



УДК 577.156.07

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРОТЕИНАЗ НА СОРБЕНТАХ,  
СОДЕРЖАЩИХ БАЦИТРАЦИН В КАЧЕСТВЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО  
ЛИГАНДА

*Степанов В. М., Руденская Г. Н., Янонис В. В.,  
Остославская В. И., Гончар М. В., Котлова Е. К.,  
Стронгин А. Я.*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва;*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет*

Ковалентное связывание антибиотика-полипептида бацитрацина с сефарозой позволяет получить сорбенты, которые были использованы для выделения и очистки ряда карбоксильных протеиназ — пепсинов свиньи и лошади, карбоксильных протеиназ *Aspergillus awamori* и *Aspergillus foetidus* — аспергиллопепсинов А и F, протеиназы насекомоядного растения *Nerenthes*, а также сериновой протеиназы *Bacillus subtilis* — субтилизина. Последний был получен за одну стадию из культуральной жидкости. Предполагается, что бацитрацин, конкурентный ингибитор ряда протеиназ, взаимодействует с зоной связывания субстрата в этих ферментах, чем и объясняется его эффективность в качестве лиганда при аффинной хроматографии. Предполагается участие в этом процессе повообменных взаимодействий.

Аффинная, или биоспецифическая, хроматография принадлежит к числу важнейших методов препаративной химии ферментов. Аффинные сорбенты, используемые для выделения протеиназ, содержат в качестве специфических лигандов природные ингибиторы этих ферментов или же пептиды, в той или иной мере моделирующие их субстраты. Недавно нашей группой было предложено использовать доступный антибиотик-полипептид грамицидин S как лиганд при синтезе сорбентов протеиназ. Грамицидин-S-сефароза была успешно применена при хроматографии карбоксильных протеиназ различного происхождения [1], металлопротеиназы [2] и внутриклеточной сериновой протеиназы бактерий [3]. Опыт, накопленный при работе с этим сорбентом, показал целесообразность испытания других антибиотиков-полипептидов в качестве лигандов, способных избирательно взаимодействовать с протеиназами. Особенно удобным в этом отношении оказался антибиотик-полипептид бацитрацин, на основе которого был получен сорбент [4], во многих отношениях дополняющий ранее описанную грамицидин-S-сефарозу. И в этом случае при получении сорбента носителем служила сефароза 4В, однако нет оснований сомневаться в том, что могут быть найдены и другие подходящие носители.

В данной статье суммированы результаты применения бацитрацин-сефарозы для хроматографии ряда карбоксильных протеиназ и сериновой протеиназы — субтилизина. Бацитрацин — антибиотик-полипептид, образуемый *Bacillus licheniformis*, представляет собой семейство разветвлен-



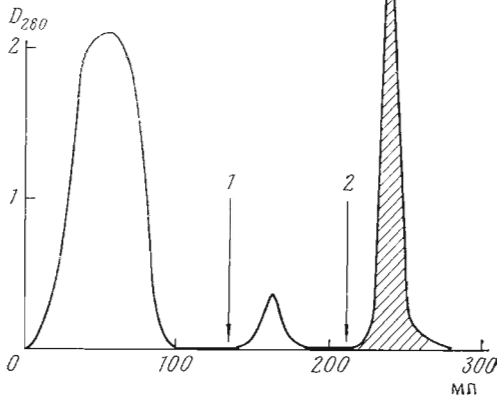


Рис. 1

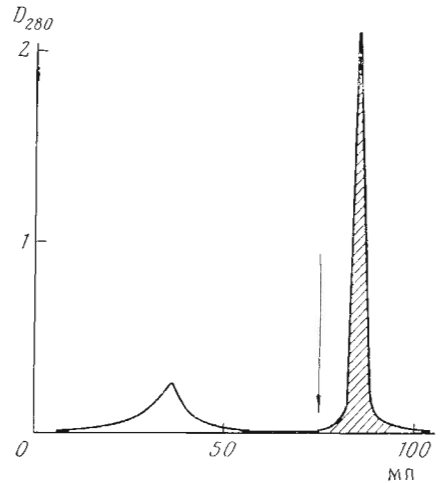


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография пепсина лошади на колонке (1,8 × 9 см) с бацитрацин-сефарозой 4В в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5. Стрелками показаны моменты добавления 1 М NaCl (1) и 25% изопропанола в 1 М NaCl (2). Заштрихован пик (здесь и далее), соответствующий активному ферменту

Рис. 2. Хроматография аспергиллопепсина F на колонке (0,8 × 5 см) с бацитрацин-сефарозой 4В в 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,5. Стрелкой показан момент добавления 25% изопропанола в 1 М NaCl

Для получения сорбента сефарозу 4В активировали бромцианом по методике, рекомендованной Поратом и сотр. [8], проводя реакцию в концентрированном фосфатном буфере. Обработка активированного носителя водным раствором бацитрацина дает сорбент с содержанием лиганда 4—8 мкмоль на 1 мл геля. С такими сорбентами была проведена большая часть экспериментов, описанных в данной работе. Сходные результаты дает присоединение бацитрацина при рН 10 к коммерческой сефарозе, активированной бромцианом. Полученный по такому способу сорбент содержит 2 мкмоль бацитрацина на 1 мл влажного геля.

Хроматография ферментов на бацитрацин-сефарозе проводилась в обычных условиях. Для их десорбции применялось промывание колонки концентрированными растворами соли, а в ряде случаев, когда сорбция оказывалась более прочной, к элюирующему раствору добавляли изопропиловый спирт, роль которого, очевидно, сводилась к подавлению гидрофобных контактов между ферментом и лигандом.

Активный пепсин свиньи при рН 5,0 легко связывается бацитрацин-сефарозой, что позволяет освободить его от неактивных примесей, не задерживаемых колонкой. Десорбция достигается промыванием колонки

#### Очистка протеиназ хроматографией на бацитрацин-сефарозе

Фермент	Нанесено		Получено		Степень очистки	Выход по активности, %
	Белок, ОЕ	Уд. акт., ед. акт./ОЕ	Белок, ОЕ	Уд. акт., ед. акт./ОЕ		
Пепсин свиньи	85	19	40	38	2	94
Пепсин лошади	154	8	19	46	5,7	72
Аспергиллопепсин А	586	2,5	53	20,4	8,1	74
Аспергиллопепсин F	17	18,6	10,9	47,4	2,5	163
Карбоксильная протеиназа						
Nerenthes	633	0,04	1,2	14	35	66
Субтилизин	21200	0,018	150	1,62	90	70

25% раствором изопропилового спирта в 1 М NaCl. Необходимость использования для элюции сравнительно высокой концентрации соли указывает на возможную роль ионного обмена в данном процессе. Выход фермента близок к количественному, получаемый пепсин практически чист (таблица).

Хроматография пепсина лошади на бацитрацин-сефарозе (рис. 1, таблица), которая проводилась с препаратом, предварительно очищенным на DEAE-целлюлозе, дает с выходом 72% фермент с увеличивающейся в 6 раз удельной активностью. Полученный препарат содержит смесь множественных форм пепсина лошади [9], не разделяемых аффинной хроматографией.

При выделении карбоксильных протеиназ микроскопических грибов — аспергиллопепсина А (из *Asp. awamori*) и аспергиллопепсина F (из *Asp. foetidus*) — бацитрацин-сефарозу приходится использовать на заключительных стадиях очистки, поскольку в исходных экстрактах поверхностных культур этих грибов содержатся ферменты, способные разрушать сефарозу. Эти ферменты и основную часть пигментных примесей обычно удаляли с помощью хроматографии на аминсилохроме и гель-фильтрации на биогелях [10]. В результате бацитрацин-сефароза связывала карбоксильные протеиназы грибов, которые затем элюировались при повышении ионной силы и добавлении изопропилового спирта к элюирующему раствору (рис. 2). Характерно, что хроматография аспергиллопепсина F на бацитрацин-сефарозе приводит к значительному (в 1,3—3 раза) повышению суммарной активности фермента, что отражают кажущиеся «выходы» по активности, превышающие 100% (см. таблицу). Очевидно, что этот эффект, наблюдавшийся нами и ранее при хроматографии карбоксильных протеиназ, обусловлен удалением примесей, ингибирующих фермент, в частности продуктов его автолиза. Нельзя исключить, однако, присутствия в грибных протеиназах и ингибиторов специфической природы.

Аспергиллопепсин F, полученный хроматографией на бацитрацин-сефарозе, был практически чист, что подтвердилось при его исследовании методом изоэлектрофокусирования и определении аминоконцевой последовательности по Эдману. Те же критерии свидетельствовали о гомогенности аспергиллопепсина А, которая была дополнительно подтверждена в процессе анализа первичной структуры этого фермента.

При очистке карбоксильной протеиназы из сока кувшинчиков насекомоядного растения *Nepenthes* хроматография на бацитрацин-сефарозе с последующим обессоливанием на сефадексе G-50 привела к увеличению удельной активности в 35 раз (рис. 3).

Таким образом, показано, что бацитрацин-сефароза может с успехом использоваться в аффинной хроматографии карбоксильных протеиназ из различных источников.

Особенно эффективным оказалось использование бацитрацин-сефарозы для выделения и очистки сериновой протеиназы *Bac. subtilis* — субтилизина. Исходным материалом для выделения этого фермента послужила культуральная жидкость *Bac. subtilis* штамма А-50, высушенная лиофильно. При выдерживании раствора неочищенного препарата при рН 8,4 с бацитрацин-сефарозой субтилизин связывается с сорбентом. Десорбция, проводившаяся в колоночном режиме 25% раствором изопропилового спирта в 1 М NaCl при рН 8,4, дала препарат, очищенный в 91 раз, с 70% выходом (рис. 4). После гель-фильтрации на сефадексе G-25 и концентрирования ультрафильтрацией выход практически чистого фермента составил 53% (таблица).

По данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле при рН 9,5, полученный препарат содержал только три молекулярные формы субтилизина с  $R_f$  0,08; 0,16 и 0,3. После ингибирования полученного препарата фенилметилсульфонилфторидом множественные формы субтилизина раз-

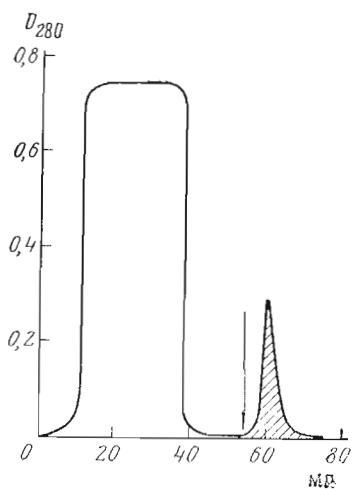


Рис. 3

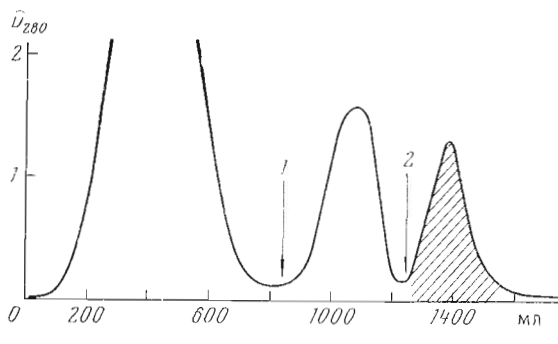


Рис. 4

Рис. 3. Хроматография пеницилина на колонке (0,8 × 5 см) с бацитрацин-сефарозой 4В в 0,1М ацетатном буфере, рН 5. Стрелкой показан момент добавления 25% изопропанола в 1 М NaCl

Рис. 4. Хроматография субтилизина А на колонке (2 × 15 см) с бацитрацин-сефарозой 4В в 50 мМ трис-НСl-буфере с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 8,5. Стрелками показаны моменты добавления 1 М NaCl (1) и 25% изопропанола в 1 М NaCl (2)

деляли изоэлектрофокусированием в диапазоне рН 7—9 [14]. Главный компонент с  $pI$  8,15 был освобожден от амфилинов гель-фильтрацией на сефадексе G-50, лиофильно высушен и обработан фенолом для обеспечения полной денатурации белка и отделения примеси коротких пептидов. Определение аминоконцевой последовательности автоматическим методом Эдмана дало следующий результат: Ala-Gln-Xxx-Val-Pro-Tyr-Gly-Val-Ser-Gln-Pe-Xxx-Ala-Pro-Ala-Leu.

Найденная последовательность соответствует ранее установленной структуре субтилизина ВРН' (Novo) [12]. Таким образом, было окончательно установлено, что субтилизин, образуемый *Bac. subtilis*, штамм А-50, относится к типу ВРН' (Novo). С другой стороны, однозначное определение аминоконцевой последовательности подтверждает, что субтилизин, полученный из культуральной жидкости одностадийной хроматографией на бацитрацин-сефарозе, является практически чистым ферментом.

Для сравнения укажем, что грамицидин-S-сефароза не связывает субтилизин, образуемый штаммом А-50. Напротив, внутриклеточная сериновая протеиназа *Bac. subtilis* А-50 — фермент, близкий по характеру активного центра к субтилизину, но имеющий изоэлектрическую точку в кислой зоне, при рН 4,3, — не взаимодействует с бацитрацин-сефарозой, однако хорошо связывается грамицидин-S-сефарозой [3]. Эти факты еще раз указывают на возможную роль ионных взаимодействий и в описанных выше хроматографических процессах. Строгий анализ таких взаимодействий пока затруднителен, тем не менее их следует учитывать при подборе сорбентов, имея в виду, что бацитрацин и грамицидин S как лиганды для биоспецифической хроматографии протеиназ могут дополнять друг друга.

### Экспериментальная часть

**Ферменты.** Использовали препарат свиного пепсина (КФ 3.4.23.1), выпускаемый Московским мяскокомбинатом, с уд. акт. 19 ед. акт./ОЕ. Препарат пепсина лошади был получен из желудочного сока хроматографией на DEAE-целлюлозе [9]. Его удельная активность 9 ед. акт./ОЕ. Исходным материалом для выделения аспергиллопепсина А послужил

экстракт поверхностной культуры *Asp. awamori*, очищенный высаливанием и хроматографией на аминоксилохроме [10]. Аналогичной предварительной очистке была подвергнута и поверхностная культура *Asp. foetidus*.

Для выделения пепентесина использовали сок из кувшинчиков насекомоядного растения *Nepenthes*, собранный в оранжерее Главного ботанического сада АН СССР. Удельная активность сока 0,02 ед. акт./ОЕ (рН 4,5).

Активность всех карбоксильных протеиназ определяли по расщеплению гемоглобина [13] при рН 1,8 в случае пепсинов свиньи и лошади, а также пепентесина, при рН 2,5 в случае аспергиллопепсинов. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое в условиях опыта расщепляло гемоглобин настолько, что оптическая плотность фильтрата при 280 нм после осаждения пробы трихлоруксусной кислотой составляла 1.

Источником субтилизина (КФ 3.4.21.14) была культуральная жидкость *Bac. subtilis* А-50. Активность фермента определяли по гидролизу *n*-нитроанилида бензилоксикарбонил-*L*-аланил-*L*-аланил-*L*-лейцина [14]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее за 1 мин в стандартных условиях 1 мкмоль субстрата.

**Получение бацитрацин-сефарозы. Способ а.** К 1 г сухой СNBг-активированной сефарозы (Pharmacia, Швеция) прибавляли воду, набухший гель промывали 200 мл 1 мМ НСl, затем водой до отрицательной реакции на Cl<sup>-</sup>-ионы и переносили в равный объем 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> в 0,5 М NaCl (рН 10). Добавляли раствор 100 мг бацитрацина (Serva, ФРГ) в 5 мл 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 М NaCl и проводили реакцию 3 ч при 20°, поддерживая рН 10, затем гель отфильтровывали, промывали 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> в 0,5 М NaCl, 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, водой. После этого выдерживали 1,5 ч при перемешивании с 1 М раствором этаноламина (рН 8) и повторяли промывание. Непосредственно перед опытами сорбент промывали всеми растворами, которые предполагалось использовать для элюции. Определение аминокислот в кислотном гидролизате аликвоты сорбента показало, что содержание бацитрацина составляло 2 мкмоль на 1 мл набухшего сорбента или 60 мкмоль на 1 г сухого веса.

**Способ б.** К 10 мл сефарозы 4В (Pharmacia, Швеция), промытой 1 мМ НСl и водой, прибавляли 10 мл 5 М фосфатного буфера (рН 8), а затем при охлаждении до 4° и перемешивании раствор 2 г бромциана в смеси 1 мл ацетонитрила и 19 мл воды. Спустя 15 мин активированную сефарозу быстро отфильтровывали и промывали холодной водой, 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> и 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> в 0,5 М NaCl (рН 10). Гель переносили в 10 мл 0,5 М NaCl с 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> и добавляли 5% раствор бацитрацина в том же буфере. Далее реакцию и промывание геля проводили так же, как и в способе а. В зависимости от количества введенного в реакцию бацитрацина изменялось его содержание в сорбенте. При прибавлении 25, 32 и 64 мг бацитрацина на 1 мл активированной сефарозы оно составило соответственно 4,3; 6 и 8 мкмоль/мл сорбента.

**Хроматография пепсина лошади на бацитрацин-сефарозе.** Раствор пепсина лошади в 0,1 М ацетатном буфере, рН 5 (48 мл) нанесли на колонку (1,8 × 9 см) с бацитрацин-сефарозой, уравновешенную тем же буфером. Сорбент последовательно промывали исходным буфером, 1 М NaCl в том же буфере и элюировали фермент 25% раствором изопропилового спирта в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5), содержащем 1 М NaCl (скорость элюции 60 мл/ч). Фракцию, содержащую активный фермент, собирали и отделяли белок от низкомолекулярных компонентов на сефадексе G-25, после чего лиофилизовали (см. рис. 1 и таблицу). Аналогично проводили хроматографию свиного пепсина и пепентесина (см. рис. 3).

**Хроматография аспергиллопепсина F на бацитрацин-сефарозе.** Раствор 17 мг препарата аспергиллопепсина F в 17 мл 0,1 М ацетатного бу-

фера (рН 4,5) наносили на колонку (0,8 × 5 см) с бацитрацин-сефарозой, уравновешенную тем же буфером. Сорбент промывали исходным буфером, а затем элюировали фермент 25% раствором изопропилового спирта в 1 М NaCl (рН 4,5) со скоростью 60 мл/ч (см. рис. 2 и таблицу). Аналогично проводили хроматографию аспергиллопепсина А.

*Выделение субтилизина А-50.* Культуральную жидкость, полученную после 60 ч выращивания, отделяли от клеток и высушивали лиофильно. Препарат (20 г) растворяли в 200 мл 50 мМ трис-НСl-буфера (рН 8,5), содержащего 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, центрифугировали 40 мин при 10 000 об/мин. Надосадочную жидкость перемешивали 1 ч при 20° с 50 мл бацитрацин-сефарозы. Смесь переносили в колонку, которую промывали большим объемом того же буфера, затем буфера с 1 М NaCl, и элюировали фермент 25% раствором изопропилового спирта в 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 8,5), содержащем 1 М NaCl и 1 мМ CaCl<sub>2</sub> (рис. 4, таблица). Фракции, содержащие фермент, объединяли, освобождали от низкомолекулярных примесей на сефадексе G-25 и концентрировали в 20 раз ультрафильтрацией через мембраны Diaflo UM-10 на приборе Amicon (Amicon, Нидерланды). Выход активного субтилизина после хроматографии на бацитрацин-сефарозе составил 70%, но снизился до 52% из-за потерь при ультрафильтрации.

Диск-электрофорез и изоэлектрофокусирование проводили как описано ранее [11].

Определение аминоконцевой последовательности автоматическим методом Эдмана было выполнено Л. А. Баратовой и Л. П. Беляновой (МГУ), которым авторы приносят глубокую благодарность.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Лавренова Г. И. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 831—835.
2. Ваганова Т. И., Ластовецкая Л. В., Стронгин А. Я., Люблинская Л. А., Степанов В. М. (1976) *Биохимия*, **41**, 2229—2237.
3. Stepanov V. M., Strongin A. Ya., Izotova L. S., Abramov Z. T., Lyublinskaya L. A., Ermakova L. M., Baratova L. A., Belyanova L. P. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **77**, 298—305.
4. Степанов В. М., Руденская Г. Н. Положительное решение по заявке № 2370306/04 от 4.III.1977.
5. Galarby R. E., Printz M. P., Craig L. C. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2429—2436.
6. Mäkinen K. K. (1972) *Int. J. Protein Research*, **4**, 21—28.
7. Черная М. М., Адли К., Лавренова Г. И., Степанов В. М. (1976) *Биохимия*, **41**, 732—739.
8. Porath G., Aspberg K., Drevin H., Axen R. (1973) *J. Chromatography*, **86**, 53—58.
9. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Руденская Г. Н., Гончар М. В., Лобарева Л. С., Котлова Е. К., Стронгин А. Я., Баратова Л. А., Белянова Л. П. (1976) *Биохимия*, **41**, 1285—1290.
10. Ковалева Г. Г., Юсупова М. П., Лысогорская Е. Н., Баладнина Г. Н., Степанов В. М. (1977) *Биохимия*, **42**, 534—538.
11. Стронгин А. Я., Абрамов З. Т., Левин Е. Д., Степанов В. М. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 1441—1448.
12. *Atlas of Protein Sequence and Structure* (1969) **4**, p. 122—123 (M. O. Dayhoff, ed.), Nat. Biomed. Research Found., Silver Spring, Maryland.
13. Anson M. L. (1938) *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79—89.
14. Люблинская Л. А., Якушева Л. Д., Степанов В. М. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 273—279.

Поступила в редакцию  
6.II.1978

## AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF PROTEINASES ON THE SORBENTS CONTAINING BACITRACIN AS A SPECIFIC LIGAND

STEPANOV V. M., RUDENSKAYA G. N., YANONIS V. V.,  
OSTOSLAVSKAYA V. I., GONCHAR M. V., KOTLOVA E. K.,  
STRONGIN A. Ya.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow;  
Chemistry Department, M.V. Lomonosov State University, Moscow*

Covalent attachment of polypeptide antibiotic bacitracin to Sepharose gave the sorbents which were used for isolation and purification of several carboxylic proteinases — swine and horse pepsins, carboxylic proteinases from *Aspergillus awamori* and *Aspergillus foetidus* (Aspergillopepsins A and F, respectively), proteinase from carnivorous plant *Nepenthes*, as well as of serine proteinase from *Bacillus subtilis* — subtilisin. The latter was obtained from the culture filtrate in one chromatographic step. It is supposed that bacitracin, being competitive inhibitor of many proteinases, interacts with their substrate binding sites which may explain its efficiency as a ligand in affinity chromatography. Ion-exchange interactions are suggested to participate in this process.

---