

УДК 541(64+13)

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МУЛЬТИСЛОЯХ

© 2011 г. А. С. Малинин, А. А. Рахнянская, А. В. Бачева, А. А. Ярославов

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова.

Химический факультет

119991 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 09.02.2010 г.

Принята в печать 19.05.2010 г.

Методом мультислойной адсорбции полиэлектролитов на поверхность боросиликатных стеклянных микросфер осуществлена иммобилизация α -химотрипсина. Показано, что фермент адсорбируется как на положительно, так и на отрицательно заряженной поверхности, частично сохраняя свою активность по сравнению с его активностью в растворе. Активность фермента зависит от количества полиэлектролитных слоев, предварительно адсорбированных на стеклянные микросферы, а также заряда поверхности. α -Химотрипсин, адсорбированный на отрицательно заряженной поверхности, в 4 раза более активен, чем на положительной.

Иммобилизация ферментов на неорганических и полимерных матрицах широко используется для проведения различных биотехнологических процессов. Такой прием позволяет пространственно разделить фермент и субстрат/продукт и одновременно сохранить высокий уровень каталитической активности фермента [1]. Разработанный в последнее десятилетие метод модификации поверхности путем послойного нанесения полиэлектролитов противоположного знака заряда позволяет в широких пределах менять физико-химические свойства носителя — его толщину, заряд, гидрофильно-гидрофобный баланс и т.д. [2]. Такие мультислойные покрытия со встроенными в них функциональными элементами (наночастицами, ферментами, красителями и т.п.) могут найти применение в микроэлектронике, оптике, биотехнологии, биоаналитике [3].

В настоящей работе мы описываем иммобилизацию протеолитического фермента α -химотрипсина (ХТ) на боросиликатных стеклянных микросферах (БСМ) диаметром 5 мкм. Применение стандартных процедур позволило создавать на поверхности этих частиц ионогенные группы [4], которые использовали для последующего формирования полимерного мультислоя по методу послойного нанесения полиэлектролитов. Основное внимание было уделено влиянию заряда и толщины мультислойного покрытия на функциональные свойства иммобилизованного фермента.

E-mail: andrimalinin@gmail.ru (Малинин Андрей Сергеевич).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения БСМ с анионными группами на поверхности БСМ(–) использовали следующую процедуру. 200 мг БСМ со средним диаметром 4.9 ± 0.5 мкм (рис. 1) производства фирмы “Duke Scientific Corporation” помещали в стеклянную посуду с завинчивавшейся пластиковой крышкой и добавляли смесь 2 мл концентрированной серной кислоты и 2 мл 30%-ного раствора пероксида водорода. Спустя сутки надосадочную жидкость сливали, осевшие БСМ несколько раз промывали бидистиллированной водой до нейтральной реакции супернатанта и сушили в нагревательном шкафу при 110°C . Количество по-

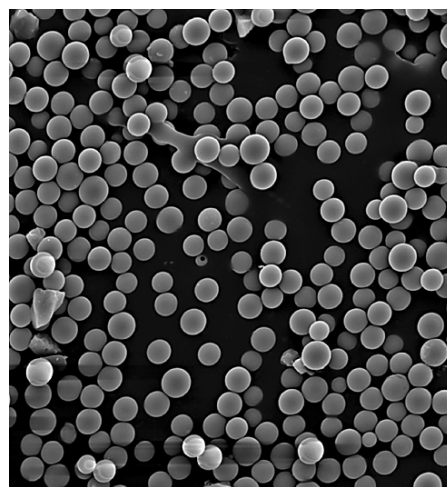
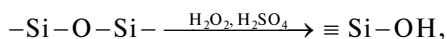


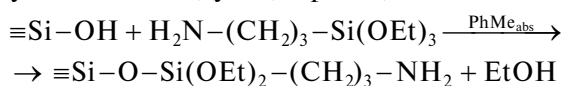
Рис. 1. Микрофотография боросиликатных стеклянных микросфер, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа.

верхностных силанольных групп, полученных по реакции



определяли методом кондуктометрического титрования [5]. Было найдено, что на поверхности каждой анионной микросферы располагалось 2.5×10^8 силанольных групп или 3 силанольные группы на 1 nm^2 поверхности БСМ(-).

Для получения микросфер с катионными группами [БСМ(+)] на поверхности к 2 г БСМ добавляли 2 мл 4%-ного раствора 3-аминопропилтриэтоксисилана в абсолютном толуоле. Смесь кипятили с обратным холодильником в течение суток, после чего микросферы промывали абсолютным толуолом и сушили до постоянной массы. Аминопропильные группы на поверхности получались по следующей реакции



Их количество было определено методом потенциометрического титрования [5]. Было установлено, что на поверхности каждой катионной микросферы располагалось 2.2×10^8 аминогрупп или 3 аминогруппы на 1 nm^2 поверхности БСМ(+).

Катионный полимер (КП) синтезировали алкилированием поли-4-винилпиридина (“Aldrich”) со степенью полимеризации 600 бромистым этилом по методике [6]. По данным ИК-спектроскопии, степень кватернизации составила 94%. Использовали анионные полимеры, полиакриловую кислоту (ПАК) со степенью полимеризации 1100 (“Aldrich”) и полистиролсульфо кислоту (ПССК) со степенью полимеризации 340 (“Aldrich”), а также ХТ из бычьей печени (“Sigma”). Концентрация КП приведена в молях катионных (кватернизованных) звеньев в литре раствора, концентрация анионных полимеров – в молях звеньев в литре раствора, концентрация ХТ – в миллиграммах в миллилитре раствора. Флуоресцентно меченную полиакриловую кислоту (Ф-ПАК) получали конденсацией с флуоресцеин изотиоцианатом (“Sigma”), который предварительно был модифицирован этилендиамином [7].

Для измерения количества КП, ПССК и Ф-ПАК, не связавшихся с микросферами, использовали следующую процедуру. Смеси веществ с суспензией микросфер в 10^{-2} М боратном буфере с pH 9.2 центрифугировали на центрифуге Galaxy Mini (“VWR International”) в течение 3 мин со скоростью 6000 об/мин. Осадки отделяли, и в супернатанте определяли оптическую плотность при $\lambda = 257 \text{ nm}$ (для КП и ПССК) или интенсивность флуоресценции при $\lambda_{\text{фл}} = 515 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{возб}} = 493 \text{ nm}$) (для Ф-ПАК). Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре “Ul-

traspec 1100 pro” (“Shimadzu”), интенсивность флуоресценции – на спектрофлуориметре “F-4000” (“Hitachi”).

Количество фермента ХТ, не связавшегося с микросферами, измеряли методом флуориметрии при $\lambda_{\text{фл}} = 345 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ nm}$). Адсорбцию ХТ на положительно заряженные поверхности проводили в 10^{-2} М боратном буфере с pH 9.2, а на отрицательно заряженные поверхности – в 10^{-2} М цитратном буфере с pH 5.5.

Каталитическую активность ХТ определяли спектрофотометрически, измеряя скорость гидролиза специфического субстрата – *n*-нитроанилид пироглутамил-фенилаланина по накоплению в растворе *n*-нитроанилина при $\lambda = 410 \text{ nm}$. Активность адсорбированного на микросферах фермента приведена относительно активности нативного фермента в объеме раствора, которую принимали за 100%.

Микрофотографии исходных БСМ и БСМ, модифицированных полиэлектролитами, получали на просвечивающем электронном микроскопе “LEO912 AB OMEGA” (“Carl Zeiss”) и сканирующем электронном микроскопе “Eiko IB-3” (“Hitachi”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цель настоящей работы – исследование каталитических свойств (активности) ХТ, иммобилизованного на поверхности твердого субстрата (силикатных микросфер) и на мультислой нанометровой толщины, создаваемом адсорбированными противоположно заряженными полиэлектролитами. Связывание ХТ с микросферами контролировали, измеряя его концентрацию в супернатанте после отделения частиц с адсорбированным ферментом.

Мы начали исследования адсорбции ХТ на поверхности анионных и катионных БСМ, синтез которых описан в Экспериментальной части. Изоионная точка фермента $pI = 8.4-8.6$ [8]. Из литературы известно, что эффективность адсорбции белковых глобул повышается в том случае, если заряды поверхности и глобулы противоположны по знаку [9]. Поэтому связывание ХТ с анионными микросферами было исследовано при pH 9.2, когда молекулы фермента были заряжены положительно; его связывание с катионными микросферами изучали при pH 5.5, когда молекулы фермента приобретали отрицательный заряд. Такой подход к иммобилизации ХТ (придание белковым глобулам заряда, противоположного по знаку заряду поверхности) применяли для всех изученных в работе систем.

Результаты адсорбционных экспериментов для ХТ и исходных анионных и катионных микросфер представлены на рис. 2 в координатах

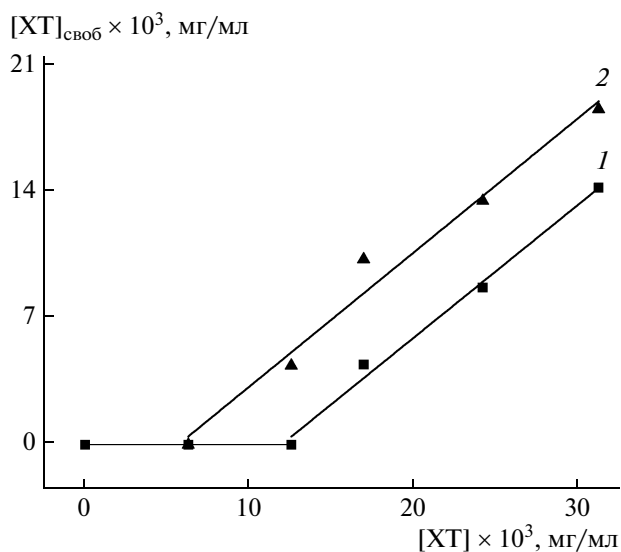


Рис. 2. Зависимость концентрации ХТ, не связанного с БСМ(-) (1) и БСМ(+), от общей концентрации ХТ в системе: 1 – 64.5 мг микросфер; 2 мл 10^{-2} М цитратного буфера, pH 5.5; 2 – 2 мл 10^{-2} М боратного буфера, pH 9.2.

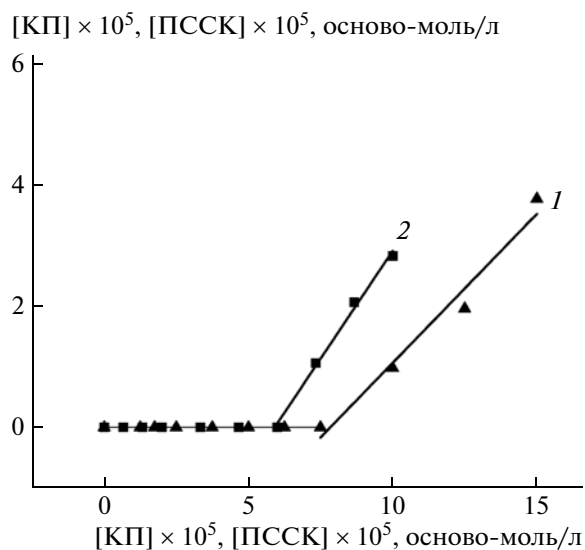


Рис. 3. Зависимость концентрации полимера, не связанного с микросферами, от общей концентрации полимера в системе. БСМ(-)-КП (1) и БСМ(+)-ПССК (2). 30 мг микросфер, 2 мл 10^{-2} М боратного буфера, pH 9.2.

концентрация свободного фермента ($[ХТ]_{своб}$) – общая концентрация фермента в системе ($[ХТ]$). В обоих случаях фермент полностью связывался с микросферами вплоть до некоторой концентрации $[ХТ]_{макс}$. При больших концентрациях фермент начинал накапливаться в растворе. Как следует из рисунка, концентрация фермента, при которой достигалось предельное заполнение анионных микросфер (кривая 1), был в ~2 раза выше соответствующего показателя для катионных БСМ (кривая 2).

Каталитическая активность адсорбированного ХТ оказалась выше для анионных БСМ, чем для катионных, хотя в обоих случаях была заметно ниже активности ХТ в растворе: лишь 5% для БСМ(-) и меньше 1% для БСМ(+), по сравнению с ХТ в фосфатном буферном растворе (результаты приведены после нормирования на одинаковое количество фермента).

Мы ожидали, что активность фермента будет сохраняться в большей степени при его иммобилизации на “мягкой” поверхности – полимерном мультислое. В качестве первого шага на поверхности микросфер были адсорбированы полиэлектролиты: катионный КП на БСМ(-) и анионный ПССК на БСМ(+). За связыванием полимеров следили, отделяя микросферы с адсорбированными полимерами и определяя концентрацию несвязанных полимеров в супернатантах (рис. 3). КП количественно адсорбировался на поверхности БСМ(-) в области $[КП] \leq 7.5 \times 10^{-5}$ моль/л. Комплекс предельного со-

става мы будем обозначать БСМ(-)//КП. Что касается ПССК, для нее количественное связывание с БСМ(+), наблюдалось в области $[ПССК] \leq 6 \times 10^{-5}$ моль/л с соответствующим комплексом предельного состава БСМ(+)//ПССК. Из данных рис. 3 можно рассчитать предельное количество заряженных групп, которые приносит на поверхность микросферы адсорбированный полимер: 5.5×10^8 для КП, связанного с БСМ(-), и 3.7×10^8 для ПССК, связанной с БСМ(+). Напомним, что каждая частица БСМ(-) несла на своей поверхности 5×10^8 анионных силанольных групп, а каждая частица БСМ(+), 2.2×10^8 катионных аминогрупп (см. экспериментальную часть). Таким образом, для модифицированных частиц БСМ(-)//КП количество кватернизованных групп КП превышало количество исходных силанольных групп в $(5.5 \times 10^8) : (2.5 \times 10^8) = 2.2$ раза; для модифицированных частиц БСМ(+)//ПССК превышение сульфогрупп ПССК над исходными аминогруппами составляло $(3.7 \times 10^8) : (2.2 \times 10^8) = 1.7$ раза. Эти оценки свидетельствуют о том, что адсорбция предельного количества КП приводила не только к нейтрализации исходного заряда силанольных групп БСМ(-), но и к возникновению на поверхности частиц положительного заряда вследствие адсорбции избыточного количества катионных макромолекул. Аналогично адсорбция предельного количества ПССК сопровождалась появлением отрицательного заряда на поверхности БСМ(+).

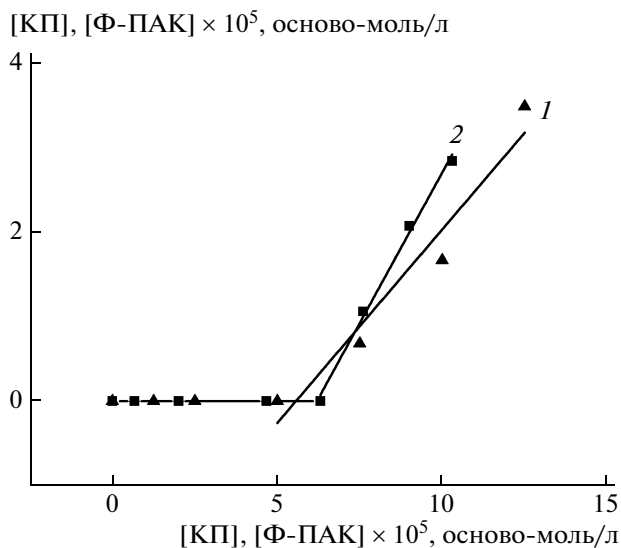


Рис. 4. Зависимость концентрации полимера, не связанного с микросферами, от общей концентрации полимера в системе. БСМ(-)//КП-Ф-ПАК (1) и БСМ(+)//ПССК – КП (2). 30 мг микросфер, 2 мл 10⁻² М боратного буфера, рН 9.2.

Причина этого заключается в следующем. Известно, что адсорбция гибкоцепных полиэлектролитов (к числу которых относятся КП и ПАК) сопровождается формированием экспонированных в водную фазу “петель” и “хвостов”, в которых накапливается избыточный заряд: положительный при адсорбции катионных полимеров и отрицательный при адсорбции анионных. При больших (предельных) степенях заполнения поверхности адсорбированными макромолекулами это приводит к ее перезарядке [10]. Наличие некомпенсированного заряда позволяет адсорбировать на такой поверхности полиэлектролит противоположного по знаку заряда, что снова вызывает инверсию знака поверхностного заряда частицы [11].

Следуя такому подходу, мы оценили способность катионных частиц БСМ(-)//КП адсорбировать анионный полимер. Эксперимент проводили по схеме, описанной выше для связывания КП на анионных БСМ(-) с той лишь разницей, что в качестве добавляемого к микросферам полиэлектролита использовали Ф-ПАК, ковалентно меченную флуоресцентной меткой (см. Экспериментальную часть). Полученные результаты свидетельствовали о полном связывании полианиона в интервале [Ф-ПАК] ≤ 5.6 × 10⁻⁵ моль/л (рис. 4, кривая 1), т.е. о формировании частиц БСМ(-)//КП//Ф-ПАК с отрицательно заряженным внешним (обращенным в водную фазу) слоем.

Аналогичным образом было показано, что анионные частицы БСМ(+)//ПССК способны

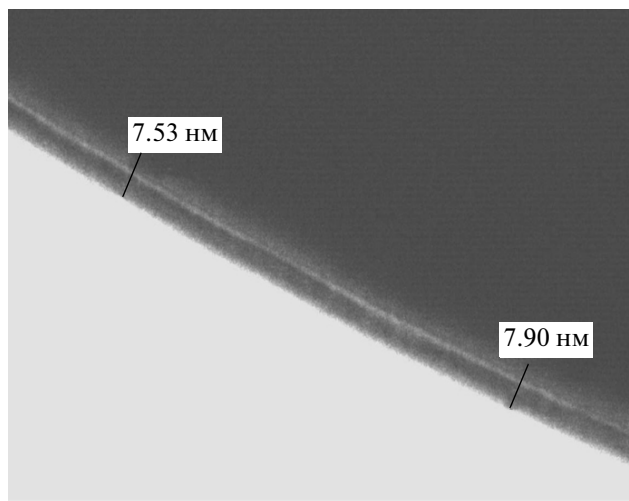


Рис. 5. Электронная микрофотография поверхности частицы состава БСМ(-)//КП//ПАК.

адсорбировать катионный полимер. Эффективность связывания катионного КП представлена кривой 2 на рис. 4. В данном случае полное связывание поликатиона наблюдалось вплоть до концентрации КП, равной 6 × 10⁻⁵ моль/л, что привело к формированию положительно заряженных частиц БСМ(+)//ПССК//КП.

На микрофотографии частиц БСМ(-)//КП//ПАК, полученной с помощью просвечивающей электронной микроскопии (рис. 5), хорошо виден менее плотный наружный слой, образованный последовательной адсорбцией катионного (КП) и анионного (ПАК) полимеров. Толщина этого бислоя (7.53–7.90 нм) хорошо коррелирует с литературными данными о толщине слоев, создаваемых на твердых поверхностях парой адсорбированных противоположно заряженных полиэлектролитов [12]. Похожая картина наблюдалась и для частиц БСМ(+)//ПССК//КП (данные не приведены).

Показано, что описанная выше процедура (чередующаяся адсорбция катионного и анионного полимера) может быть повторена многократно, в результате чего на поверхности частиц формируется стабильное полимерное покрытие (мульти-слой), толщина которого практически линейно увеличивается с количеством адсорбированных полимерных слоев [13]. Мы воспользовались этой процедурой для формирования мультислоев с чередованием катионного (КП) и анионного (ПАК) полимеров. Последовательность нанесения полимеров и знак заряда последнего (обращенного к водному раствору) слоя представлены в таблице. Микросферы с адсорбированными полимерами объединены в две группы с отрицательным и положительным зарядом внешнего слоя. Такая классификация позволяет проследить вли-

Строение и каталитические свойства мультислоев с иммобилизованным ХТ

Образец, №	Комплекс	Заряд	Количество адсорбированных глобул ХТ* $N \times 10^{-4}$	Активность адсорбированного ХТ**
1	БСМ(-)	-	9.3	0.05
2	БСМ(+)//ПССК	-	9.8	0.18
3	БСМ(+)//ПССК//КП//ПАК	-	9.5	0.42
4	БСМ(+)//ПССК//(КП//ПАК) ₂	-	9.6	0.44
5	БСМ(+)	+	4.6	>0.01
6	БСМ(-)//КП	+	5.2	0.3
7	БСМ(-)//КП//ПАК//КП	+	5.4	0.16
8	БСМ(-)//КП//(ПАК//КП) ₂	+	5.5	0.15

* В расчете на одну микросферу.

** Доля от активности ХТ в цитратном (для образцов 1–4) и боратном буфере (для образцов 5–8).

яние количества промежуточных слоев (фактически толщины покрытия) на активность фермента, иммобилизованного на внешнем полимерном слое.

ХТ был иммобилизован на поверхности микросфер с адсорбированными полиэлектролитами аналогично тому, как это было сделано для исходных микросфер БСМ(-) и БСМ(+). Количество иммобилизованных глобул ХТ, приходящихся на одну микросферу, и относительная активность иммобилизованного фермента приведены в таблице.

Видно, что фермент в большем количестве связывался с анионными (т.е. отрицательно заряженными в условиях эксперимента) поверхностями, чем с катионными (положительно заряженными). Это различие составляло 1.7–2.0 раза. Причина повышенной емкости анионных микросфер по отношению к ферменту могла заключаться в следующем. Мы упоминали о том, что связывание ХТ, белка с $pI = 8.6-8.8$, на анионных микросферах проводили в буфере с $pH 5.5$. В таких условиях белковые глобулы несли заметный положительный заряд и могли эффективно адсорбироваться на отрицательно заряженной поверхности. Для связывания фермента на катионных микросферах был использован буфер с $pH 9.2$, в котором белковые глобулы были слабо отрицательны (практически нейтральны). Это могло приводить к понижению эффективности адсорбции белка, т.е. к уменьшению количества адсорбированных глобул по сравнению с результатами экспериментов с использованием анионных микросфер.

Вместе с тем активность фермента, иммобилизованного на анионной поверхности, была в несколько раз выше активности фермента, покрывавшего катионную поверхность (после нормировки на одинаковое количество иммобилизованного белка). Из литературных данных известно о дезак-

тивирующем влиянии положительно заряженной поверхности на адсорбированные ферменты, которое обычно связывают с конформационными перестройками в адсорбированных макромолекулах [14]. По-видимому, аналогичный эффект наблюдался в случае иммобилизации ХТ на катионных частицах: исходных БСМ(+) и микросферах, внешний слой которых был представлен адсорбированными макромолекулами КП (таблица, образцы 6–8).

Активность иммобилизованного ХТ существенно зависела от количества полиэлектролитных слоев, нанесенных на поверхность микросфер. Выше отмечалось, что фермент, иммобилизованный на поверхность исходных (немодифицированных полимерами) анионных БСМ(-) сохранял 5% своей каталитической активности (образец 1). Иммобилизация ХТ на один слой полианиона повышала его активность до 18% (образец 2), иммобилизация на три слоя (полианион/поликатион/полианион) сохраняла 42% ферментативной активности (образец 3). Дальнейшее увеличение количества полимерных слоев (толщины полиэлектролитной прослойки) не оказывало заметного влияния на активность ХТ (образец 4). Таким образом, трехслойное полиэлектролитное покрытие с анионным полимером на внешнем слое обеспечивало эффективную иммобилизацию фермента и высокий уровень его каталитической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можжаев В.В., Хмельницкий Ю.Л. Иммобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987.
2. Multilayer Thin Films / Ed. by G. Decher, J.B. Schlenoff. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.

3. *Decher G., Eckle M., Schmitt J., Struth B.* // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1998. V. 3. № 1. P. 32.
4. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичикина. М.: Физматлит, 2003.
5. *Нестеренко П.Н., Иванов А.В., Галева Н.А., Сеневе-ратне Дж. Б.* // *Журн. аналит. химии.* 1997. Т. 52. № 8. С. 814.
6. *Fuoss R.M., Strauss U.P.* // *J. Polym. Sci.* 1948. V. 3. № 2. P. 246.
7. *Рупас F., Drobnik J., Kalal J.* // *Anal. Biochem.* 1980. V. 104. № 1. P. 141.
8. *Enzymes of Molecular Biology* / Ed. by M.M. Burrell. Totowa: Humana Press, 1993. V. 16. P. 277.
9. *Lewis D., Whateley T.L.* // *Biomaterials.* 1988. V. 9. № 1. P. 71.
10. *Borisov O., Zhulina E., Birhstein T.* // *J. Phys. II.* 1994. V. 4. № 6. P. 913.
11. *Decher G.* // *Science.* 1997. V. 277. № 5330. P. 1232.
12. *Harris J. J., Bruening M.L.* // *Langmuir.* 2000. V. 16. № 4. P. 2006.
13. *Plech A., Salditt T., Munster C., Peisl J.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 223. № 1. P. 74.
14. *Zoungrana T., Findenegg G.H., Norde W.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1997. V. 190. № 2. P. 437.