

УДК 577.151.01

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА СИЛИКАГЕЛЯХ

А. Л. СИМОНЯН, С. Ш. ТАТИКЯН, Г. Э. ХАЧАТРЯН,
Т. А. ГАСПАРЯН, Г. И. АЙВАЗЯН

Исследована пригодность ряда новых силикагелей для иммобилизации глюкозооксидазы. Сделан вывод о возможности их использования в проточных аналитических системах.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, иммобилизация на силикагелях.

Методы иммобилизации ферментов в последнее время получили широкое распространение в связи с тем, что при иммобилизации существенно повышаются стабильность действия ферментов во времени, термоустойчивость, устойчивость к микробным атакам, появляется возможность их многократного использования [3]. Это практически позволяет использовать ферменты для биологической трансформации одних органических соединений в другие, а также применять их в аналитических системах.

В зависимости от назначения иммобилизованных ферментов к носителям предъявляются те или иные требования. В частности, носители, используемые в проточных аналитических системах, должны обладать следующими свойствами: иметь достаточно развитую поверхность, обладать определенной механической прочностью, быть гидрофильным, устойчивым к разрушению бактериями, в случае пористых носителей поры должны иметь достаточные размеры для обеспечения наиболее эффективного связывания фермента и свободного доступа субстрата к ферменту. Кроме того, существенное значение имеют гидродинамические свойства носителей. Наиболее полно, по-видимому, всем перечисленным требованиям удовлетворяют силикатные носители [2]. Несмотря на большое число работ, посвященных методам иммобилизации широкого набора ферментов на различных носителях [4, 5], выбор оптимальных условий иммобилизации во многом еще остается эмпирическим, а результат труднопредсказуемым. Поэтому при работе как с новым носителем, так и с новым ферментом требуется тщательная отработка всех условий иммобилизации.

Целью настоящей работы явилось исследование оптимальных условий иммобилизации глюкозооксидазы (ГОД) (КФ 1.1.3.4.) для применения в проточной аналитической системе.

Материал и методика. В работе использовались силикагели, разработанные в ЕрОНЕМ ВНИИ ИРЕА. Характеристики использованных носителей приведены в табл. 1. Модификацию носителя осуществляли по методу Робинсона [6]. Навеску силикагеля обрабатывали 5%-ным раствором γ -аминопропилтриэтоксисилана (АГМ-9) в ацетоне. Излишек раствора сливали и силикагель выдерживали в термостате 24 ч при температуре 45°. Затем тщательно отмывали его ацетоном и водой. С целью

активации носителя силикагель обрабатывали 2,5%-ным раствором бифункционального реагента—глутаровым диальдегидом—в течение 45 мин при перемешивании. Несвязавшийся диальдегид отмывали большим количеством дистиллята. Иммунизацию ГОД проводили в 0,01 М фосфатном буфере, рН 6,4, при комнатной температуре. Количество связанного фермента оценивали, измеряя несвязавшийся белок по методу Лоурн. Об активности связанного фермента судили по количеству образовавшейся перекиси водорода, определяемой модифицированным пероксидазным методом [1]. Стабильность иммобилизованного фермента во времени изучали в проточном реакторе с использованием мембранного кислородного электрода Кларка.

Результаты и обсуждение. Существенным фактором при иммобилизации ферментов является количество реакционноспособных групп на поверхности носителя. При модификации силикагеля с помощью АГМ-9 на поверхности носителя образуются аминогруппы. Понятно, что их количество будет существенным образом влиять на процесс иммобилизации. Поэтому количество аминогрупп оценивалось с помощью пиридоксальфосфата (ПЛФ). ПЛФ, образуя Шиффовы основания, эквимольно связывается с аминогруппами на поверхности носителя. Определяя спектрофотометрически убыль ПЛФ в растворе при 387,5 нм, можно оценить количество аминогрупп. Для этого носитель, помещенный в 0,01 М раствор ПЛФ в натрийацетатном буфере с рН 6,5, инкубировали в темноте в течение 2 часов. Наибольшее число аминогрупп было обнаружено на силикагеле № 7 (200 мкмоль на 1 г).

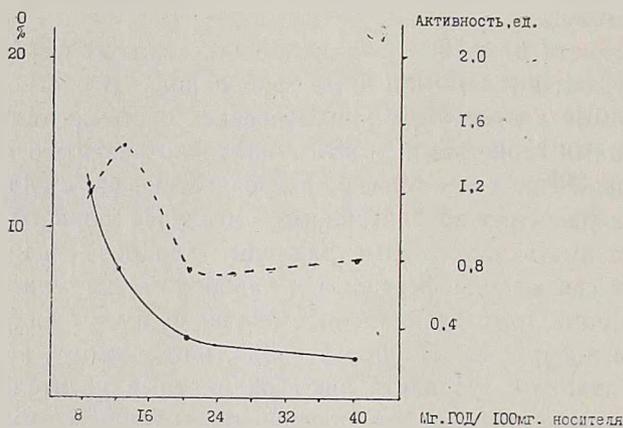


Рис. Активность иммобилизованных препаратов при разных соотношениях фермент/носитель. ——— процент сохранения активности при иммобилизации; - - - активность препаратов на 1 мг носителя.

Для нахождения наилучших условий иммобилизации необходимо было выяснить оптимальное соотношение количества фермента и носителя. Полученные результаты приведены в табл. 2, из которой видно, что при всех соотношениях фермент/носитель ГОД лучше всего связывается с силикагелем № 7, поэтому все дальнейшие исследования проводились с использованием этого силикагеля. Необходимо особо отметить, что при применении иммобилизованного фермента важно не только количество связанного белка, но и высокий процент сохранения активности. На рис. приведены данные, подтверждающие это положение. Видно, что при повышении соотношения фермент/носитель

процент сохранения активности падает, а активность на 1 мг носителя достигает максимума при соотношении 12/100. Поэтому нецелесообразно работать при более высоких соотношениях.

Как уже упоминалось выше, одной из важнейших характеристик работы иммобилизованного фермента является его стабильность во времени. Измерения активности проводились в проточном аналитическом реакторе, причем следует отметить, что исследуемый препарат постоянно хранился при комнатной температуре в рабочем реакторе и ежедневно проводилось в среднем около двадцати измерений различных образцов, содержащих глюкозу. Как показали измерения, 80% активности фермента сохраняется в течение более чем 2-х месяцев, что не уступает результатам работ других авторов [2].

Таблица 1
Основные характеристики силикагелей производства ЕрОНеМ ВНИИ ИРЕА

№ марки	Средний размер пор, А	Удельная поверхность, м ² /г	Плотность, г/см ³
1	1000	72	0, 0
3	450	170	0,22
7	230	320	0,23

Таблица 2
Связывание глюкозооксидазы на силикагелях № 3, 7 при разных соотношениях фермент/носитель, мг/100 мг

№ марки силикагеля	Соотношение Е/носитель	Связывание, %	Количество связанного Е, мг
3	4	37,5	1,5
7	4	62,5	2,5
3	8	55,0	4,4
7	8	70,0	5,5
3	16	25,3	4,2
7	16	53,8	8,6
3	20	27,5	5,5
7	20	59,0	11,6

Таким образом, из приведенных данных видно, что силикагель № 7 обладает достаточно удовлетворительными характеристиками, позволяющими использовать его в качестве носителя в проточных аналитических системах.

Ереванский физический институт ГКИАЭ СССР,
лаборатория радиационной биофизики

Поступило 13.V 1983 г.

ԳԼՅՈՒԿՈՁԱՕՔՍԻԴԱԶՅԻ ԻՄՄՈՒԲԻԼԻԶԱՑԻԱՆ ՍԻԼԻԿԱԳԵԼԵՐԻ ՎՐԱ

Ա. Լ. ՄԻՄՆՅԱՆ, Ս. Շ. ԹԱԹԻՎՅԱՆ, Գ. Է. ԽԱԶԱՏՐՅԱՆ, Տ. Ա. ԳԱՊԱՐՅԱՆ,
Գ. Ի. ԱՅՎԱԶՅԱՆ

Հետազոտված է Երևանի անօրգանական նյութերի բաժնի կողմից մշակված մի շարք նոր սիլիկագելերի պիտանիությունը գլյուկոզօքսիդազայի իմմոբիլիզացիայի համար: Ցույց է տրված, որ №7 սիլիկագելն ըստ իր բնութա-

գրհրի ամենահարմար կրիչն է հոսուն անալիտիկ համակարգերում կիրառման համար: Որոշված է իմմոբիլիզացիայի պայմանների ազդեցությունը պրեպարատի ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ 2 ամսվա ընթացքում պահպանվում է սկզբնական ակտիվության 80%-ը

IMMOBILIZATION OF GLUCOSE OXIDASE ON SILICAGELS

A. L. SIMONIAN, S. Sh. TATIKIAN, G. E. KHACHATRIAN,
T. A. GASPARIAN, G. I. AIVAZIAN

The use of a number of new silicagels developed at the Yerevan Department of Inorganic Materials of the All-Union Institute of Reagents for the immobilization of glucose oxidase has been investigated. It has been shown that the silicagel original preparation (№ 7) is the most convenient carrier for the use in flowing analytical systems. The influence of the immobilization conditions on the preparation activity has been determined. The preparation preserves the 80% of its initial activity for two months.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Достижения в клинической ферментативной диагностике, М., 1977.
2. Жагар Р. А., Карсакевич А. С. Успехи биологической химии. М., 1977.
3. Иммуобилизованные ферменты. М., 1976.
4. Dinnel D. Hindustan Antibiotics Bulletin., 20, 3-4, 1978.
5. Muronetz V. J., Zueva V. S., Nagradova N. K. FEBS Letters, 107, 2, 1979.
6. Robinson P. J., Dinnill P., Lilly M. D. Biochem. Biophys. Acta, 242, 659, 1979.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 7, 1983

УДК 616.45—001.1/3:612.397.2+577.161.3

ПРОЦЕСС ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ И УРОВЕНЬ α -ТОКОФЕРОЛА В ТКАНЯХ БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ АКУСТИЧЕСКОГО СТРЕССА

М. М. МЕЛКОНЯН, В. Г. МХИТАРЯН, Е. А. МЕЛИК-АГАЕВА, А. А. РУХҚЯН

В условиях акустического стресса наблюдается изменение интенсивности ферментативного и неферментативного перекисного окисления липидов и содержания α -токоферола в гомогенатах мозга, печени, сердца, а также в эритроцитарных мембранах и плазме крови белых крыс. Интенсивность сдвигов зависит как от вида исследуемой ткани, так и сроков воздействия. Изменения наиболее выражены в сердце. Наблюдается определенная зависимость между уровнем перекисного окисления липидов и содержанием α -токоферола в исследуемых тканях.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, α -токоферол, акустический стресс.

В эпоху научно-технической революции, которую переживает человечество, трудно переоценить влияние шума, сопровождающего человека повсеместно.