH 7,8 и выходящий с током буфера (компонент I), практически лишен ферментативной активности.

Препараты ацилтрипсинов подвергали очистке с помощью аналогичной процедуры (рис. 1), только элюцию связанного на колонке фермента

проводили 0,1 *M* уксусной кислотой, так как ацилтрипсины обладают ограниченной растворимостью в 0,2 *M* KCl при pH 2,0.

Активность Ац-1 после очистки на колонке с иммобилизованным овомукоидом значительно выше активности ацетилтрипсина, полученного в аналогичных условиях и очищенного другими методами <sup>(3)</sup>, и не уступает по величине активности нативного трипсина (табл. 1). Поскольку содержание свободных аминных групп (по реакции с нингидрином <sup>(12)</sup>) одинаково для компонентов I и II Ац-1, эти данные показывают, что блокирование  $\epsilon$ -аминных групп остатков лизина не оказывает существенного

Таблица 1

Активность трипсина и его производных до и после очистки на колонке с овомукоид-сефарозой (μ мол. гидролизованного субстрата в 1 мин. на 1 мг белка) \*

Фермент	Исходный препарат	После фракционирования на овомукоид-сефарозе	
		компонент I	компонент II
Трипсин	39,0	2,3	67,0
Ац-1	44,3	3,1	66,0
Сукцинилтрипсин	24,2	1,4	40,0

\* Активность здесь и далее определялась с этиловым эфиром Nα-бензоил-L-аргинина в стандартных условиях <sup>(11)</sup>.

влияния на каталитическую активность трипсина. Активность очищенного сукцинилтрипсина ниже (табл. 1), что может быть следствием изменения конформации фермента в результате введения большого числа отрицательных зарядов.

Влияние различных белковых ингибиторов на активность трипсина, Ац-1 и сукцинилтрипсина показано на рис. 2. Куриный овомукоид в меньшей степени угнетает активность Ац-1, чем активность трипсина, что согласуется с более ранними данными <sup>(4)</sup>. Однако ингибитор из картофеля

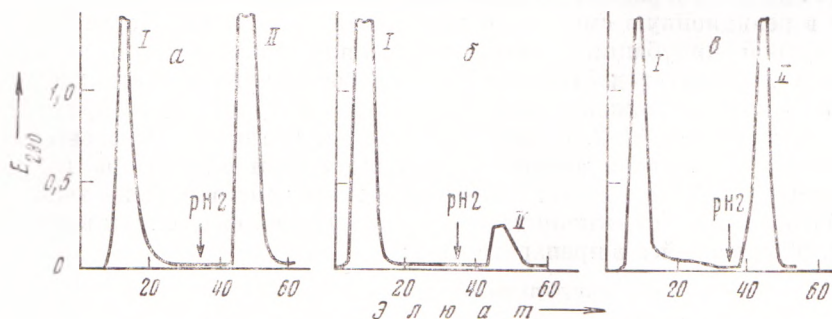


Рис. 1. Фракционирование препаратов ацилтрипсинов на колонке (1,2×10 см) с иммобилизованным овомукоидом: а – Ац-1, б – Ац-2, в – сукцинилтрипсин (каждый белок наносили в количестве 15 мг). I – компонент, элюирующийся буфером с pH 7,8; II – компонент, элюирующийся 0,2 *M* KCl при pH 2,0. Элюат в миллиметрах

<sup>(13)</sup> в одинаковой мере влиял на активность ферментов, а ингибитор из сои <sup>(14)</sup> был более эффективен в отношении Ац-1. Таким образом, остатки лизина в трипсине играют существенную роль в реакции с овомукоидом, но не с другими исследованными ингибиторами. Эти данные показывают, что различные функциональные группы фермента принимают участие в связывании различных белковых ингибиторов. Сукцинилтрип-

син угнетался в меньшей степени всеми исследованными ингибиторами. Овомукоид почти не влияет на активность сукцинилтрипсина в растворе, тем не менее активный сукцинилтрипсин количественно связывался на колонке с иммобилизованным ингибитором (рис. 1в, табл. 1).

В отличие от Ац-1, Ац-2 обладает весьма низкой активностью (см. ниже) и почти не содержит материала, реагирующего с иммобилизованным овомукоидом (рис. 1б). Для изучения возможности взаимодействия Ац-2 с белковыми ингибиторами в растворе был поставлен опыт по конкуренции между нативным трипсином и Ац-2<sup>(15)</sup>. Спирторастворимый ингиби-

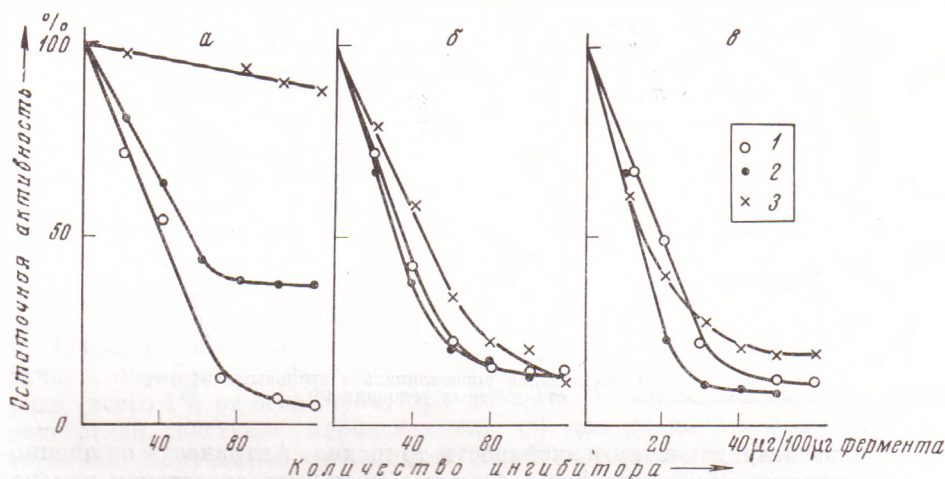


Рис. 2. Влияние белковых ингибиторов на нативный трипсин (1), Ац-1 (2) и сукцинилтрипсин (3). а — овомукоид, б — ингибитор из клубней картофеля, в — спирторастворимый ингибитор из соп. 100  $\mu\text{г}$  трипсина или Ац-1 и 150  $\mu\text{г}$  сукцинилтрипсина инкубировали с возрастающими количествами ингибитора 5 мин. при комнатной температуре в 0,025  $M$  трис-НСl-буфере рН 8,0 и затем определяли остаточную ферментативную активность с этиловым эфиром Na-бензоил-L-аргинина<sup>(11)</sup>

тор из соп инкубировали 10 мин. при комнатной температуре с Ац-2 и затем в реакционную смесь вносили нативный трипсин. После повторной 10-минутной инкубации в смеси определяли триптическую активность. Если Ац-2 образует достаточно прочное соединение с ингибитором, то следует ожидать снижения эффективности действия ингибитора на трипсин в присутствии Ац-2. В действительности, этого не наблюдается, и остаточная триптическая активность в присутствии ингибитора и равного количества Ац-2 превышает активность смеси, состоящей из трипсина и ингибитора лишь на величину, равную остаточной ферментативной активности, содержащейся в препарате Ац-2:

Состав инкубационной смеси	Активность, %
Нативный трипсин	100,0
Нативный трипсин + ингибитор	14,8
Ац-2 + ингибитор + нативный трипсин	21,5
Ац-2	6,6

Установлено<sup>(4)</sup>, что ацетилирование  $\alpha$ -аминной группы N-концевого изолейцина в трипсине может быть осуществлено, если реакция с уксусным ангидридом проводится в 2–4  $M$  мочевины. Процесс сопровождается полной потерей активности и деструкцией активного центра фермента, в то же время контрольный образец трипсина, инкубированный в тех же условиях, но без обработки уксусным ангидридом, не подвергается инактивации. Результаты, полученные в данной работе, показали, что ацетилирование трипсина в 2 $M$  растворе мочевины приводит также к утрате способности связывать природные белковые ингибиторы фермента. Эти

данные являются дополнительным аргументом в пользу представлений о едином механизме взаимодействия трипсина с субстратами и белками-ингибиторами (<sup>16</sup>).

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
19 XI 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> H. Fraenkel-Conrat, R. S. Bean, H. Lineweaver, J. Biol. Chem., v. 177, 385 (1949).  
<sup>2</sup> L. Terminiello, J. S. Ram et al., Arch. Biochem. and Biophys., v. 57, 252 (1955).  
<sup>3</sup> J. Labouesse, M. Gervais, Europ. J. Biochem., v. 2, 215 (1967). <sup>4</sup> J. Chevallier, J. Yon, J. Labouesse, Biochim. et biophys. acta, v. 181, 73 (1969). <sup>5</sup> I. M. Klotz, Methods in Enzymol., v. 11, 576 (1967). <sup>6</sup> R. Azen, J. Porath, S. Ernback, Nature, v. 214, 1302 (1967). <sup>7</sup> H. Lineweaver, C. W. Murray, J. Biol. Chem., v. 171, 565 (1947). <sup>8</sup> R. Azen, S. Ernback, Europ. J. Biochem., v. 18, 351 (1971). <sup>9</sup> Д. Нортон, М. Кунитц, Р. Херриотт, Кристаллические ферменты, М., 1950. <sup>10</sup> N. C. Robinson, R. W. Tye et al., Biochemistry, v. 10, 2743 (1971). <sup>11</sup> M. Laskowski, Methods in Enzymol., v. 2, 26 (1955). <sup>12</sup> S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. Chem., v. 211, 907 (1954). <sup>13</sup> В. В. Мосолов, Л. П. Васькова и др., ДАН, т. 204, 1002 (1972). <sup>14</sup> Y. Birk, A. Gertler, Biochemical Preparations, v. 12, 25 (1968). <sup>15</sup> G. Feinstein, R. E. Feeney, J. Biol. Chem., v. 241, 5183 (1966). <sup>16</sup> M. Laskowski, jr., R. W. Sealock, In: The Enzymes, v. 3, 1971, p. 375.