



УДК 577.152.34.088.3:543.544

© 1994 Г. Н. Руденская

АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРОТЕИНАЗ

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

Ключевые слова: аффинная хроматография, протеолитические ферменты, бацитрацин-сефароза, бацитрацин-силикагели, грамицидин-С-сефароза, фенилборонат-сефароза, «протамин»-агароза, Cabs-сефароза.

В обзоре систематизированы исследования в области аффинной хроматографии протеиназ — наиболее эффективного способа выделения и очистки ферментов. Рассмотрены методы синтеза сорбентов на различных носителях, содержащих в качестве лигандов антибиотики-полипептиды грамицидин С и бацитрацин. Эти пептиды содержат аминокислотные остатки, отвечающие специфичности протеиназ разных классов, и являются лигандами общего типа. Исследованы некоторые закономерности взаимодействия протеиназ с аффинными сорбентами. Приведены многочисленные примеры хроматографии протеолитических ферментов на биоспецифических сорбентах общего типа, а также сорбентах, специфичных к отдельным классам протеиназ, содержащих в качестве лигандов остатки бензилянтарной, бензилмалоновой и фенилборной кислот.

1. Синтез аффинных сорбентов протеиназ

Многообразие задач препаративной биохимии делает необходимым создание аффинных сорбентов широкой специфичности, содержащих так называемые лиганды общего типа, которые могут быть использованы для выделения ряда функционально родственных ферментов, в частности протеиназ различных классов. Такого рода сорбенты позволяют использовать принципы аффинной хроматографии уже на ранних этапах очистки, что сокращает число стадий и обеспечивает существенный выигрыш в выходах. Это особенно важно при увеличении масштаба биоспецифической хроматографии.

Подбор лигандов общего типа для протеиназ может быть основан на двух принципах: 1) использование протяженного аналога пептидного субстрата, способного при взаимодействии с ферментом занять одновременно несколько подцентров связывания, всегда имеющихся в активном центре протеиназ; 2) создание структуры, имитирующей переходное состояние фермент-субстратного комплекса.

Простейшие сорбенты первого типа обычно основываются на взаимодействии остатка R_1 , определяющего первичную специфичность фермента, с комплементарным участком активного центра S_1 . Однако весьма важно использовать и вторичные взаимодействия (например, на участках S_2 , S_3 , S_1' , S_2' и т. д.), настолько значимые, в частности у аспартильных и бактериальных сериновых протеиназ, что их вклад сравним, а иногда и перекрывает вклад первичных

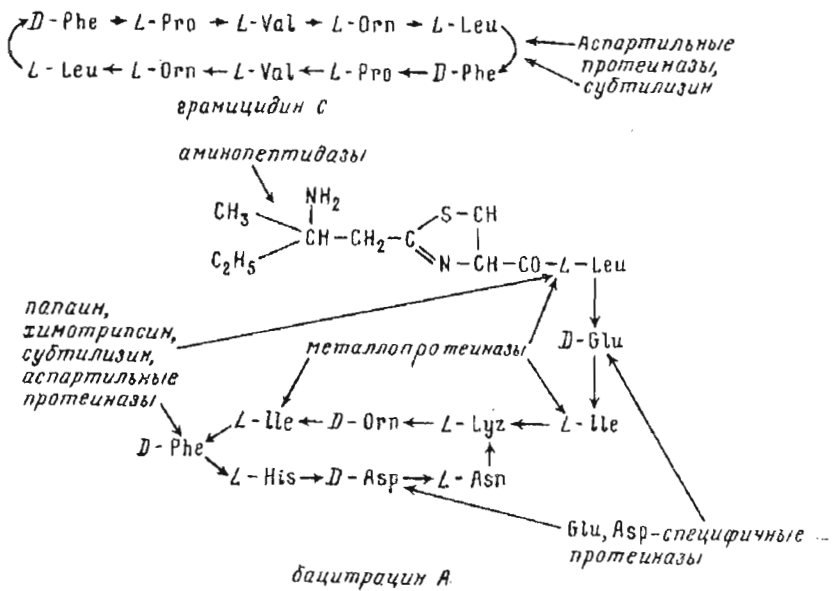


Рис. 1. Антибиотики-полипептиды. Стрелками обозначены места в молекулах антибиотиков, соответствующие специфичности протеиназ разных классов

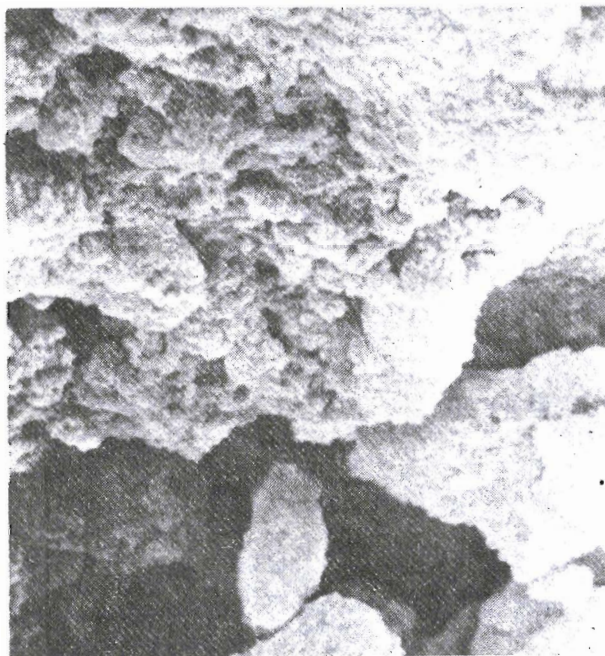


Рис. 2. Фотография поверхности бацитрацин-силикагеля (сканирующий электронный микроскоп, увеличение в 8000 раз)

взаимодействий. Такими лигандами могут служить достаточно длинные пептиды, однако они малодоступны и гидролизуются протеиназами, что делает невозможным их применение для синтеза сорбентов длительного действия.

Нами предложено использовать в качестве лигандов для синтеза аффинных сорбентов протеиназ антибиотики-циклопептиды: грамицидин С [1] и бацитрацин [2—6]. Эти пептиды, в особенности бацитрацин, содержат аминокислотные остатки, отвечающие специфичности многих протеиназ, в частности субтилизинов и металлопротеиназ, требующих присутствия в положениях P_1 и P_1' субстрата гидрофобных аминокислот (рис. 1). Структура бацитрацина удовлетворяет и специфичности папаина, для которого необходимо присутствие гидрофобной аминокислоты в положении P_2 , и глутаматспецифичной протеиназы стафилококков, для которой требуется присутствие в положении P_1 остатка аспарагиновой или глутаминовой кислоты (рис. 1). В то же время структура антибиотиков позволяет образовать сеть нековалентных взаимодействий между лигандом и ферментом, соответствующую вторичной специфичности протеиназ разного типа.

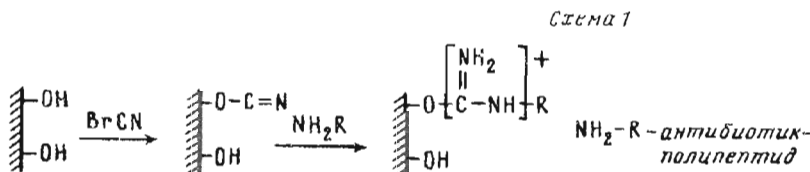
Характерные изгибы циклопептидов облегчают комплементарное взаимодействие с зоной связывания субстрата, а наличие *D*-аминокислот обеспечивает устойчивость циклопептидов к протеолизу и, значит, стабильность сорбентов.

Структурные особенности бацитрацина и грамицидина С позволяют предположить, что оба эти антибиотика могут быть конкурентными ингибиторами протеиназ. Действительно, бацитрацин является относительно слабым конкурентным ингибитором папаина, субтилизина, лейцинаминопептидазы с K_i 2—5 мМ [7]. Мы нашли [8], что бацитрацин и грамицидин С ингибируют пепсины свиньи и лошади с K_i около 2 мМ.

Указанные антибиотики-полипептиды имеют свободные аминогруппы, легко вступающие во взаимодействие с различными конденсирующими реагентами. Бацитрацин хорошо растворим в водных буферных системах, а грамицидин С для лучшего растворения требует добавления не менее 50% органических растворителей.

Антибиотики-циклопептиды доступны, их препараты выпускаются отечественной промышленностью, сравнительно дешевы, что открывает возможность их использования в промышленном синтезе аффинных сорбентов протеиназ.

В качестве матриц для сорбентов нами были использованы производные агарозы (сефарозы) и органические полимеры типа ультрагеля и TSK-геля (ТоуоРearl). Синтез проводили по методу Пората [9] (схема 1).



Синтез аффинных сорбентов на основе производных агарозы

Так были получены грамицидин-С-сефароза, бацитрацин-сефароза, бацитрацин-TSK-гель и бацитрацин-ультрагель. Включение лиганда составило 2, 5, 23 и 0,6 мкмоль/мл сорбента соответственно, выход по бацитрацину или грамицидину С — около 25%.

Другой тип матриц, использованный нами для синтеза аффинных сорбентов, — макропористые кремнеземы и силикагели (рис. 2, табл. 1), которые обладают рядом преимуществ перед носителями типа агарозы. Такие матрицы не разру-

Характеристика аффинных сорбентов на основе макропористых кремнезёмов

Носитель	Средний диаметр пор, Å	Удельный объем пор, см ³ /г	Удельная поверхность, м ² /г	Наибольшее включение бацитрацина, мкмоль/г
Силохром С-80	440—450	1,22—1,44	80	46
Силохром 120	400—450	1,22—1,44	120	40
Сервахром Р-500	600	1,1	50—70	40
Силикагель А-Т-5	240	1,5	250	50
Силикагель КСК-1	300	1,0	10	5,2
Аэросил	100	1,2	52	15
Диатомит природный	—	2,5	10—15	1,3

Таблица 2

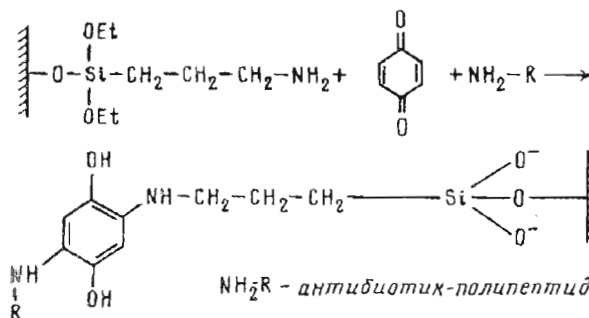
Зависимость включения бацитрацина от рН реакции * (аминированные кремнезёмы, *n*-бензохинон, 45° С)

рН	Силохром С-80		Силикагель А-Т-5		Аэросил	
	а	б	а	б	а	б
6—7	2,2	6	4,7	12,8	4,5	12,2
8,5—9,5	10,0	27,3	10,0	27,3	11,0	30,0
10—11	4,2	11,5	4,6	12,5	5,0	13,6

* а — включение, мкмоль/г; б — выход, %.

шаются ферментами микроорганизмов, особенно гликозидазами, которыми богаты культуры грибов. Скорость протекания растворов через них на порядок выше, чем через сорбенты на основе агарозы. Макропористые кремнезёмы дешевы, легко доступны. Обработка их определенными количествами γ -аминопропилтриэтоксисилана дает производные с заданным количеством аминогрупп, которые далее легко вступают в реакции с лигандом с помощью различных конденсирующих реагентов, причем не приходится прибегать к таким реагентам, как бромциан. Наиболее успешным оказалось применение в качестве конденсирующего реагента *n*-бензохинона (схема 2). Обычно включение лиганда составляет 15—25 мкмоль/г, достигая в некоторых случаях 50 мкмоль/г.

Схема 2



Синтез аффинных сорбентов на основе кремнезёмов

Следует отметить, что для сорбции ферментов безразлично, какая группа антибиотика-лиганда участвует в конденсации. Так, сериновая субтилизиноподобная протеиназа из *Thermoactinomyces vulgaris* практически не взаимодействует с сорбентом, синтезированным с помощью карбодимида. В этом случае бацитрацин присоединяется к матрице через карбоксильную группу, которая образует амидную связь. Однако тот же фермент легко сорбируется на бацитрацин-силохроме с таким же содержанием лиганда, синтезированном с помощью *n*-бензохинона, который реагирует с аминогруппами антибиотика.

Побочной реакцией при синтезе может быть взаимодействие *n*-бензохинона с двумя аминогруппами аминсилохрома или антибиотиков. Первая реакция, как показывает опыт, более вероятна, поэтому целесообразно сначала обрабатывать антибиотик *n*-бензохиноном, а затем вводить это соединение в реакцию с аминогруппами носителя.

При проведении реакции в водных растворах следует избегать высоких значений pH, так как это может привести к разрушению кремнеземной матрицы. Из табл. 2 следует, что оптимален интервал pH 8,5—9,5.

Синтез аффинных сорбентов на основе макропористых кремнезёмов можно проводить при комнатной температуре, однако лучшие результаты получаются при 60—80° С. В качестве растворителей применяли диметилформамид или водные буферные растворы с pH 6—10. Все же выходы реакции невысоки и не превышают 59%. Включение лиганда в случае сорбентов на основе силохрома достигает 40—50 мкмоль/г, что значительно превышает наблюдаемые величины констант ингибирования протеиназ бацитрацином и грамицидином и позволяет рассчитывать на достаточно прочное связывание протеиназ и, следовательно, на успех аффинной хроматографии.

Нами совместно с Ладыжинским заводом ферментных препаратов разработан промышленный способ синтеза бацитрацин-силохрома и бацитрацин-аэросила [10], а также создан аппарат для проведения аффинной хроматографии в заводских условиях [11].

Для получения аффинных сорбентов целесообразно применять аминокремнезёмы с содержанием аминогрупп 90—120 мкмоль/г. При большей их концентрации многие аминогруппы, видимо, экранируются на поверхности носителя циклопептидами и оказываются недоступными для синтеза. При аффинной хроматографии оставшиеся немодифицированными аминогруппы вызывают неспецифические ионные взаимодействия и снижают избирательность очистки, поэтому после синтеза рекомендуется ацетилировать непрореагировавшие аминогруппы.

Увеличение содержания лиганда в аффинных сорбентах приводит к повышению их емкости. Эта зависимость выражается гиперболической кривой (рис. 3), линейный участок которой достигается для различных ферментов при концентрации лиганда от 0,5 до 10—30 мкмоль/г сорбента.

При аффинной хроматографии протеиназ нами использовались также сорбенты второго типа, в которых лиганд призван при связывании фермента имитировать переходное состояние, например фенилборонат-сефароза, синтезированная по методу, предложенному В. Х. Акпаровым [12]. Этот сорбент содержит ингибитор сериновых протеиназ — фенилборную кислоту, которая образует в активном

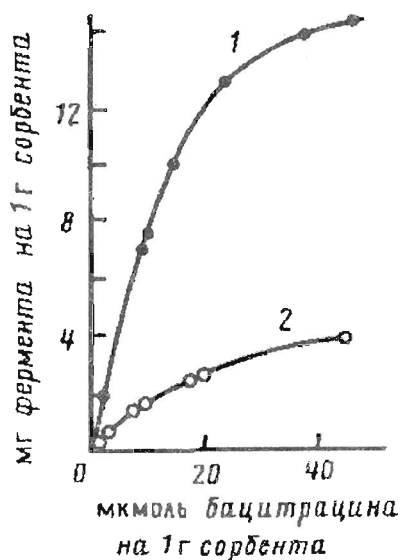
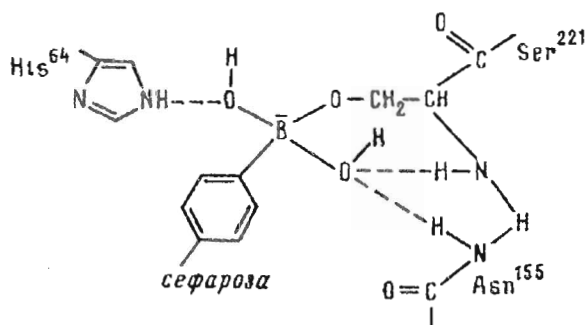
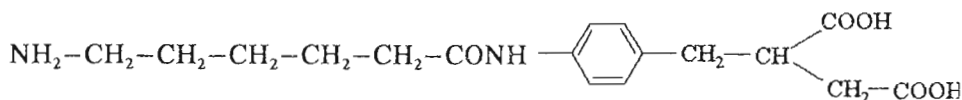


Рис. 3. Зависимость величины сорбции сериновых протеиназ — субтилизина 72 (1) и тиолзависимой субтилизиноподобной протеиназы *Th. vulgaris* (2)

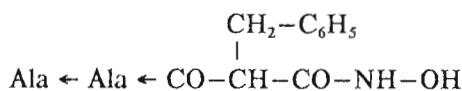
центре более или менее устойчивые структуры, имитирующие тетраэдрический переходный фермент-субстратный комплекс:



Особенно эффективными оказались сорбенты с лигандами, вступающие во взаимодействие с подцентрами в зоне связывания ферментов и вместе с тем содержащие аналог пептидной связи, способный образовать устойчивый комплекс с каталитическим центром фермента:



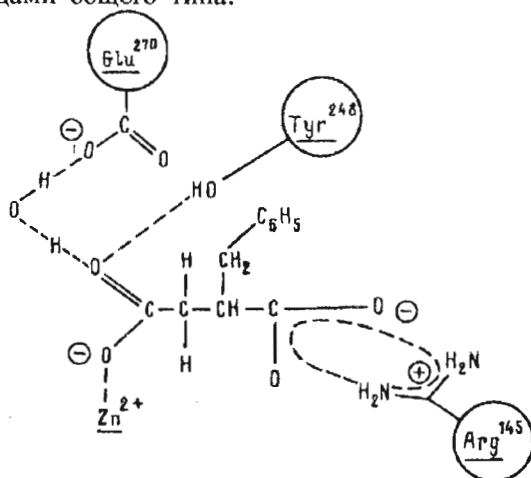
2-[*n*-(6-аминогексаноиламинобензил)янтарная кислота (Cabs)



гидроксамат аланил-аланилбензоилмалоновой кислоты

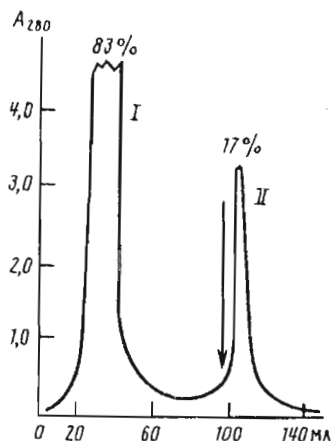
Видимо, так действуют сорбенты для карбоксипептидаз и металлопротеиназ, содержащие остатки бензилянтарной или гидроксамата бензилмалоновой кислоты [13]. В них объединены способность связываться с подцентром, ответственным за первичную специфичность фермента, и взаимодействие с ионом металла в каталитическом центре, а в ряде случаев — использование вторичной специфичности.

Вещества такого типа принципиально близки высокоспецифичным природным ингибиторам протеиназ, применение их в качестве лигандов для аффинной хроматографии протеиназ весьма эффективно. Такие сорбенты хорошо дополняют сорбенты с лигандами общего типа.



Предполагаемая структура комплекса бензилянтарной кислоты с карбоксипептидазой А [13]

Рис. 4. Разделение сериновой (пик I) и аспартильной (пик II) протеиназ из препарата «целлолигнорин П 10 X» на колонке (0,8 × 5,5 см) с грамицидин-С-силохромом, рН 5. Стрелкой показано начало элюции 25% пропанолом-2 с 1 М NaCl. Распределение активности по створаживанию молока выражено в %



В ряде случаев полезно применять сорбенты, являющиеся аналогами субстратов. Так, для выделения трипсинов и карбоксипептидаз смешанного типа оказались весьма эффективными аргинил-гексаметилендиамин-агароза, а также «протамин»-агароза. У последнего сорбента в качестве лиганда был использован набор пептидов, богатых аргинином и лизином, полученных в результате триптического гидролиза протамина лосося сальмина. С помощью градиентной элюции можно успешно отделить трипсины от карбоксипептидаз при их совместном присутствии в препарате [14].

2. Получение очищенных протеолитических ферментов методом аффинной хроматографии

Как показал опыт нашей и других лабораторий, предложенные нами сорбенты, содержащие бацитрацин и грамицидин С, обеспечивают эффективное выделение различных протеиназ. Сорбенты могут быть использованы в весьма широком интервале рН, который ограничивается стабильностью матрицы макропористых кремнеземов в щелочных (до рН 8,5), а производных агарозы — в кислых средах (до рН 3). Элюция ферментов обычно достигается повышением ионной силы, а также добавлением к элюенту 10—30% этилового или изопропилового спирта в присутствии 0,5—1 М хлористого натрия. Очевидно, при этом происходит нарушение гидрофобных контактов между лигандом и ферментом. Роль повышения ионной силы можно объяснить подавлением ионных взаимодействий или влиянием небольших конформационных изменений в активном центре фермента на характер его связывания с лигандом. Отмечалось влияние хелатирующих агентов, в частности EDTA, на результат хроматографии на бацитрацин-сефарозе [15], что может объясняться и известной способностью бацитрацина удерживать достаточно прочно ионы двухвалентных металлов [16], например цинка. Вполне вероятно, что это может в определенных случаях давать эффект лигандообменной хроматографии, но возможно и воздействие комплексно связанного иона металла на конформацию циклопептида и, следовательно, на способ его взаимодействия с ферментом.

Выходы очищенных ферментов обычно близки к количественным, а иногда как бы превосходят их вследствие удаления ингибирующих примесей при хроматографии. Степень очистки, как правило, высока. Многие ферменты можно получить практически чистыми. В табл. 3—6 приведены данные по аффинной хроматографии протеолитических ферментов различных классов.

Необходимо отметить, что грамицидин С и бацитрацин, будучи лигандами общего типа, обнаруживают определенную степень специфичности, что позволяет разделить отдельные протеиназы. На рис. 4 приведено разделение аспартильной

Аффинная хроматография протеиназ семейства субтилизины *

Фермент	Аффинный сорбент	Выход, %	Степень очистки	Лит. ссылка
Субтилизины внеклеточные:				
<i>B. amyloliquefaciens</i> (Bam)				
Bam A-25	Бц-сефароза	70	90	4
Bam A-50	»	50	90	4
Bam A-103	»	90	30	4
<i>B. licheniformis</i>				
Carlsberg	Бц-сефароза	98	9	4
72	Бц-силохром	130	46	5
Субтилизины внутриклеточные:				
ВСП-Bam A-50	Гц-сефароза	70	30	17,18
ВСП-Bam 103	»	75	20	
ВСП-Bsu 168	»	50	50	
ВСП-Bli	»	60	25	
<i>B. brevis</i>	Бц-силохром	100	257	19
<i>B. thuringiensis</i>				
	Бц-ультрагель	92	1,6	20
	Бц-силохром	60	22	21
<i>B. cereus</i>	»	75	51	22
<i>Th. vulgaris</i> ИНМИ 4А	»	118	103	23
<i>Th. vulgaris</i> (термитаза)	Бц-сефароза	96	2,8	24
<i>Nocardia minima</i>	Бц-силохром	70	20	В печати
<i>Streptomyces spheroides</i>	Бц-сефароза	95	31,5	25
<i>Str. thermovulgaris</i>	»	41	20,6	26
<i>Str. rutgersensis</i> (SRPD)	»	39	11	27
<i>Trichoderma lignorum</i>	Бц-силохром	80	133	28
<i>T. koningii</i>	Бц-силохром	97	43	28
	Бц-сефароза	67	66	
<i>Acremonium chrisogenum</i> I				
	»	52	49	29—31
	»	70	19	
<i>Aspergillus terreus</i> I				
	Бц-силохром	20	75	32
<i>Corpinus 7 N</i>				
	Бц-сефароза	90	4,0	33
<i>Halobacterium halobium</i>	»	49	64	34
<i>H. mediterranei</i>	»	80	93	35, 36
<i>Saccharomyces vini</i>	»	95	214	37
Протеиназа С семян хлопчатника	»			38
Сериновая протеиназа листьев подсолнечника <i>Heliantus annuus</i>	Бц-силохром	89	76	39
Сериновая протеиназа плодов <i>Maclura pomifera</i>	»	68	48	Неопубл. данные

* Бц — бацитрацин, Гр — грамицидин.

Аффинная хроматография протеиназ семейства химотрипсина

Фермент	Аффинный сорбент	Выход, %	Степень очистки	Лит. ссылка	
SSPG-химотрипсиноподобная протеиназа из <i>Str. spheroides</i>	Бц-силохром	77	10	40	
	Бц-сефароза	62	21		
SRPA-химотрипсиноподобная протеиназа <i>Str. rutgersensis</i>	»	38	30	15	
<i>E. coli</i> K12	»	50	66	41	
Трипсин скумбрии	Бц-силохром	22	65	42	
	»	100	120	43	
	иваси	81	40	Неопубл.	
	камчатского краба	Arg-агароза	116	70	данные
	листьев подсолнечника	»	100	314	»
Тромбин	Бц-силохром	96	6,2	44	
	Гр-сефароза	78	11,6		
Glu, Asp-специфичные протеиназы из <i>Staphylococcus aureus</i> 72 <i>Th. vulgaris</i> ИНМИ 4А <i>Str. thermovulgaris</i> <i>B. licheniformis</i>	Гр-сефароза	109	17,6	45	
	Бц-сефароза	64	22	46	
	Cabs-сефароза	72,5	52		
	Бц-сефароза	41,6	11,5	47	
	Бц-сефароза	33,3	15		
	Бц-сефароза	70	16	48	

Таблица 5

Аффинная хроматография эндо- и экзо-металлопротеиназ

Источник фермента	Аффинный сорбент	Выход, %	Степень очистки	Лит. ссылка	
Металлопротеиназы из <i>Th. vulgaris</i> ИНМИ 4А <i>Str. fradiae</i> <i>Str. kanamyceticus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. amyloliquefaciens</i> 103 внеклеточная внутриклеточная <i>Asp. oryzae</i>	Cabs-сефароза	97	84	49	
	2-(N-гидрокси-карбамидо-3-фенилпропаноил)-сефароза	20	416	Неопубл. данные	
	»	86	7	»	
	Бц-силикагель	25	2	50	
	»	49	6		
	Бц-сефароза	95	65	51	
	»	20	3		
	»	61	13	52	
	Карбоксипептидазы из <i>Th. vulgaris</i> ИНМИ 4А <i>Str. spheroides</i> <i>Nocardia</i> <i>Saccharomyces vini</i> Семян пшеницы <i>Xanthomonas rubrilineans</i>	Бц-сефароза	125	38	53
		Бц-силохром	83	47	
Cabs-сефароза		94	30	54	
»		90	100	Неопубл. данные	
»		200	700		
»		1200	4,5	55	
Cabs-сефароза		40	1000	56	
Arg-диасорб					
Аминопептидазы <i>X. rubrilineans</i> <i>Str. spheroides</i>		Cabs-сефароза	90	9	57
		Бц-сефароза	42	14	58

Аффинная хроматография аспартильных протеиназ

Источник фермента	Аффинный сорбент	Выход, %	Степень очистки	Лит. ссылка
Пепсин свиньи	Гр-сефароза	100	3,5	1—4
	Бц-сефароза	100	1,5	
Пепсин лошади	Гр-сефароза	92	17	59
Химозин теленка	»	78	16	60
Пепсин скумбрии	Бц-силохром	279	149	
Пепсин сардин	»	222	55	61
Катепсин из мышц сельди	Гр-силохром	100	13,6	61
Аспартильная протеиназа геммул пресноводной губки	Бц-сефароза	36	12	62
Аспергиллопепсин А	»	100	60	63
	»	163	2,5	64
<i>Russula decolorans</i>	Гр-сефароза	95	40	65
	Бц-силохром	93	38	
<i>Rhizomucor miehei</i>	Бц-силикагель	94	8	66
	Гр-силохром	95	2,6	
<i>T. lignorum</i>	Бц-силохром	98	20,6	67
	»	98	17	
Семена гречихи	Бц-сефароза	12	13,5	68
Семена пшеницы	Бц-силохром	47	3,5	69
Кепентесин	Гр-сефароза	90	7	Неопубл. данные
	Бц-сефароза	66	35	
Листья подсолнечника	Бц-сефароза	45	15	Неопубл. данные

и сериновой протеиназ *Trichoderma lignorum* на колонке с грамицидин-С-силохромом. Аспартильная протеиназа прочно связывается с сорбентом, сериновая оказывается в «проскоке», но может быть успешно очищена на бацитрацин-силохроме. Сорбенты на основе агарозы в данном случае неприменимы, так как грибы рода *Trichoderma* продуцируют целлюлазы, разрушающие полисахаридную матрицу.

Следует отметить, что константы ингибирования протеиназ бацитрацином и грамицидином С отвечают взаимодействию средней силы и по порядку величины сопоставимы с обычно достигаемыми концентрациями лиганда в геле сорбента. В таких условиях заметен вклад неспецифических взаимодействий в процесс хроматографии, среди которых ведущая роль принадлежит ионным силам. Сорбенты, содержащие грамицидин С, имеют катионный характер, тогда как сорбенты, в которых лигандом служит бацитрацин, несут как катионные, так и анионные группы, что в некоторых случаях может быть использовано для избирательного выделения протеиназ. Так, «катионная» грамицидин-С-сефароза не связывает катионный секреторный субтилизин *B. amyloliquefaciens* А-50 с изоэлектрической точкой 8,15. Напротив, внутриклеточная протеиназа *B. amyloliquefaciens* А-50 [17] с рI 4,3 не взаимодействует с бацитрацин-сефарозой, однако хорошо связывается с «катионной» грамицидин-С-сефарозой. Такие различия лигандов не всегда поддаются строгому анализу, но их следует учитывать при подборе сорбентов.

В случаях, когда ионные взаимодействия исключаются, сорбция определяется сродством фермента к лиганду. Яркий пример — выделение сериновой субтилизиноподобной протеиназы из галофильного микроорганизма *Halobacterium mediterranei* [35, 36]. На рис. 5 видно, что на бацитрацин-сефарозу наносят

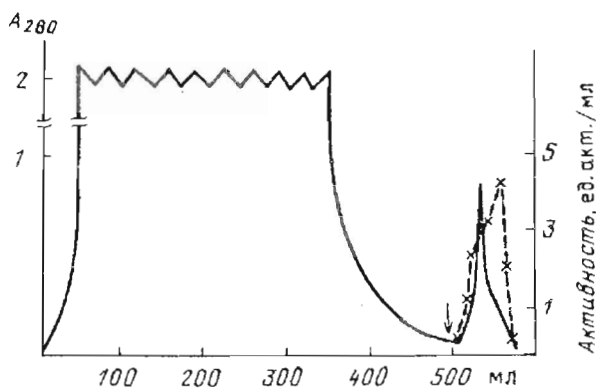


Рис. 5

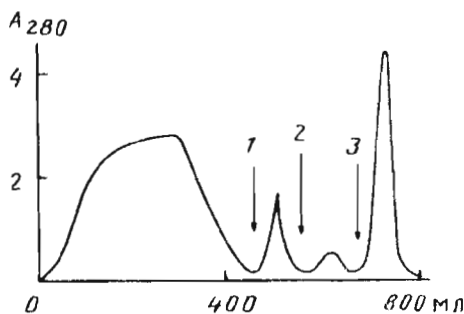


Рис. 6

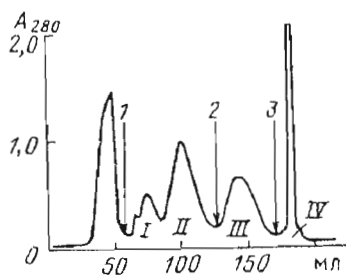


Рис. 7

Рис. 5. Выделение протеиназы из культуральной жидкости *H. mediterranei*, содержащей 4,5 М NaCl на колонке ($1,4 \times 10,5$ см) с бацитрацин-сефарозой. Стрелкой показано начало элюции 10% этанолом в 4,5 М NaCl, pH 8. Штриховой линией обозначен пик активности по GIp-A-A-L-NA

Рис. 6. Разделение карбоксипептидазы (пик I) и сериновой протеиназы *Th. vulgaris* (пик II) на колонке ($0,8 \times 20$ см). Элюция 18 мМ EDTA в 0,05 М трис-HCl, pH 7,2 (1); 0,5 М NaCl (2), 20% пропанолом-2 с 1 М NaCl (3)

Рис. 7. Разделение протеолитических ферментов *Th. vulgaris* на колонке ($1,2 \times 20$ см) с Cabs-сефарозой, уравновешенной 10 мМ Mes-буфером, pH 6,0. Элюция тем же буфером с добавлением 0,2 М NaCl (I), 0,5 М NaCl (2) и 0,1 М трис-HCl, pH 8,2 (3). Пик I — субтилизиноподобная протеиназа, активная по Z-A-A-L-NA; II — Gly, Asp-специфичная протеиназа, активная по Z-E-NA; III — металлопротеиназа, активная по Dnp-G-G-I-R; IV — карбоксипептидаза, активная по Dnp-A-A-K

культуральную жидкость, содержащую 4,5 М NaCl. При этом фермент прочно удерживается сорбентом и элюируется только при добавлении 10% этилового спирта.

При разделении протеиназ разных классов хороший результат дает аффинная элюция растворами, содержащими обратимые ингибиторы. Так, при разделении тиолзависимой сериновой протеиназы и карбоксипептидазы *Th. vulgaris* (рис. 6) последнюю элюируют с бацитрацин-сефарозы буфером, содержащим EDTA — ингибитор карбоксипептидазы [53]. Сериновая протеиназа не ингибируется EDTA и прочно удерживается сорбентом. Ее элюция осуществляется 20% изопропиловым спиртом в 1 М NaCl. Подобный прием был успешно использован при выделении субтилизиноподобных протеиназ из *Acremonium chrysogenum* [29—31] для освобождения от примесей сопутствующих карбоксипептидаз. Активность ингибированных карбоксипептидаз удается восстановить диализом против растворов $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Хроматография тиоловых протеиназ на бацитрацин-сефарозе

Фермент	Удельная активность по азоказеину, ед./ОЕ ₂₈₀		Выход по активности, %	Степень очистки
	исходная	полученная		
Папаин (Merck)	0,41	1,65	132	4
Бромелаин (Merck)	0,73	1,48	100	2
Фицин (Calbiochem)	0,48	1,87	100	3,9

Тактика использования биоспецифических сорбентов многообразна. Обычно в биологических объектах содержится комплекс протеолитических ферментов. Нами был разработан метод выделения четырех гомогенных ферментов из культуральной жидкости *Th. vulgaris* [46]. На первой стадии, используя бацитрацин-силохром, с количественным выходом получили суммарный препарат протеиназ (табл. 3). Затем применяли Cabs-сефарозу, сорбент, по литературным данным специфичный для карбоксипептидаз.

Как видно из рис. 7, ферменты последовательно элюируются с колонки: сначала тиолзависимая сериновая протеиназа (I), далее Glu, Asp-специфичная протеиназа (II), металлопротеиназа (III) и затем при повышении pH до 8,2 в трис-буфере элюируется наиболее прочно связываемая с сорбентом карбоксипептидаза Т (IV).

Способность ряда протеолитических ферментов, не являющихся карбоксипептидазами, взаимодействовать с Cabs-сефарозой оказалась неожиданной. Cabs-сефароза — распространенный сорбент для очистки карбоксипептидаз. Специфическим лигандом является *n*-аминобензилянтарная кислота — конкурентный ингибитор карбоксипептидазы А с $K_i = 11 \cdot 10^{-6}$ М и значительно более слабый ингибитор металлопротеиназ с $K_i = 3,8 \cdot 10^{-3}$ М [13].

В литературе нет данных о применении этого сорбента для выделения сериновых эндопептидаз. Возможно, сорбция субтилизиноподобного фермента с явно выраженными основными свойствами ($pI > 9$) происходит за счет отрицательно заряженных карбоксильных групп лиганда. При сорбции Glu, Asp-специфичной протеиназы аминобензилянтарная кислота в какой-то мере может служить аналогом субстратов — аспарагиновой или глутаминовой кислот. По-видимому, аминобензилянтарная кислота может служить лигандом общего типа для протеиназ разных классов, но проявляет особую специфичность в отношении карбоксипептидаз.

При разделении смеси тиолзависимой сериновой протеиназы и Glu, Asp-специфичной протеиназы *Str. thermovulgaris* [47] на бацитрацин-сефарозе хроматографию проводили в присутствии солей ртути, обратимо ингибирующих тиолзависимую сериновую протеиназу. В результате с сорбентом связывалась только Glu, Asp-специфичная протеиназа. После активации первого фермента, оказавшегося в «проскоке», меркаптосоединениями можно успешно хроматографировать его на той же колонке с бацитрацин-сефарозой.

Как видно из табл. 7, тиоловые ферменты имеют большое сродство к бацитрацин-сефарозе. Коммерческие препараты папаина, фицина, бромелаина могут быть очищены на бацитрацин-сефарозе в стандартных условиях в 2—4 раза [70]. Однако, если подобрать соотношение фермента и сорбента определенным образом, так, чтобы сорбент не был в избытке, оказывается, что происходит не только очистка от неактивных белковых примесей, но и хроматографическое разделение тиоловых ферментов, отделение папаина от папайя-пептидазы и других сопутствующих тиоловых протеиназ за счет фронтальной хроматографии.

При значительной перегрузке бацитрацин-сефарозы препаратом папаина (35 мг/мл сорбента) уже при промывании отделяется фермент, активный по белковому субстрату и практически неактивный по специфическому субстрату папаина Glp-Phe-Ala-NA, 1 М NaCl элюирует фермент с соотношением актив-

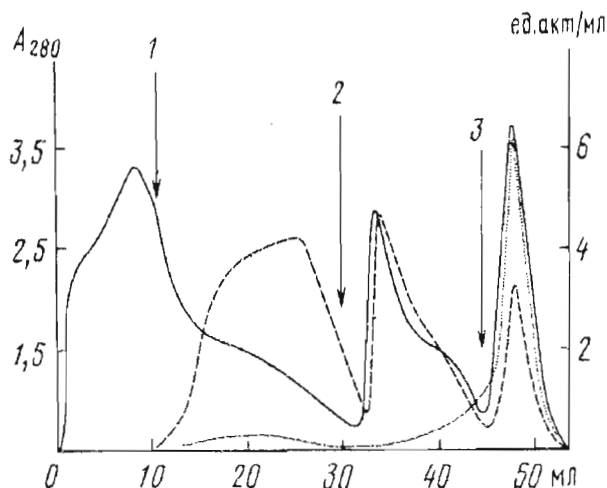


Рис. 8. Разделение тиоловых протеиназ препарата папаина (Мерск) на колонке (1 × 15 см) с бацитрацин-сефарозой. Стрелками показано: 1 — промывка 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,0, с 3 мМ дитиотреитом и 0,1 мМ EDTA; 2 — 1 М NaCl в том же буфере; 3 — 25% пропанол-2 и 1 М NaCl. Штриховой линией отмечена активность ферментов по азоказеину, пунктирной — активность по специфическому субстрату папаина Glp-F-A-NA

ностей по белковому и пептидному субстратам 14 : 1, а наиболее прочно удерживаемый сорбентом папаин (соотношение активностей 1 : 1) десорбируется 25% изопропанолом в 1 М NaCl (рис. 8).

Таким образом, метод аффинной хроматографии требует особого подхода к решению задачи в каждом конкретном случае, что позволяет быстро и с хорошим выходом получать в значительных количествах как суммарные препараты протеиназ, так и гомогенные протеолитические ферменты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Лавренова Г. И. // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. С. 831—835.
2. Степанов В. М., Руденская Г. Н. Способ очистки протеолитических ферментов: А. с. 644796 СССР. // Б. И. 1979. № 4. С. 89.
3. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Акпаров В. Х., Гайда А. В. Способ очистки протеолитических ферментов: А. с. 942427 СССР. // Б. И. 1984. № 1. С. 245.
4. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Янонис В. В., Острославская В. И., Гончар М. В., Котлова Е. К., Стронгин А. Я. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. С. 1256—1262.
5. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Gayda A. V., Osterman A. L. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1981. V. 5. P. 177—186.
6. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N. // J. Appl. Biochem. 1983. V. 2. P. 420—428.
7. Mäkinen K. K. // Int. J. Prot. Res. 1972. V. 4. P. 21—28.
8. Степанов В. М., Гончар М. В., Руденская Г. Н. // Химия природн. соедин. 1978. С. 385—389.
9. Porath G., Asperg K., Dreijn H., Axen R. // J. Chromatogr. 1973. V. 86. P. 53—58.
10. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Удовенко Л. В., Жовба В. Н., Трубочанин Т. Н. Способ получения аффинного сорбента для очистки протеиназ: А. с. 1533334 СССР.
11. Григорьев Е. Р., Руденская Г. Н., Болоховский В. В., Удовенко Л. В., Степанов В. М., Федосеев А. С., Купенко О. П. Устройство для аффинной хроматографии: А. с. 1752756 СССР. // Б. И. 1992. № 29. С. 78.
12. Акпаров В. Х., Белякова Л. Г., Баратова Л. А., Степанов В. М. // Биохимия. 1979. Т. 44. № 5. С. 886—891.

13. Bolognesi M. C., Matthews V. W.//J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 3. P. 634—639.
14. Руденская Г. Н., Купенко О. Г., Степанов В. М., Исаев В. А.//Биоорганич. химия. 1994. В печати
15. Калугер С. В., Боровикова В. П., Лавренова Г. И., Степанов В. М., Шпокене А. П., Гуреева М. П., Ужжуренас А. П.//Биохимия. 1983. Т. 48. № 9. С. 1483—1490.
16. Seebauer E. G., Duliba E. P., Scogin D. A., Gennis R. V., Belford R. L.//J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. P. 4926—4929.
17. Изотова Л. С., Городецкий Д. И., Янонис В. В., Баратова Л. А., Белякова Л. П., Тимохина Е. А., Стронгин А. Я., Степанов В. М.//Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 3. С. 397—403.
18. Стронгин А. Я., Степанов В. М.//Биохимия. 1981. Т. 46. № 8. С. 1347—1363.
19. Калеева Т. С., Руденская Г. Н., Рыженкова В. В., Кулаев И. С., Ходова О. М., Честухина Г. Г., Степанов В. М.//Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 6. С. 815—823.
20. Епремян А. С., Честухина Г. Г., Азизбекян Р. Р., Нетыкса Е. М., Руденская Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1981. Т. 46. № 5. С. 920—929.
21. Честухина Г. Г., Загнитко О. П., Ревина Л. П., Клепикова Ф. С., Степанов В. М.//Биохимия. 1985. Т. 50. № 10. С. 1724—1731.
22. Честухина Г. Г., Епремян А. С., Гайда А. В., Остерман А. Л., Ходова О. М., Степанов В. М.//Биоорганич. химия. 1982. Т. 8. № 12. С. 1649—1658.
23. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Нестерова Н. Г., Куприянова Т. И., Хохлова Ю. М., Усайте И. А., Логинова Л. Г., Тимохина Е. А.//Биохимия. 1980. Т. 45. № 10. С. 1871—1880.
24. Stepanov V. M., Revina L. P., Abramov Z. T., Strongin A. Ya., Behnke U.//J. Appl. Biochem. 1980. V. 2. P. 342—345.
25. Крейер В. Г., Руденская Г. Н., Ландау Н. С., Покровская С. С., Степанов В. М., Егоров Н. С.//Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365—1373.
26. Хайдарова Н. В., Руденская Г. Н., Ревина Л. П., Степанов В. М., Егоров Н. С.//Биохимия. 1990. Т. 55. № 6. С. 1110—1119.
27. Лавренова Г. И., Гульник С. В., Калугер С. В., Боровикова В. П., Ревина Л. П., Степанов В. М.//Биохимия. 1984. Т. 49. № 4. С. 531—539.
28. Гайда А. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1981. Т. 46. № 11. С. 2064—2073.
29. Stepanov V. M., Vasilyeva L. I., Krestyanova I. N., Khodova O. M., Rudenskaya G. N., Bartoshevich Yu. E.//Internat. J. Biochem. 1986. V. 18. № 4. P. 369—375.
30. Васильева Л. Н., Руденская Г. Н., Крестьянова И. Н., Ходова О. М., Бартошевич Ю. Э., Степанов В. М.//Биохимия. 1985. Т. 50. № 3. С. 355—361.
31. Степанов В. М., Руденская Г. Н., Васильева Л. И., Крестьянова И. Н., Ходова О. М., Бартошевич Ю. Э.//Биохимия. 1986. Т. 51. № 9. С. 1476—1483.
32. Стефанова М. Е., Белецкая О. П., Кулаев И. С.//Тезисы Всес. конференции «Биосинтез ферментов микроорганизмами». Ташкент, 1988. С. 262.
33. Шагинян К. А., Алехина И. А., Газелян С. Г., Денисова Н. П.//Докл. АН АрмССР. 1989. № 2. С. 88—93.
34. Isotova L. S., Strongin A. Ya., Chekulaeva L. N., Sterkin V. E., Ostoslavskaya V. I., Lyublinskaya L. A., Timokhina E. A., Stepanov V. M.//J. Bacteriol. 1983. V. 155. P. 826—830.
35. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Revina L. P., Gryaznova Yu. B., Lysogorskaya E. N., Filippova I. Yu., Ivanova I. I.//Biochem. J. 1992. V. 285. P. 281—286.
36. Руденская Г. Н., Ревина Л. П., Грязнова Ю. Б., Лысогорская Е. Н., Оксенойт Е. С., Филиппова И. Ю., Степанов В. М., Иванова И. И.//Биохимия. 1992. Т. 57. № 8. С. 1230—1241.
37. Полонская А. К. Протеиназы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и их роль в трансформации белка при производстве шампанских виноматериалов: Автореф. канд. дисс. М., 1988.
38. Касьмова Т. Д., Кученкова М. А., Юлдашев М. Х.//Химия природн. соедин. 1985. № 2. С. 276—277.
39. Руденская Г. Н., Степанов В. М., Захарова Ю. А., Ревина Л. П., Ходова О. М.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 10. С. 1753—1755.
40. Крейер В. Г., Руденская Г. Н., Ландау Н. С., Смирнов А. В., Тимохина Е. А., Егоров Н. С., Степанов В. М.//Биохимия. 1984. Т. 49. № 11. С. 1890—1898.
41. Шагинян К. А., Изотова Л. С., Стронгин А. Я., Степанов В. М.//Биохимия. 1980. Т. 45. № 4. С. 695—703.
42. Lopatin S. A., Rudenskaya G. N., Popova I. M., Bikbov T. M.//Nahrung. 1991. V. 35. № 5. P. 415—420.

43. Купенко О. Г., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Попова И. М.//II Всес. совещание «Биологически активные вещества гидробионтов». Владивосток, 1991. С. 39.
44. Гайда А. В., Магеровский Ю. В., Монастырский В. А.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 4. С. 569—576.
45. Беляева Е. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Дегтева Г. К.//Прикл. биохимия и микробиол. 1984. Т. 20. № 3. С. 363—368.
46. Мосолова О. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Цаплина И. А., Ходова О. М.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 3. С. 414—422.
47. Хайдарова Н. В., Руденская Г. Н., Ревина Л. П., Степанов В. М., Егоров Н. С.//Биохимия. 1989. Т. 54. № 1. С. 46—53.
48. Svendsen I., Breddam K.//J. Biochem. 1992. V. 204. P. 165—171.
49. Мосолова О. В., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Цаплина И. А., Тарасова Н. И.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 10. С. 1709—1715.
50. Van Den Burg B., Eijssink V. G. H., Stulp B. K., Venema G.//J. Biochem. Biophys. Methods. 1989. V. 18. P. 209—220.
51. Шагинян К. А., Изотова Л. С., Иомантас Ю. В., Стронгин А. Я., Степанов В. М.//Биохимия. 1980. Т. 45. № 11. С. 2083—2095.
52. Ваганова Т. И., Иванова Н. М., Степанов В. М.//Биохимия. 1988. Т. 53. № 8. С. 1344—1351.
53. Остерман А. Л., Руденская Г. Н., Степанов В. М., Ходова О. М., Цаплина И. А., Яковлева М. Б., Логинова Л. Г.//Биохимия. 1984. Т. 49. № 2. С. 292—301.
54. Руденская Г. Н., Крейер В. Г., Ландау Н. С., Тарасова Н. И., Тимохина Е. А., Егоров Н. С., Степанов В. М.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 12. С. 2002—2008.
55. Сарбаканова Ш. Т., Дунаевский Я. Е., Белозерский М. А., Руденская Г. Н.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. С. 1263—1269.
56. Крестьянова И. Н., Руденская Г. Н., Уваров Н. Н.//III Симпозиум «Химия протеролитических ферментов. Тезисы докл. М., 1993. С. 60.
57. Крестьянова И. Н., Уваров Н. Н., Руденская Г. Н., Цибанов В. В., Васильева Л. И., Степанов В. М.//Биохимия. 1990. Т. 55. № 12. С. 2226—2238.
58. Крейер В. Г. Внеклеточные протеролитические ферменты *Str. spheroides*, шт. 35: Автореферат канд. дисс. М., 1985.
59. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Руденская Г. Н., Гончар М. В., Лобарева Л. С., Котлова Е. К.//Биохимия. 1976. Т. 41. № 8. С. 1285—1290.
60. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Адли К., Гончар М. В., Баландина Г. Н., Славинская М. М., Стронгин А. Я.//Биохимия. 1976. Т. 41. № 2. С. 294—302.
61. Руденская Г. Н., Иголкина Л. А., Слуцкая Т. Н.//I Всес. совещание «Биологически активные вещества при комплексной утилизации гидробионтов». Владивосток, 1988. С. 13—19.
62. Авенирова Е. Л., Руденская Г. Н., Филиппова И. Ю., Степанов В. М.//Биохимия. 1992. Т. 57. № 8. С. 1222—1229.
63. Ковалева Г. Г., Юсупова М. П., Лысогорская Е. Н., Баландина Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1977. Т. 42. № 4. С. 534—539.
64. Остославская В. И., Котлова Е. К., Степанов В. М., Руденская Г. Н., Баратова Л. А., Белянова Л. П.//Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 4. С. 595—603.
65. Руденская Г. Н., Гайда А. В., Степанов В. М.//Биохимия. 1980. Т. 45. № 4. С. 565—572.
66. Mortensen S. B., Thim L., Christensen T., Woeldike H., Boel E., Hjortshoej K., Hansen M. T.//J. Chromatogr. 1989. V. 476. P. 227—233.
67. Гайда А. В., Остерман А. Л., Руденская Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1981. Т. 46. № 1. С. 181—189.
68. Белозерский М. А., Дунаевский Я. Е., Руденская Г. Н., Степанов В. М.//Биохимия. 1984. Т. 49. № 3. С. 479—485.
69. Сарбаканова Ш. Т., Белозерский М. А., Дунаевский Я. Е., Заиров С. З.//Биохимия. 1988. Т. 53. № 5. С. 768—774.
70. Filippova I. Yu., Lysogorskaya E. N., Oksenoit E. S., Rudenskaya G. N., Stepanov V. M.//Anal. Biochem. 1984. V. 143. P. 293—297.

Поступила в редакцию
8.VII.1993

G. N. Rudenskaya

AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF PROTEOLYTIC ENZYMES

M. V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry

Studies on the affinity chromatography of proteinases as the most efficient approach to their separation are reviewed. The paper contains discussion of the methods used to prepare affinity sorbents by attaching gramycidin and bacitracin to various supports. The two cyclopeptides contain amino acid residues, meeting specificity requirements of proteinases of various classes, these materials thus being affinity sorbents of general type. Rules governing the interaction of proteinases with these sorbents are discussed, along with numerous examples of their chromatography on sorbents of general type as well as on more specific sorbents adapted to the separation of particular types of proteinases. Sorbents containing benzylsuccinic, benzylmalonic and phenylboronic acid residues are considered in details.