



УДК 577.156.41 + 577.15.07

## ГРАМИЦИДИН S КАК СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЛИГАНД В АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КАРБОКСИЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ

Степанов В. М., Лобарева Л. С., Руденская Г. Н.,  
Боровикова В. П., Ковалева Г. Г., Лавренова Г. И.

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

химический факультет Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова

Грамицидин S успешно использован в качестве лиганда для аффинной хроматографии различных карбоксильных протеиназ, которые, по-видимому, взаимодействуют с гидрофобными аминокислотными остатками этого антибиотика — циклодекапептида, устойчивого к протеолизу. Сорбенты были получены присоединением грамицидина S к сефарозе 4В (или 6В), активированной бромцианом. Содержание грамицидина S в сорбентах варьировало в пределах 0,35—2 мкмоль/мл. Сорбция ферментов на таких сорбентах из кислых растворов (рН 1,7—5,3) с последующей элюцией раствором 1 М хлористого натрия, содержащим до 25% изопропилового спирта, приводит к существенному возрастанию активности фермента. Осуществлена аффинная хроматография свиного пепсина, пепсина из желудочного сока лошади, карбоксильной протеиназы из *Asp. awamori*, карбоксильной протеиназы из насекомоядного растения *Nepenthes*, смеси бычьего пепсина и химозина. Выходы, определенные по активности, находились в пределах 60—100%.

Для аффинной хроматографии пепсина (КФ 3.4.4.1) и некоторых других карбоксильных протеиназ нашли применение сорбенты, полученные присоединением к активированной бромцианом сефарозе специфических пептидных лигандов — аналогов субстратов [1]. Мы обратили внимание на то, что антибиотик циклопептид-грамицидин S имеет структурные черты, сближающие его с субстратами пепсина и других карбоксильных протеиназ. В его молекуле преобладают остатки гидрофобных аминокислот (лейцин, валин, фенилаланин), способные вносить определяющий вклад в специфическое взаимодействие с ферментом. С другой стороны, присутствие остатков D-фенилаланина, пролина и характерные для циклопептида особенности пространственной структуры могут блокировать расщепление пептидных связей в уже образовавшемся фермент-субстратном комплексе. Не исключено, что грамицидин S может выступать в качестве ингибитора — аналога субстрата карбоксильных протеиназ. К сожалению, прямая проверка такого предположения затруднена из-за весьма низкой растворимости грамицидина S в воде. Исходя из этих представлений, мы решили исследовать взаимодействие грамицидина S, ковалентно связанного с сефарозой, с рядом карбоксильных протеиназ и проверить возможность использования его в качестве специфического лиганда для аффинной хроматографии этих ферментов.

Для присоединения грамицидина S к сефарозе 4В или 6В, предварительно активированной бромцианом по методике Пората и сотр. [2], необ-

Результаты хроматографии на грамицидин S-сефарозе

Ферменты	Выход по активности, %	Удельная активность, ед./опт. ед.		Степень очистки, % раз	Количество грамицидина S, мкмоль на 1 мл влажного сорбента
		исходная	полученная		
Пепсин свиный лабораторный коммерческий:	93	48,4	64,8	1,1	2
1-я хроматография	100	19,0	51,5	2,7	2
2-я »	100	51,5	76,4	1,5	2
Пепсин лошади	92	2,8	47,4	17	0,6
Нелентесин	100	1,1	7,6	7	0,6
Аспергиллопепсин А	60	0,4 *	24 *	60	0,6
Сычужный фермент	62	2750 **	15 000 **	5,5	0,35

\* В ед./мг белка.

\*\* Активность по створаживанию молока, ед./опт. ед.

ходимо применять сравнительно большой избыток антибиотика. Грамицидин S, по-видимому, связывается с активированной сефарозой за счет δ-аминовых групп остатков орнитина. Его содержание в полученных сорбентах зависит от условий активации сефарозы и присоединения антибиотика и составляет, по данным аминокислотного анализа кислотных гидролизатов, 0,35—2 мкмоль на 1 мл влажного геля. Сорбенты устойчивы при длительном хранении на холоду и могут быть использованы многократно. Заметных различий хроматографических свойств сорбентов, полученных на основе сефарозы 4В или 6В, не наблюдалось. В то же время условия сорбции и особенно десорбции ферментов существенно зависят от содержания грамицидина S в том или ином образце сорбента.

Свиной пепсин легко связывается грамицидин S-сефарозой при pH 5. Для образца, содержащего 2 мкмоль грамицидина S на 1 мл сорбента, насыщение колонки составляет 0,5 мкмоль пепсина на 1 мл сорбента, что отвечает соотношению фермент — лиганд 1 : 4. Хорошая очистка пепсина достигается, однако, при меньшей нагрузке колонки — 0,3 мкмоль пепсина на 1 мл сорбента. Пепсин элюируется с практически количественным выходом 25% раствором изопропилового спирта в 1 М NaCl. Роль спирта при этом, очевидно, состоит в подавлении гидрофобных взаимодействий пепсина и грамицидина S. Присутствие относительно высоких концентраций соли также необходимо для десорбции фермента. Вероятно, в связывании фермента с сорбентом определенную роль играют ионные взаимодействия (ср. [1]), подавляемые при высокой ионной силе элюирующего раствора. Можно предполагать, что сорбенты с ковалентно связанным грамицидином S, как и описанные ранее сорбенты с короткими пептидными лигандами, взаимодействуют с пепсином с кооперативным участием гидрофобных контактов, ионных сил, а возможно, и водородных связей с пептидными группировками.

Хроматография на грамицидин S-сефарозе, как показывают рис. 1 и таблицы, позволяет добиться отделения небольшого количества примесей (очевидно, продуктов автолиза) даже от высокоочищенных препаратов свиного пепсина; полученных хроматографией на DEAE-целлюлозе. Коммерческий препарат свиного пепсина удается очистить 2-кратной хроматографией в 4 раза с практически количественным выходом.

Грамицидин S-сефароза оказалась весьма эффективной и при выделении пепсина из желудочного сока лошади. Выход по активности и в этом случае был близок к количественному, а удельная активность возросла в 17 раз. Сорбцию пепсина лошади можно осуществлять непосредственно

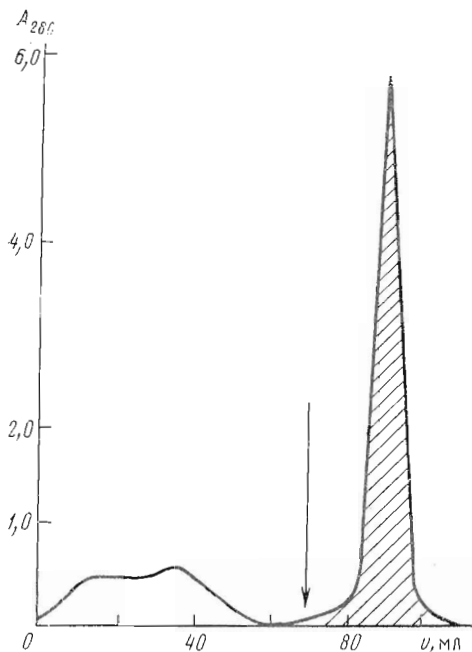


Рис. 1

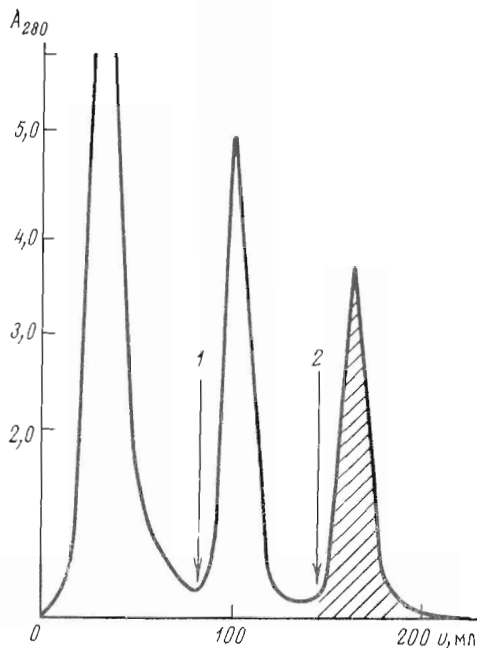


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография коммерческого препарата пепсина свиньи на грамицидин S-сефарозе 4В. Колонка ( $5 \times 0,8$  см) уравновешена 0,1 М ацетатным буфером, рН 5. Нанесено 50 мг белка (950 ед. акт.) в 50 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5. Стрелкой показано начало элюции 25% изопропиловым спиртом в 1 М NaCl на 0,1 М ацетатном буфере, рН 5. По оси ординат отложена оптическая плотность при 280 нм, по оси абсцисс — объем элюата в мл. Заштрихован пик, содержащий активность

Рис. 2. Хроматография аспергиллопепсина А на грамицидин S-сефарозе 4В. Колонка ( $0,8 \times 9,5$  см) уравновешена 0,1 М ацетатным буфером, рН 4,5. Нанесено 2 г препарата (800 ед. акт.) в 20 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 4,5. Стрелки показывают начало элюции: 1 — 1 М NaCl в том же буфере; 2 — 10% изопропиловым спиртом в 1 М NaCl на 0,1 М ацетатном буфере, рН 4,5

из желудочного сока при рН 1,7, что делает особенно удобным применение грамицидин S-сефарозы уже на первой стадии очистки в статических условиях. Если в случае свиного пепсина хроматография на грамицидин S-сефарозе позволяет получить практически чистый фермент, то при очистке пепсина лошади аффинная хроматография дает сумму множественных форм фермента [3], для разделения которых необходимо использовать другие приемы.

Хорошие результаты дает применение грамицидин S-сефарозы для выделения суммы пепсина и химозина телянка из промышленного препарата сычужного фермента, в котором особенно велико содержание неактивных примесей. Выход смеси протеиназ составляет при этом 62%, степень очистки — 5,5 раза. Дальнейшее разделение смеси функционально близких ферментов целесообразно проводить, используя различия в изоэлектрических точках ферментов.

Применение грамицидин S-сефарозы для очистки аспергиллопепсина А — карбоксильной протеиназы, образуемой грибом *Asp. awamori*, — позволило значительно снизить трудоемкость очистки при одновременном уменьшении потерь. За одну операцию достигается 60-кратное увеличение удельной активности, выход составляет 65% (рис. 2). Полученный препарат содержит примесные белки, от которых он может быть освобожден хроматографией на ЭКТЕОЛА-целлюлозе.

В качестве еще одного примера применения хроматографии на грамицидин S-сефарозе для очистки карбоксильных протеиназ укажем на вы-

деление карбоксильной протеиназы из сока кувшинчиков насекомоядного растения *Nepenthes* — непентесина [4]. В этом случае было достигнуто 7-кратное повышение удельной активности фермента (таблица). Не исключено, что грамицидин S-сефароза в определенных условиях может связывать белки, не являющиеся протеиназами, по механизму гидрофобной хроматографии.

Хроматография на грамицидин S-сефарозе может быть применена для большинства карбоксильных протеиназ. Результаты, получаемые при использовании этого сорбента, вполне сравнимы с теми, которые могут быть достигнуты на сорбентах, содержащих синтетические пептидные лиганды. В то же время грамицидин S вполне доступен, устойчив, и его использование для получения специфических сорбентов во многих случаях окажется более удобным, чем применение пептидов, требующих специального, хотя обычно и несложного, синтеза. Есть все основания полагать, что грамицидин S-сефароза может служить аффинным сорбентом и для протеиназ других классов. Недавно Т. И. Вагановой и сотрудниками в нашей лаборатории было показано, что грамицидин S-сефароза дает хорошие результаты при выделении некоторых металлопротеиназ бактериального происхождения [5].

### Экспериментальная часть

Использовали коммерческий препарат пепсина свиньи, выпускаемый Московским мясокомбинатом, с уд. акт. 19 ед./опт. ед. по расщеплению гемоглобина и пепсин, полученный из этого препарата хроматографией на DEAE-целлюлозе [6], с уд. акт. 48,4 ед./опт. ед.

В качестве источника пепсина лошади употребляли желудочный сок, полученный зондированием и не содержащий консервантов, с pH 1,7 и уд. акт. 2—3 ед./опт. ед.

Для выделения непентесина применяли сок из кувшинчиков насекомоядного растения *Nepenthes* с pH 3,5 и уд. акт. 1,1 ед./опт. ед.

Исходным материалом для выделения аспергиллопепсина А служил препарат, полученный высаливанием экстракта поверхностной культуры *Asp. awamori*, штамм 22, сульфатом аммония (80% насыщения), растворением осадка в воде, обессоливанием и лиофильным высушиванием.

Использовали препарат сычужного фермента с уд. акт. 2750 ед./опт. ед. по створаживанию молока.

Протеолитическую активность определяли по модифицированному методу Ансона [7], принимая за единицу такое количество фермента, которое в стандартных условиях вызывает увеличение  $A_{280}$  на единицу. Активность (А) по створаживанию молока определяли по методу [8] и рассчитывали по формуле  $A$  (ед./мл) =  $2000/t$ , где  $t$  — время створаживания, с.

**Грамицидин S-сефароза 6В.** Для получения сорбента сефарозу 6В (Pharmacia, Швеция) активировали по методике, предложенной Поратом и сотр. [2]. К 100 мл декантированной сефарозы 6В, промытой водой и 2,5 М фосфатным буфером (pH 11), прибавляли 150 мл 5 М фосфатного буфера (pH 11), затем при 8° в течение 2 мин раствор 6 г бромциана в 3 мл ацетонитрила и 57 мл воды. Через 10 мин (при 10°) гель отфильтровывали и промывали на холоду водой, 0,1 н.  $\text{NaHCO}_3$ , 50% диметилформамидом в 0,1 н.  $\text{NaHCO}_3$ , а затем прибавили к раствору 2 г грамицидина S в 60 мл диметилформамида и 20 мл 0,1 н.  $\text{NaHCO}_3$ . Через 24 ч (при 4°) сорбент отфильтровали и промыли 50% раствором диметилформамида в 0,1 н.  $\text{NaHCO}_3$ , 50% диметилформамидом, водой, а перед опытом — всеми растворами, которые в данном опыте используются для элюции фермента. Содержание грамицидина S — 0,6 мкмоль/мл влажного сорбента. Синтез грамицидина S-сефарозы 4В проводился аналогично.

**Хроматография коммерческого препарата пепсина свиньи на грамицидин S-сефарозе 4В.** На колонку, содержащую 2 мл сорбента с концентраци-

ей лиганда 2 мкмоль/мл, уравновешенную 0,1 М ацетатным буфером (рН 5), наносили 50 мг препарата пепсина с уд. акт. 19 ед./опт. ед. в 50 мл того же буфера. Колонку промывали исходным буфером, при этом элюировались балластные белки (см. рис. 1). Десорбцию фермента проводили 25% изопропиловым спиртом в 1 М NaCl на 0,1 М ацетатном буфере, рН 5. Количество полученного фермента составляет 50% общего количества нанесенного белка, выход по активности 100%, уд. акт. 51,5 ед./опт. ед. Хроматография других ферментов осуществлялась аналогично. Условия даны в подписях к рисункам и в таблице.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Черная М. М., Адли К., Лавренова Г. И., Степанов В. М. (1976) Биохимия, 41, 732—739.
2. Porath G., Aspberg K., Drevin H., Axen R. (1973) J. Chromatography, 86, 53—58.
3. Степанов В. М., Лавренова Г. И., Руденская Г. Н., Гопчар М. В., Лобарева Л. С., Котлова Е. К., Стронгин А. Я., Баратова Л. А., Беляева Л. П. (1976) Биохимия, 41, 1285—1290.
4. Лобарева Л. С., Руденская Г. Н., Степанов В. М. (1973) Биохимия, 38, 640—642.
5. Ваганова Т. И., Ластоведская Л. В., Стронгин А. Я., Люблинская Л. А., Степанов В. М. (1976) Биохимия, 41, 2229—2237.
6. Степанов В. М., Ваганова Т. И. (1963) Биохимия, 28, 540—543.
7. Anson M. D. (1938) J. Gen. Physiol., 22, 79—83.
8. Алексеев Л. П. (1968) в кн. Современные методы в биохимии (под ред. Ореховича В. Н.), «Медицина», М.

Поступила в редакцию  
16.XI.1976

#### GRAMICIDIN S AS A SPECIFIC LIGAND FOR AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF CARBOXYLIC PROTEINASES

STEPANOV V. M., LOBAREVA L. S., RUDENSKAYA G. N.,  
BOROVIKOVA V. P., KOVALEVA G. G., LAVRENOVA G. I.

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

Gramicidin S was successfully used as a ligand for affinity chromatography of various carboxylic proteinases, which probably interact with hydrophobic amino acid residues of this antibiotic, cyclic decapeptide, resistant to proteolysis. The sorbents were prepared by gramicidin S attachment to CNBr-activated Sepharose 4B or 6B, whereby ligand content varied from 0,35 to 2  $\mu\text{mol/ml}$ . The binding of the enzymes at pH 1,7-5,3 on the sorbents and subsequent elution with acidic 1 M NaCl solution containing up to 25 per cent of isopropyl alcohol resulted in substantial increase in enzymatic activity: 5-fold for swine pepsin, 17-for pepsin from horse gastric juice, 60-for carboxylic proteinase from *Asp. awamori*, 7-for carboxylic proteinase from carnivorous plant *Nepenthes*, and 5,5-for mixture of bovine pepsin and chymosin. The yields calculated on activity basis ranged from 60 to 100 per cent.