



УДК 577.152.344'107:543.554

ВЫДЕЛЕНИЕ ТРИПСИНОПОДОБНОГО ФЕРМЕНТА  
ИЗ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА  
*ACREMONIUM SPECIUS* МЕТОДОМ ЛИГАНДООБМЕННОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ

Березин Б. Б., Ямсков И. А., Даванков В. А.

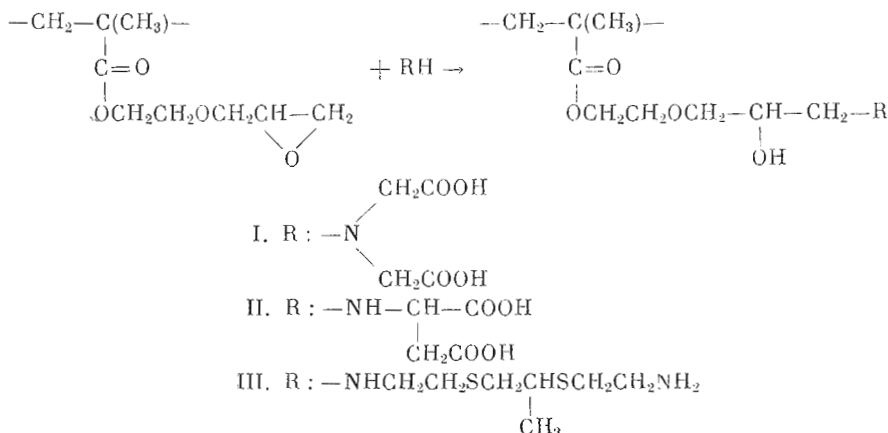
Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова  
Академии наук СССР, Москва

На основе метакрилатного сополимера сепарона синтезированы сорбенты, содержащие группировки 1,8-диамино-4-метил-3,6-дигидрооктана, иминодиуксусной и аспарагиновой кислот. Сорбенты, заряженные ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , использованы для хроматографического выделения трипсиноподобного фермента из протеолитического комплекса *Acremonium specius*. В результате однократной хроматографии протеолитического комплекса на колонке, заполненной сорбентом, содержащим DADT в медной форме, получен однородный, по данным электрофореза в ПААГ, препарат фермента.

Лигандообменная хроматография белков за 10 лет, прошедших после опубликования в 1975 г. первой работы Пората [1], зарекомендовала себя эффективным методом не только выделения и фракционирования белков [2—4], но и изучения топографии поверхности их молекул [5].

В данной работе сообщается о синтезе на основе метакрилатного сополимера сепарона ряда сорбентов для ЛОХ белков и их использовании для выделения трипсиноподобного фермента из протеолитического комплекса *Acremonium specius*.

Сорбенты получены взаимодействием эпоксиактивированного сепарона с соответствующими лигандами:



Одним из основных требований к методам выделения и очистки ферментов является максимальное сохранение их активности. Метод ЛОХ предусматривает наличие в хроматографической системе комплексообразующих ионов металла, которые в общем случае могут оказывать существенное влияние на свойства ферментов [6]. Поэтому для выбора условий разделения необходимо было оценить влияние природы иона металла и величины pH на активность трипсиноподобного фермента.

Сокращения: ЛОХ — лигандообменная хроматография; DADT — 1,8-диамино-4-метил-3,6-дигидрооктан.

Влияние ионов металла на активность трипсиноподобного фермента по бензоиларгинин-*n*-нитроанилиду  
Концентрация: фермента — 3 мг/мл, ионов металла — 0,01 М; рН 8,2

Me <sup>2+</sup>	Активность, %	Me <sup>2+</sup>	Активность, %
Без металла	100	Cu <sup>2+</sup>	100
Ca <sup>2+</sup>	190	Ni <sup>2+</sup>	100
Co <sup>2+</sup>	150	Zn <sup>2+</sup>	100

Таблица 2

Результаты хроматографического выделения трипсиноподобного фермента из протеолитического комплекса *Acremonium species* на сорбенте III

Me <sup>2+</sup>	Степень увеличения удельной активности	Активность, %
Без металла	2,4	98
Zn <sup>2+</sup>	2,5	100
Ni <sup>2+</sup>	3,3	95
Cu <sup>2+</sup>	10,6	100

При инкубации в растворах соответствующих солей активирующее влияние на фермент оказывают ионы кальция и кобальта (табл. 1). Ионы меди, никеля и цинка на активность не влияют, и, следовательно, по увеличению удельной активности в элюате в данном случае можно судить о получении более чистого ферментного препарата, поэтому использование этих ионов для ЛОХ казалось нам предпочтительным. Было также проверено влияние на активность фермента рН среды в пределах рН, обычно используемых для ЛОХ белков. При инкубации в буферах рН 10,2; 8,2; 5,9 и 4,0 активность сохранялась соответственно на 90, 100, 100 и 80%. Таким образом, использование элюентов с рН 5,9—8,2 не должно приводить к инактивации фермента. Сорбенты заряжали ионами металлов, пропуская 0,1 М раствор соли соответствующего металла через колонку, заполненную сорбентом.

При хроматографии протеолитического комплекса на колонке с сорбентом I без металла, а также заряженным ионами Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> или Zn<sup>2+</sup>, разделения белков не наблюдалось: смесь выходила одним пиком в объеме, близком к свободному объему колонки.

При использовании сорбента II максимальное увеличение удельной активности трипсиноподобного фермента составило 1,7 раза (сорбент заряжен медью).

Наиболее эффективным сорбентом для выделения трипсиноподобного фермента из протеолитического комплекса оказался сорбент III с группировками 1,8-диамино-4-метил-3,6-дитиаоктана. Этот сорбент является слабым анионообменником. Он удерживает компоненты протеолитического комплекса как в присутствии переходных ионов металлов, так и без них.

Достижимая степень очистки фермента зависит от природы металла-комплексообразователя и при сохранении общей активности увеличивается в ряду без Me<sup>2+</sup> < Zn<sup>2+</sup> < Ni<sup>2+</sup> < Cu<sup>2+</sup> (табл. 2). При использовании сорбента III в режиме ионообменной хроматографии (без металла) разделение компонентов протеолитического комплекса достигается ступенчатым увеличением концентрации NaCl в 0,01 М трис-НСl-буфере (рН 8,2) от 0 до 0,5 М (рис. 1). Фракция, обладающая удельной триптической активностью, в 2,4 раза превышающей исходную, элюировалась при содержании в элюате 0,1 М NaCl. Применив при хроматографии в режиме ЛОХ (зарядка медью) ступенчатое элюирование со снижением рН от 8,2 до 5,9

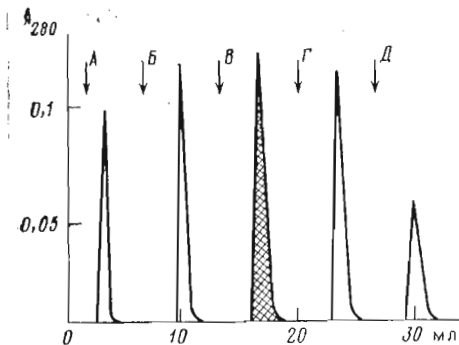


Рис. 1

Рис. 1. Хроматографии протеолитического комплекса на сорбенте III без металла с элюцией последовательно: А: 0,01 М трис-НCl, pH 8,2; Б: А + 0,05 М NaCl; В: А + 0,1 М NaCl; Г: А + 0,25 М NaCl; Д: А + 0,5 М NaCl. Заштрихована фракция, обладающая триглицерической активностью

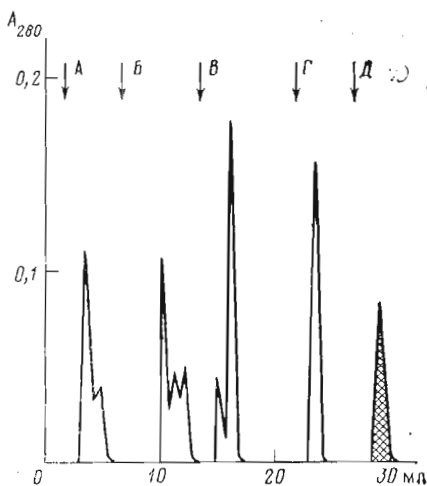


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография протеолитического комплекса на сорбенте III в  $\text{Cu}^{2+}$ -форме. Элюенты: А: 0,01 М трис-НCl, pH 8,2; Б: 0,01 М ацетатный буфер, pH 5,9; В: Б + 0,05 М NaCl; Г: Б + 0,1 М NaCl; Д: Б + 0,25 М NaCl; Е: Б + 0,5 М NaCl. Заштрихована фракция, обладающая триглицерической активностью

и затем увеличением концентрации NaCl от 0 до 0,25 М (рис. 2), нам удалось получить фракцию с удельной активностью, в 10,6 раза превышающей исходную.

Исходный протеолитический комплекс и активная фракция, полученная на сорбенте III в  $\text{Cu}^{2+}$ -форме, были охарактеризованы электрофорезом в ПААГ. Как видно из рис. 3а, исходный протеолитический комплекс содержит не менее 11 компонентов. Однократная хроматография протеолитического комплекса на сорбенте III в  $\text{Cu}^{2+}$ -форме позволяет получить практически гомогенный препарат фермента с удельной активностью, в 10,6 раза превышающей исходную при полном сохранении общей активности.

Сорбент III, содержащий диаминодитиаоктановые группировки, оказался значительно более эффективным для решения поставленной задачи, чем сорбент I, содержащий широко используемую для целей ЛЮХ белков и ферментов иминодиуксуную кислоту. Это свидетельствует о чрезвычайно важной роли природы стационарного лиганда в процессах лигандообменного разделения белков и ферментов.

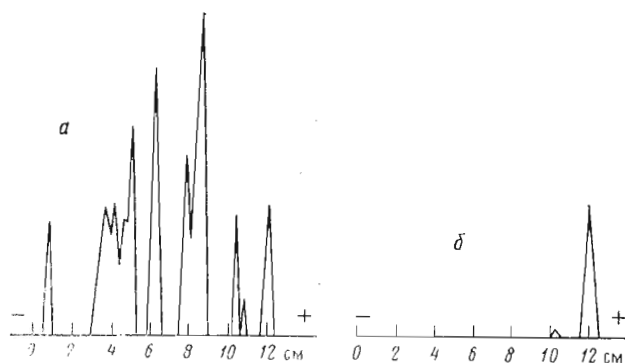


Рис. 3. Результаты электрофореза в ПААГ (условия — см. «Экспер. часть») исходного протеолитического комплекса (а), активной фракции, полученной при хроматографии на сорбенте III в  $\text{Cu}^{2+}$ -форме (б)

## Экспериментальная часть

Для синтеза сорбентов использовали сепарон Н 1000 (ЧССР) (10—14 мкм), содержащий 1,5 ммоль эпоксидных групп на 1 г сухого вещества.

Диметилвые эфиры иминодиуксусной и аспарагиновой кислот получали реакцией соответствующих кислот (1 моль) с метанолом в присутствии 1,2 моль  $\text{SOCl}_2$ .

Сорбенты I и II получали реакцией сепарона Н 1000 (1 моль эпоксидных групп) с диметилвыми эфирами иминодиуксусной кислоты и Asp (1,2 моль) в метаноле при 60° С с 1,2 моль триэтиламина в качестве катализатора. Время реакции 10 ч. Гидролиз сложноэфирных групп проводили 0,05 М NaOH. Содержание фиксированных группировок составило для сорбента I 1,2 ммоль/г, для сорбента II — 0,9 ммоль/г.

1,8-Диамино-4-метил-3,6-дитиаоктан получали реакцией 1,2-димер-каптопропана (1 моль) с  $\beta$ -бромэтилфталимидом (2 моль) с последующим отщеплением фталильных групп по методу [7].

Сорбент III получали реакцией сепарона (1 моль эпоксидных групп) с DADT (1,2 моль) в фосфатном буфере (рН 9,5) при 40° С в течение 15 ч. Сорбент содержал 0,3 ммоль/г фиксированных групп.

Сорбенты заряжали ионами металлов, пропуская через колонку объемом 0,4 см<sup>3</sup> 1 мл 0,1 М раствора соли соответствующего металла. Для определения степени зарядки колонку промывали 0,05 М HCl. Количество металла в растворе определяли комплексометрическим титрованием EDTA в присутствии мурексида [8]. Степень зарядки металлом составила ~30% от теоретического количества.

Протеолитический комплекс *A. specius* получен из Института биохимии АН УССР (Киев). Содержание белка 35%. Активность 0,1 ед. акт./мг белка.

Концентрацию белка определяли методом Лоури [9], триптическую активность — по гидролизу *n*-нитроанилида бензоиларгинина (рН 8,2; 20° С) спектрофотометрически при 405 нм.

*Влияние рН среды на стабильность фермента.* Раствор фермента (0,5 мг белка/мл) инкубировали в течение 2 сут при 20° С в 0,01 М буферном растворе, рН 10,2 (диэтаноламин — HCl), 8,2 (трис-HCl), 5,9 и 4,0 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ — $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), доводили рН до 8,2 и определяли активность фермента. Активность пробы с рН 8,2 принимали за 100%.

*Влияние ионов металла на активность фермента по n-нитроанилиду бензоиларгинина* определяли, выдерживая фермент (концентрация 3 мг/мл) в 0,01 М трис-HCl-буфере (рН 8,2), содержащем соответствующий хлорид металла в концентрации 0,01 М. Время инкубации 2 ч, температура 20° С.

*Электрофорез* проводили в 9,6% ПААГ на пластинах при рН 8,6. Белковые зоны окрашивали красителем СВВ-R-250 (Serva, ФРГ) и сканировали на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) при 750 нм\*.

*Хроматография.* Для хроматографии использовали стеклянную колонку (120 × 2 мм), содержащую ~0,2 г сухого сорбента. Колонку уравновешивали 0,01 М трис-HCl-буфером (рН 8,2). Протеолитический комплекс наносили на колонку в виде раствора в исходном буфере (концентрация 100 мг/мл). Загрузка — 1 мг белка. В качестве элюентов были использованы 0,01 М трис-HCl (рН 8,2) и 0,01 М  $\text{CH}_3\text{COONa}$ — $\text{CH}_3\text{COOH}$  (рН 5,9) с соответствующим содержанием NaCl. Скорость элюирования 10 мл/ч. Поглощение измеряли на УФ-детекторе Altex-150 при 280 нм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. Nature, 1975, v. 258, № 5536, p. 598—599.
2. Lonnerdal B., Carlsson J., Porath J. FEBS Lett., 1976, v. 75, № 1, p. 89—94.
3. Porath J., Olin B. Biochemistry, 1983, v. 22, № 7, p. 1621—1630.

\* Эксперименты выполнены В. Е. Тихоновым (ИНЭОС АН СССР).

4. Варламов В. П., Лопатин С. А., Рогожин С. В. Биоорганич. химия, 1984, т. 10, № 7, с. 927—934.
5. Sulkowski E., Vastole K., Oleszeck D., Munchhausen W. In: Affinity chromatography and related techniques/Ed. Gribnau T. Amsterdam, 1982, p. 313—315.
6. Неорганическая биохимия/Ред. Эйхгорн Г. М.: Мир, 1978.
7. Dwyer F., Lions F. J. Amer. Chem. Soc., 1947, v. 69, № 11, p. 2917—2923.
8. Шварценбах Г. Комплексометрия. М.: Госхимиздат, 1958, с. 107.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265—275.

Поступила в редакцию  
10.X.1985

## ISOLATION OF TRYPSIN-LIKE ENZYME FROM THE PROTEOLYTIC COMPLEX *ACREMONIUM SPECIUS* BY LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY METHOD

BEREZIN B. B., YAMSKOV I. A., DAVANKOV V. A.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo Element Compounds,  
Academy of Sciences of USSR, Moscow*

The sorbents based on the methacrylate copolymer Separon with polyfunctional groupings of 1,8-diamino-4-methyl-3,6-dithiaoctane, iminodiacetic and aspartic acids were prepared. The sorbents were charged with  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  ions and used for isolation of a trypsin-like enzyme from the proteolytic complex *Acremonium specius* by ligand-exchange chromatography. The sorbent with 1,8-diamino-4-methyl-3,6-dithiaoctane groupings was found to be the most efficient for isolating the aforementioned enzyme.