

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТОДОМ КР-СПЕКТРОСКОПИИ СКОРОСТИ КАТАЛИЗИРУЕМЫХ α -ХИМОТРИПСИНОМ РЕАКЦИЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ И pH

И. А. Балахнина, Н. Н. Брандт, А. А. Манькова, А. Ю. Чикишев, И. Г. Шпаченко*

УДК 535.375.5:577.151

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
119991, Москва, Россия; e-mail: shpachenko@physics.msu.ru

(Поступила 20 мая 2020)

Спектроскопия спонтанного комбинационного рассеяния используется для измерения скоростных характеристик ферментативной реакции. Проанализированы временные зависимости интегральных интенсивностей КР-линий в спектрах реакционных смесей. Определена скорость катализируемой α -химотрипсином реакции при разных температурах и pH.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния света, скорость ферментативной реакции, ферментативная кинетика, активность.

Spontaneous Raman spectroscopy is used to determine rates of an enzymatic reaction. Time dependences of integral Raman intensities in the spectra of reaction mixtures are analyzed. The rates of α -chymotrypsin-catalyzed reaction are determined at different temperatures and pH values.

Keywords: Raman spectroscopy, enzymatic reaction rate, enzyme kinetics, activity.

Введение. Существует несколько высокочувствительных и специфических методов, позволяющих исследовать химические реакции, в том числе катализируемые ферментами [1—3]. Фотометрические методы применяются для определения активности ферментов [4] и изучения кинетики ферментативных реакций [5, 6]. Изменения естественной флуоресценции ферментов или флуоресценция маркеров, связанных с субстратами или ферментами, используются при флуориметрическом исследовании ферментативного катализа [7—10]. С помощью методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии можно непрерывно отслеживать либо исчезновение субстрата, либо появление продукта [11]. Когда эти методы не применимы, используются различные химические методы, в частности изотермическое калориметрическое титрование [12]. Реакции превращения оптически неактивных лигандов в оптически активные структуры за счет взаимодействия с белковыми молекулами исследуются с помощью спектроскопии оптической активности и кругового дихроизма [13, 14]. Каждый метод эффективен при измерении концентрации компонента реакции, обладающего определенными (оптическими) свойствами. Универсальные методы измерения концентрации произвольного компонента реакции в литературе не описаны.

Методы колебательной спектроскопии являются незаменимыми инструментами в задачах исследования молекулярной структуры и идентификации веществ. Исследуемые образцы при этом могут находиться в любом агрегатном состоянии при любых температурах и pH. Анализ области “отпечатков пальцев” в КР-спектрах позволяет однозначно идентифицировать конкретные соединения и характеризовать структуры белков, липидов, углеводов и других классов молекул. В связи с этим КР-спектроскопия служит перспективным инструментом для измерения скоростей химических реакций [15]. ИК-спектроскопия, в частности ИК-Фурье-спектроскопия, является высокочувствительным

DETERMINATION OF RATES OF α -CHYMOTRYPSIN-CATALYZED REACTIONS AT DIFFERENT TEMPERATURES AND pH BY RAMAN SPECTROSCOPY

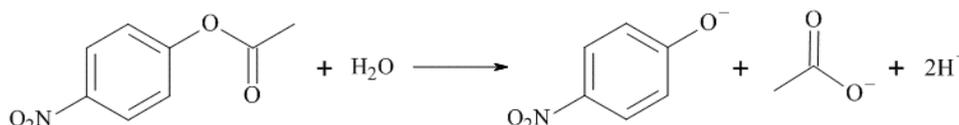
I. A. Balakhnina, N. N. Brandt, A. A. Mankova, A. Yu. Chikishev, I. G. Shpachenko* (Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; e-mail: shpachenko@physics.msu.ru)

методом исследования различных веществ с определением абсолютных концентраций. Поскольку для большинства ферментов нативной является водная среда, то реализация ИК-спектроскопии в конфигурации “на пропускание” затруднительна и необходимой становится конфигурация нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Такие эксперименты могут содержать ошибки, связанные с испарением компонентов раствора, молекулярным осаждением и специфическим взаимодействием с поверхностью кристалла НПВО [16]. КР-спектроскопия лишена таких недостатков, но имеет худшую чувствительность и требует дополнительной калибровки для преобразования относительных интенсивностей линий в абсолютные концентрации компонентов. Несмотря на это и в силу отсутствия особых требований к исследуемым образцам, КР-спектроскопию можно использовать для определения любого субстрата в смеси и, следовательно, для анализа любой ферментативной реакции. Это позволяет изучать ферментативный гидролиз различных, в том числе неспецифических, субстратов.

О применении метода КР-спектроскопии для непрерывного наблюдения изменений молекулярной структуры веществ, в том числе вызванных химическими превращениями, упоминалось в [17—19], для определения скоростей реакций без участия ферментов — в [15, 20]. Анализ данных [3, 21] показывает, что методы КР-спектроскопии применялись для исследования ферментативных реакций только в работе [22], где продемонстрирована возможность использования КР-спектроскопии для определения скоростей ферментативных реакций на примере реакции гидролиза 2,4-динитрофенилацетата в присутствии α -химотрипсина. Однако гидролиз с 2,4-динитрофенилацетатом упоминается в литературе редко, в отличие от другого хромофорного субстрата 4-(*n*-)нитрофенилацетата. Его гидролиз в присутствии α -химотрипсина хорошо изучен, поэтому имеющееся многообразие экспериментальных данных позволяет провести дополнительную верификацию метода, основанного на КР-спектроскопии.

Цель настоящей работы — подтверждение возможности использования КР-спектроскопии для исследования активности фермента с применением субстрата 4-нитрофенилацетата, а также определение активности α -химотрипсина при различных температурах и pH.

Эксперимент. Рассмотрим спонтанный и катализируемый ферментом α -химотрипсином гидролиз 4-нитрофенилацетата ($C_8H_7NO_4$, НФА). Продуктами гидролиза НФА являются 4-нитрофенол ($C_6H_5NO_3$, НФ) и уксусная кислота ($C_2H_4O_2$):



В случае спонтанного гидролиза концентрация продукта определяется выражением:

$$[P] = [S]_0 (1 - e^{-k_0 t}), \quad (1)$$

где $[S]_0$ — начальная концентрация субстрата; k_0 — константа скорости спонтанного процесса.

Когда катализируемый α -химотрипсином гидролиз протекает при концентрации субстрата, значительно превышающей концентрацию фермента, концентрация образовавшегося продукта на соответствующем временном интервале описывается уравнением [23]:

$$[P] = At + B(1 - e^{-bt}). \quad (2)$$

Если начальная концентрация субстрата $[S]_0$ значительно превышает константу Михаэлиса $K_{m(\text{app})}$ и для констант k_2 и k_3 справедливо $k_3 \ll k_2$ [24], что обычно имеет место в катализируемом α -химотрипсином гидролизе НФА, то $A = k_{\text{cat}}[E]_0$, $B = [E]_0$. Здесь k_2 — константа скорости ацилирования фермента; k_3 — константа скорости деацилирования ацилфермента; k_{cat} — каталитическая константа, являющаяся комбинацией констант k_2 и k_3 ; $[E]_0$ — концентрация активных молекул фермента (может отличаться от концентрации фермента в экспериментальном растворе); константа b — комбинация кинетических констант многоступенчатого каталитического процесса [23, 24]:

$$b = \frac{k_2[S]_0}{K_S + [S]_0}, \quad (3)$$

где K_S — константа диссоциации/связывания для фермент-субстратного комплекса.

Начальный участок кинетической кривой (начальный выброс продукта) для НФА длится несколько секунд [23] и описывается вторым членом уравнения (2). Затем продукт образуется стационарно и зависимость его концентрации от времени может быть представлена линейной функцией:

$$[P] = At + B. \quad (4)$$

В экспериментах использованы фосфатные буферные растворы с рН 6.5 и 7.8, а также кристаллический α -химотрипсин (Sigma C4129, лот № SLBV2540). Порошок НФА синтезирован по методике, аналогичной [25, 26]. Для инициации спонтанного гидролиза 20-мМ раствор НФА в ацетонитриле (ИРЕА) добавляли к буферу. При этом начальная концентрация НФА в ацетонитрил-буферном растворе составляла 500 мкМ. Для ферментативного гидролиза 20 мМ раствор НФА в ацетонитриле добавляли к раствору α -химотрипсина в буфере (1.3 мг/мл) для достижения концентраций НФА и химотрипсина 500 и 50 мкМ. Константы для катализируемого химотрипсином гидролиза НФА при используемых рН [23] таковы, что при выбранной концентрации субстрата $K_{m(\text{app})} \ll [S]_0$, из аппроксимации уравнением (4) следует $k_{\text{cat}} \approx k_3$.

Спектры КР измерены с помощью многофункционального лазерного КР-спектрометра [27] с $\lambda_{\text{возб}} = 532$ нм (непрерывный твердотельный лазер с диодной накачкой Coherent Verdi-V5) и спектральным разрешением 2 см^{-1} . Мощность возбуждения на образце <1 Вт, соответствующая интенсивность $<100 \text{ кВт/см}^2$. Компоненты добавлялись в кварцевую кювету и перемешивались. Измерения спектров начинались через 10—15 с после смешивания и проводились непрерывно в течение 30—60 мин с временным шагом 4—6 с. Для контроля температуры использован циркуляционный термостат LOIP LT-108 (точность $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$). Температура в кювете $15\text{—}30 \text{ }^\circ\text{C}$. Результаты [27—30] показывают, что измерения КР-спектров белковых растворов даже при существенно более высоких концентрациях при указанных средних мощностях и плотностях мощности не вызывают изменений структуры белка. Измерения оптической плотности на $\lambda = 532$ нм дают оценку нагрева растворов НФА/НФ на $<1 \text{ }^\circ\text{C}$ [27].

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показана серия КР-спектров реакционной смеси, исходными компонентами которой являются буферный раствор химотрипсина и раствор НФА в ацетонитриле. Возрастающие по интенсивности спектральные линии (отмечены стрелками) на частотах 855, 1114, 1170, 1290 и 1339 см^{-1} соответствуют продукту реакции (НФ). В спектре отсутствуют линии второго продукта ацетат-иона, которые не перекрываются с линиями других компонентов реакции. При этом КР-линии ацетонитрила (923 и 1372 см^{-1}) и фосфатного буфера (987 и 1640 см^{-1}) остаются неизменными, а линии α -химотрипсина не наблюдаются из-за его низкой концентрации. Построение кинетических кривых для субстрата НФА затруднено в силу низкой интенсивности линий и их перекрывания с растущими линиями продукта.

$I_{\text{КР}}$, отн. ед.

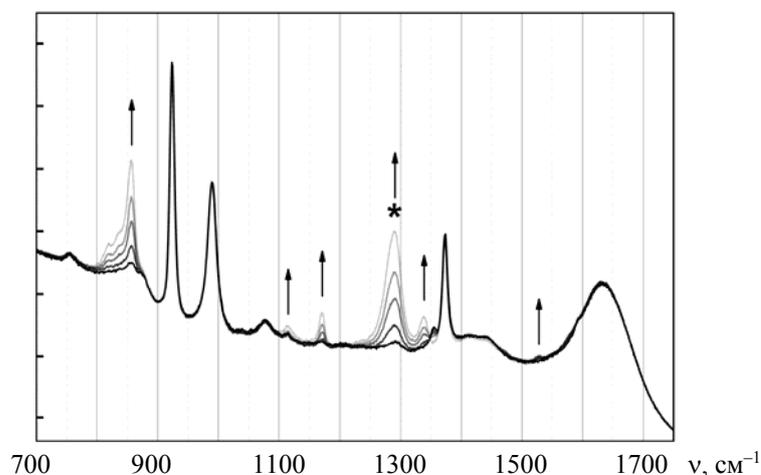


Рис. 1. КР-спектры гидролиза НФА, катализируемого α -химотрипсином, измеренные через 0.3, 6.5, 16, 27 и 60 мин после начала реакции при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ и рН 7.8

Получение кинетик на основе интегрального сигнала всех возрастающих линий продукта затруднительно. Линия 855 см^{-1} перекрывается с линиями буфера, 1339 см^{-1} — с убывающей линией субстрата 1354 см^{-1} . Линия на частоте 1114 см^{-1} имеет крайне низкую интенсивность, что также затрудняет ее дальнейший анализ. Поэтому кинетические кривые рассматриваемой реакции целесообразно строить для линий 1170 и 1290 см^{-1} .

Рассмотрим КР-линию продукта НФ на частоте 1290 см^{-1} и опишем процедуру обработки КР-спектров, позволяющую на основе качественных спектральных данных получить кинетическую кривую в единицах концентрации. Присутствующая в спектре медленно изменяющаяся фоновая составляющая устраняется из КР-спектров в интервале $1280\text{—}1299\text{ см}^{-1}$ с помощью двойного дифференцирования. После этого и сглаживания методом Савицкого—Голя спектральные кривые усредняются по нескольким реализациям и нормируются на время накопления и мощность лазерного излучения. Для проведения нормировки измеряются и аналогично обрабатываются спектры продуктов в концентрациях, которые ожидаются после полного протекания реакции. В результате получают коэффициенты, позволяющие преобразовать относительные интегральные интенсивности КР-сигнала в интервале $1280\text{—}1299\text{ см}^{-1}$ в абсолютные концентрации веществ в смеси. Полученные кинетические кривые приводятся как зависимости концентраций компонентов от времени.

На рис. 2 показаны кинетики концентрации НФ для спонтанного и ферментативного гидролиза НФА в присутствии α -химотрипсина. Аппроксимация кинетики спонтанной реакции показывает, что при $25\text{ }^\circ\text{C}$ и $\text{pH } 7.8$ скоростная константа $k_0 = (2.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-5}\text{ с}^{-1}$. Аппроксимация кинетики ферментативного гидролиза уравнением (4) дает $k_{\text{cat}} = (5.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}\text{ с}^{-1}$. Результаты согласуются с данными [23, 31—33]. Оценки показывают, что вклад спонтанного процесса в ферментативную кинетику в рассматриваемом случае незначителен и не приводит к выходу скоростных констант за пределы указанных доверительных интервалов. Концентрация активных молекул α -химотрипсина $[E]_0 = 31.5 \pm 0.7\text{ мкМ}$, что составляет 63 %.

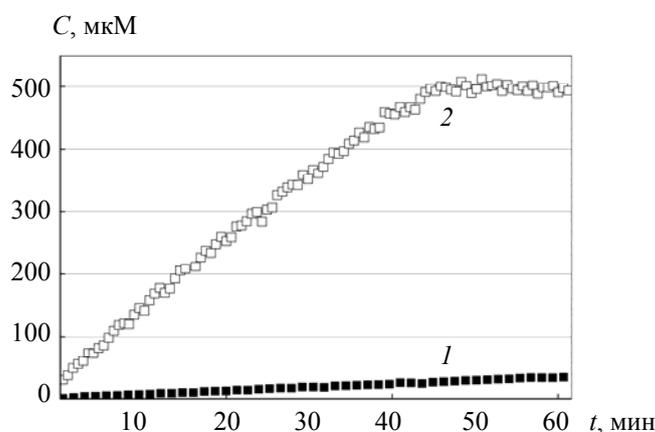


Рис. 2. Временные зависимости концентрации НФ для спонтанного (1) и катализируемого α -химотрипсином (2) гидролиза НФА при температуре $25\text{ }^\circ\text{C}$ и $\text{pH } 7.8$

Результаты аппроксимации кинетических кривых, полученных для двух КР-линий продукта НФ на частотах 1170 и 1290 см^{-1} в интервалах $1164\text{—}1175\text{ см}^{-1}$ и $1280\text{—}1299\text{ см}^{-1}$, дают скоростные константы, различающиеся на $<7\%$. Это указывает на возможность применения КР-спектроскопии для одновременного получения нескольких кинетических кривых, совместный анализ которых может повышать точность результатов.

На рис. 3 показаны кинетики концентрации НФ для ферментативного гидролиза НФА при разных температурах. Каждая кривая имеет стадию линейного увеличения концентрации продукта, а кинетики при температурах 25 и $30\text{ }^\circ\text{C}$ выходят на насыщение. Аппроксимация линейного участка кинетик с помощью уравнения (4) дает значения скоростных констант, хорошо согласующиеся с результатами [23, 34, 35]: при $T = 15, 20, 25$ и $30\text{ }^\circ\text{C}$ $k_{\text{cat}} = (3.3 \pm 0.2), (4.3 \pm 0.3), (5.9 \pm 0.2)$ и $(14.1 \pm 0.8) \cdot 10^3\text{ с}^{-1}$.

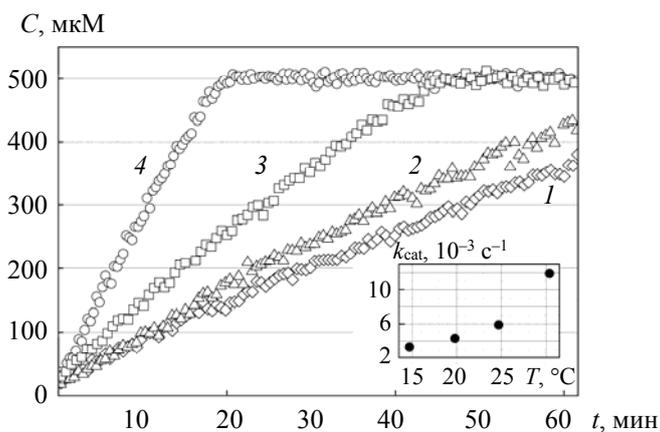


Рис. 3. Временные зависимости концентрации НФ для гидролиза НФА, катализируемого α -химотрипсином, при температурах 15 (1), 20 (2), 25 (3) и 30 °С (4) и pH 7.8; на вставке — константы скорости, полученные в результате аппроксимации кинетик

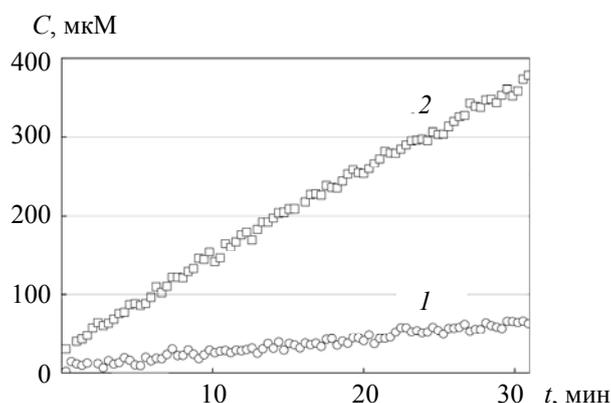


Рис. 4. Временные зависимости концентрации НФ для гидролиза НФА, катализируемого α -химотрипсином, при pH 6.5 (1) и 7.8 (2) и температуре 25 °С

На рис. 4 показаны начальные участки кинетик ферментативного гидролиза НФА в присутствии α -химотрипсина при температуре 25 °С и pH 7.8 и 6.5. При сдвиге pH от физиологического значения в кислотную область снижается функциональная активность α -химотрипсина [2]. Аппроксимация кинетик уравнением (4) дает константы $k_{\text{cat}} = (1.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $(5.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ при pH 6.5 и 7.8, что согласуется с полученными для нитрофенильных субстратов [23, 36].

Заключение. Продемонстрирована возможность применения КР-спектроскопии для исследования активности фермента α -химотрипсина с использованием субстрата 4-нитрофенилацетата. С учетом полученных ранее результатов [22] подтверждена возможность использования КР-спектроскопии для исследования активности фермента с применением разных субстратов. Сопоставление скоростных констант, полученных в экспериментах, проведенных при различных температурах и pH, с имеющимися данными подтверждает корректность методики обработки данных КР-спектроскопии, предложенной для получения кинетических кривых. Результаты аппроксимации кинетик для двух КР-линий продукта дают совпадающие значения констант, что подтверждает возможность использования метода КР-спектроскопии для одновременного исследования нескольких кинетических кривых с целью повышения точности результатов.

Авторы работы выражают благодарность И. К. Сакодынской за полезные обсуждения полученных результатов.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, а также при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-32-00655 и № 20-02-00932).

- [1] **H. Bisswanger**. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co (2017)
- [2] **H. Bisswanger**. *Perspectives in Science*, **1** (2014) 41—55
- [3] **D. L. Purich**. *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control*, Boston, Elsevier (2010)
- [4] **H. U. Bergmeyer**. *Methods of Enzymatic Analysis*, USA, Academic Press (1974)
- [5] **J. Cielecka-Piontek**. *Appl. Spectrosc.*, **67**, N 7 (2013) 703—708
- [6] **F. Mirazizi, A. Bahrami, K. Haghbeen, H. Shahbani Zahiri, M. Bakavoli, R. L. Legge**. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **31**, N 6 (2016) 1162—1169
- [7] **B. Tang, F. Han, L. Ma**. *Chin. J. Anal. Chem.*, **29**, N 3 (2001) 347—354
- [8] **U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwille, M. Eigen**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, N 4 (1998) 1416—1420
- [9] **Y. C. Tsai, Z. Jin, K. A. Johnson**. *Anal. Biochem.*, **384**, N 1 (2009) 136—144
- [10] **E. Navarro-Perán, J. Cabezas-Herrera, A. N. P. Hiner, T. Sadunishvili, F. García-Cánovas, J. N. Rodríguez-López**. *Biochemistry*, **44**, N 20 (2005) 7512—7525
- [11] **T. K. Harris, M. M. Keshwani**. *Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology* Eds. R. R. Burgess, M. P. Deutscher, **463**, Academic Press, USA (2009) 57—71
- [12] **C. Aguirre, I. Condado-Morales, L. F. Olguin, M. Costas**. *Anal. Biochem.*, **479**, N 15 (2015) 18—27
- [13] **M. Noda, Y. Matoba, T. Kumagai, M. Sugiyama**. *Biochem. J.*, **389** (2005) 491—496
- [14] **F. Zsila**. *J. Phys. Chem. B*, **117**, N 37 (2013) 10798—10806
- [15] **И. А. Балахнина, Н. Н. Брандт, А. А. Манькова, А. Ю. Чикишев, И. Г. Шпаченко**. *Журн. прикл. спектр.*, **84**, № 4 (2017) 628—634 [**I. A. Balakhnina, N. N. Brandt, A. A. Mankova, A. Yu. Chikishev, I. G. Shpachenko**. *J. Appl. Spectr.*, **84**, N 4 (2017) 650—656]
- [16] **И. Г. Шпаченко, Н. Н. Брандт, А. Ю. Чикишев**. *Вестн. МГУ. Физика. Астрономия*, № 6 (2018) 67—73 [**I. G. Shpachenko, N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev**. *Mosc. Univ. Phys. Bull.*, **73**, N 6 (2018) 644—650]
- [17] **N. Brun, I. Youssef, M.-C. Chevrel, D. Chapron, C. Schrauwen, S. Hoppe, P. Bourson, A. Durand**. *J. Raman Spectrosc.*, **44**, N 6 (2013) 909—915
- [18] **I. Csontos, H. Pataki, A. Farkas, H. Bata, B. Vajna, Z. K. Nagy, G. Keglevich, G. J. Marosi**. *Org. Process Res. Dev.*, **19**, N 1 (2015) 189—195
- [19] **D. Šahnić, E. Meštrović, T. Jednačak, I. Habinovec, J. Parlov Vuković, P. Novak**. *Org. Process Res. Dev.*, **20**, N 12 (2016) 2092—2099
- [20] **M. Assirelli, W. Xu, W. Chew**. *Org. Process Res. Dev.*, **15**, N 3 (2011) 610—621
- [21] **Y. Ou, R. E. Wilson, S. G. Weber**. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **11**, N 1 (2018) 509—533
- [22] **I. A. Balakhnina, N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev, A. A. Mankova, I. G. Shpachenko**. *Vib. Spectrosc.*, **106** (2020) 103004
- [23] **F. J. Kezdy, M. L. Bender**. *Biochemistry*, **1**, N 6 (1962) 1097—1106
- [24] **M. L. Bender, F. J. Kezdy, F. C. Wedler**. *J. Chem. Educ.*, **44**, N 2 (1967) 84—88
- [25] **S. Z. Vatsadze, A. V. Medved'ko, S. A. Kurseev, O. I. Pokrovskiy, O. O. Parenago, M. O. Kostenko, I. V. Ananyev, K. A. Lyssenko, D. A. Lemenovsky, G. M. Kazankov, V. V. Lunin**. *Organometallics*, **36** (2017) 3068—3075
- [26] **S. Vatsadze, A. Medved'ko, G. Kazankov, S. Kurseev**. *ChemSpider SyntheticPages*, **705**, <http://cssp.chemspider.com>
- [27] **N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev**. *Laser. Phys.*, **12** (2002) 647—652
- [28] **N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev, A. I. Sotnikov, Yu. A. Savochkina, I. I. Agapov, A. G. Tonevitsky**. *J. Mol. Struct.*, **735-736** (2005) 293—298
- [29] **N. N. Brandt, A. Yu. Chikishev, V. N. Kruzhilin**. *Vib. Spectrosc.*, **89** (2017) 75—80
- [30] **N. N. Brandt, O. O. Brovko, A. Yu. Chikishev, O. D. Paraschuk**. *Appl. Spectrosc.*, **60** (2006) 288—293
- [31] **H. J. Goren, M. Fridkin**. *Eur. J. Biochem.*, **41**, N 2 (1974) 263—272
- [32] **H. Gutfreund, J. M. Sturtevant**. *Biochem. J.*, **63**, N 4 (1956) 656—661
- [33] **K. K. Ghosh, S. K. Verma**. *Indian J. Biochem. Bio.*, **45**, N 5 (2008) 350—353
- [34] **P. A. Adams, E. R. Swart**. *Biochem. J.*, **161** (1977) 83—92
- [35] **S. Verma**. *Indian J. Chem. A*, **49** (2010) 1041—1046
- [36] **M. L. Bender, G. R. Schonbaum, B. Zerner**. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, N 13 (1962) 2562—2570