



УДК 543.544 : 547.963

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ****II. ОЧИСТКА ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ В ГЛАДКИХ МЫШЦ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
НА ГЛИКОГЕН-СЕФАРОЗЕ****Викторова Л. Н., Блящицкий В. А., Раменский Е. В.**Институт биологической и медицинской химии
Академии наук СССР, Москва*

Разработан метод очистки гликогенфосфорилазы В (КФ 2.4. 1.1) из миометрия коровы. Метод включает экстракцию раствором $\text{NaF} - \text{EDTA}$, фракционирование серноокислым аммонием, образование гликоген-белкового комплекса и гидрофобную хроматографию на аминогексилсефарозе. Заключительной стадией очистки, обеспечивающей электрофоретическую гомогенность фермента, явилась аффинная хроматография на гликоген-гидразидосукцинилсефарозе. Элюция гликогенфосфорилазы В с биоспецифического адсорбента в присутствии АМР и P_i сопровождалась фосфорилизом иммобилизованного гликогена. Выход фермента в расчете на неочищенный экстракт миометрия составлял 12% со степенью очистки 2500 раз.

В предыдущей статье [1] описана аффинная хроматография мРНК на биоспецифических адсорбентах с полисахаридными вставками. Иммобилизованный полисахарид может быть использован также в качестве лиганда при очистке биополимеров, имеющих сродство к данному полисахариду. В настоящей работе описан метод очистки гликогенфосфорилазы В из миометрия коровы, включающий аффинную хроматографию на гликоген-ГСФ.

Гомогенный препарат гликогенфосфорилазы гладких мышц был получен сравнительно недавно [2, 3] трудоемким и многостадийным процессом, который приводил к низкому выходу фермента. Возникла необходимость разработки нового метода, дающего больший выход фосфорилазы.

Предварительную очистку фосфорилазы гладких мышц вплоть до образования гликоген-белкового комплекса и его выделения с помощью ультрацентрифугирования проводили так, как описано ранее [2, 3]. На следующем этапе очистки применяли гидрофобную хроматографию на АГ-сефарозе, успешно использованную при выделении гликогенфосфорилазы скелетных мышц и печени [4—6].

Нами установлено, что наилучшие результаты при гидрофобной хроматографии фосфорилазы гладких мышц давала АГ-сефароза, содержащая 1,3 мкмоль аминогексильных групп на 1 мл адсорбента. Она была синтезирована стандартным методом [7] с использованием для активации

* Сообщение I см. [1]. Сокращения: АГ-сефароза — ω -аминогексилсефароза; ГСФ — гидразидосукцинилсефароза.

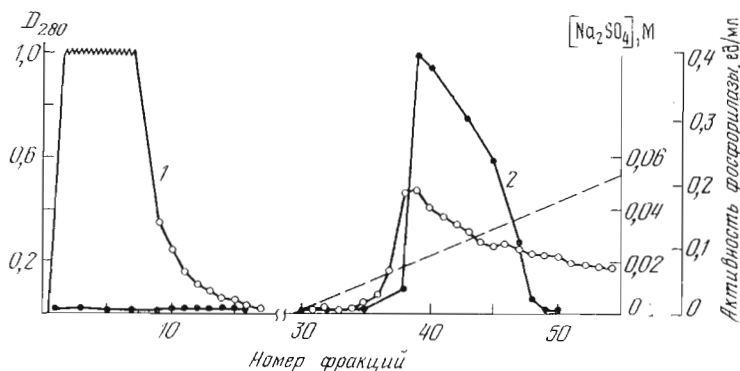


Рис. 1. Хроматография гликогенфосфорилазы Б миометрия коровы на АГ-сефарозе. Условия хроматографии приведены в тексте. 1 — D_{280} , 2 — активность фосфорилазы

0,3 г CNBr на 10 мл сефарозы. В наших условиях эта концентрация аминоксильных групп была оптимальной в отношении адсорбции и десорбции фосфорилазы Б гладких мышц (рис. 1). При большем содержании аминоксильных групп (4—10 мкмоль/мл геля) происходило прочное связывание фермента с адсорбентом, затрудняющее последующую элюцию. Полученные данные можно связать с представлениями о «критической» и «избыточной» гидрофобности адсорбента [5], а также с влиянием величины положительного заряда гидрофобного геля на адсорбцию белков [8].

Элюция фермента достигалась линейным градиентом сернокислого натрия. Аналогичная хроматография гликогенфосфорилазы печени кролика на АГ-сефарозе приводила к практически чистому ферменту [6]. В случае фосфорилазы Б миометрия гидрофобная хроматография оказалась менее эффективной. При электрофоретическом анализе фракций с фосфорилазой активностью было установлено, что полученный препарат фермента неомогенен (рис. 2а). Для дальнейшей очистки фермента использовали аффинную хроматографию на гликоген-ГСФ.

Синтез гликоген-ГСФ описан в предыдущей статье [4]. В отличие от других методов иммобилизации гликогена на сефарозе [9, 10] он сводил к минимуму количество катионных зарядов и гидрофобность адсорбента, что позволяло рассчитывать на истинно биоспецифический характер адсорбции гликогенфосфорилазы. При нанесении на колонку с этим адсорбентом частично очищенного препарата имела место адсорбция фермента. Емкость адсорбента составляла 100 мкг фосфорилазы Б на 1 мл геля.

Следует отметить, что адсорбент, полученный присоединением активированного бромцианом гликогена к аминоэтилсефарозе, не связывал гликогенфосфорилазу скелетных мышц [10]. Адсорбция фермента на аналогичных адсорбентах с более длинными аминоксильными вставками (C_6 — C_8) объяснялась гидрофобными взаимодействиями. Неэффективность этих адсорбентов для биоспецифического связывания гликогенфосфорилазы, на наш взгляд, можно объяснить значительной модификацией структуры гликогена после обработки его BrCN. Поэтому для активации гликогена мы применили более мягкий способ частичного периодатного окисления. Тем не менее емкость гликоген-ГСФ была недостаточно высокой, что обусловлено, очевидно, модификацией некоторых участков в молекуле гликогена, ответственных за связывание с гликогенфосфорилазой. Кроме того, часть невозстанавливаемых концевых остатков глюкозы боковых цепей гликогена, иммобилизованного на сефарозе, может быть недоступна для фермента из-за стерических трудностей.

Первоначально для десорбции фосфорилазы с гликоген-ГСФ была применена конкурентная элюция [9] 0,4 % раствором гликогена. Фермент количественно десорбировался с колонки, однако оказался электрофоретиче-

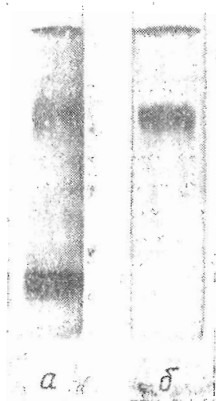


Рис. 2. Диск-электрофорез в полиакриламидном геле гликогенфосфорилазы Б миометрия коровы: *a* — препарат после хроматографии на АГ-сефарозе; *b* — препарат после аффинной хроматографии на гликоген-ГСФ

ски неоднородным. Попытки элюировать гликогенфосфорилазу градиентом Na_2SO_4 в буфере Б или 0,4 М имидазол-цитратным буферным раствором, содержащим $5 \cdot 10^{-2}$ М меркаптоэтанол и 10^{-3} М EDTA (рН 7,4), или 0,1 М раствором глюкозо-6-фосфата в буфере Б не приводили к количественной десорбции и гомогенному препарату фосфорилазы. Электрофоретически гомогенный фермент (рис. 2б) был выделен при элюции буфером Б, содержащим 10 мМ АМР, аллостерический активатор фосфорилазы гладких мышц [2, 3] (рис. 3).

Элюция фермента началась после прохождения через колонку нескольких объемов элюента, а затем фермент выходил в виде широкого пика в 8—10 объемах колонки в течение 30 ч. В большинстве случаев, особенно для колонок большого объема, после 1—2 циклов очистки адсорбент терял способность связывать гликогенфосфорилазу. Характер кривой элюции позволял предположить фосфорилиза боковых цепей гликогена в процессе десорбции, в результате чего фермент терял сродство к лиганду.

Для подтверждения такой возможности инкубировали 30 ч при 4° нативный и окисленный периодатом натрия гликоген с гликогенфосфорилазой в буфере Б, содержащем 10 мМ АМР. В обоих случаях в реакционной смеси после ультрафильтрации и кислотного гидролиза была обнаружена D-глюкоза.

Протекание ферментативной реакции в растворе и на колонке оказалось возможным ввиду присутствия примеси P_1 в использовавшемся препарате АМР, составлявшей 0,2 мол. %. Концентрация P_1 в элюирующем буферном растворе была достаточной для полного фосфорилиза ферментсвязывающих участков адсорбента за 1—2 цикла очистки. При попытке элюции с адсорбента буфером Б с 10 мМ перекристаллизованным АМР, не содержащим P_1 , в элюате не было обнаружено фосфорилазной активности, однако после добавления в указанный буферный раствор P_1 ($\sim 0,02$ мМ) гликогенфосфорилаза элюировалась с колонки.

Таким образом, десорбция фосфорилазы Б гладких мышц с гликоген-ГСФ достигалась в результате фосфорилиза боковых цепей иммобилизованного лиганда. Ламед с сотр. [11] назвали хроматографический процесс, при котором происходит необратимая реакция между адсорбированным ферментом и иммобилизованным лигандом, динамической аффинной хроматографией. Тип элюции, описанный в настоящей работе, можно

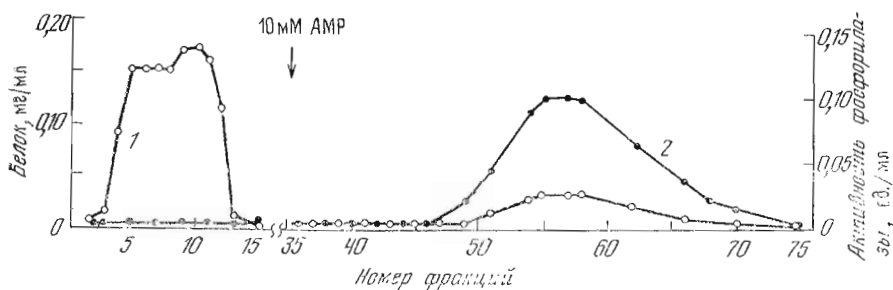


Рис. 3. Аффинная хроматография гликогенфосфорилазы Б миометрия коровы на гликоген-ГСФ. Условия хроматографии приведены в тексте. 1 — концентрация белка, 2 — активность фосфорилазы

Очистка гликогенфосфорилазы гладких мышц

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, ед. **	Удельная активность, ед./мг белка	Степень очистки	Выход, %
Экстракт*	83125	133	0,0016	1	100
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄	13714	86	0,0063	4	65
Гликоген-белковый комплекс	234	47	0,200	125	35
Хроматография на АГ-сефарозе	28	28	1,00	625	21
Аффинная хроматография на гликоген-ГСФ	4	16	4,00	2500	12

* Из 4 кг миометрия коровы.

** За единицу активности принято количество фермента, отщепляющее 1 мкмоль P_i в минуту.

назвать динамической биоспецифической элюцией. Применение «динамической биоспецифической элюции» снижает препаративные возможности метода, но, с другой стороны, открывает новые пути использования аффинной хроматографии для изучения некоторых аспектов ферментативных реакций.

Результаты процесса очистки гликогенфосфорилазы Б миометрия приведены в таблице. Выход фермента, считая на неочищенный экстракт миометрия, составлял 12% со степенью очистки 2500 раз.

Экспериментальная часть

В работе использовали 1,6-диаминогексан (Koch-Light, Англия), АМР и EDTA (Reanal, Венгрия). Данные об остальных материалах приведены в предыдущей статье [1]. Концентрацию белка определяли методом Лоури [12], используя в качестве стандарта сывороточный альбумин, или спектрофотометрически (коэффициент поглощения гликогенфосфорилазы $\epsilon_{280}^{1\%}$ 13,1) [13]. Активность фосфорилазы определяли методом Ильянгворс и Кори [14]. Для ультрафильтрации использовали ячейку Diaflo (Amicon, США) с фильтром XM-100. Диск-электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Орнштейну и Дэвису [15]. Степень замещения ω -аминогексильными группами в АГ-сефарозе определяли спектрофотометрически после обработки геля тринитробензолсульфокислотой и солиubilизации образовавшегося продукта [16].

В работе использовали буферные растворы: 8 мМ трис-НСl, 1 мМ EDTA, 1 мМ меркаптоэтанол, рН 7,2 (буфер А), и 10 мМ трис-ацетат, рН 7,4 (буфер В).

АГ-сефароза. К 40 мл ВгСN-активированной сефарозы [1], полученной добавлением 0,3 г ВгСN на 10 мл сефарозы, приливали при 4° и перемешивании раствор 80 ммоль 1,6-диаминогексана в 40 мл воды, предварительно доведенный до рН 10 с помощью 6 н. НСl. Суспензию перемешивали 16 ч при 4°, промывали на фильтре 400 мл 0,1 М NaHCO₃, 400 мл воды, 400 мл 0,1 М НСl и 400 мл воды. Полученный адсорбент содержал 1,3 мкэкв. ϵ -аминогексильных групп на 1 мл геля.

Выделение и предварительная очистка гликогенфосфорилазы. 4 кг освобожденных от жира и крови маток коровы измельчали, фермент экстрагировали в течение 2 ч при охлаждении 50 мМ NaF — 1 мМ EDTA, рН 7. Последующее фракционирование сернокислым аммонием и получение гликоген-белкового комплекса (234 мг белка) проводили как описано ранее [2, 3].

Гидрофобная хроматография фосфорилазы на АГ-сефарозе. Гликоген-белковый комплекс, полученный выше, суспендировали в 70 мл буфера А,

диализовали против того же буферного раствора и наносили на колонку ($28 \times 1,5$ см) с АГ-сефарозой, уравновешенную буфером А при 4° . Затем колонку промывали буфером А для удаления несвязавшегося белка и гликогена. Элюцию фосфорилазы проводили линейным градиентом 0,5 л буфера А и 0,5 л буфера А с $0,2 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$ при скорости тока через колонку 22 мл/ч (объем фракций 11 мл). Фракции с фосфорилазной активностью объединяли и концентрировали до 50 мл.

Аффинная хроматография фосфорилазы на гликоген-ГСФ. Раствор препарата, полученного после гидрофобной хроматографии (50 мл, 27,6 мг белка), диализовали против буфера Б и наносили на колонку с гликоген-ГСФ ($26 \times 1,5$ см), уравновешенную буфером Б при 4° . Скорость тока через колонку была 10 мл/ч, объем фракций 10 мл. Неадсорбированные белки отмывали тем же буферным раствором при скорости тока 15 мл/ч. Затем колонку промывали буфером Б, содержащим 10 мМ АМР. Скорость тока 10 мл/ч. Полученные фракции диализовали против буфера Б. Фракции, содержащие гликогенфосфорилазу, объединяли и концентрировали.

Авторы приносят благодарность Д. М. Беленькому за полезное обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клящицкий Б. А., Королева Г. Е., Митина В. Х., Алехина Р. П., Зборовская И. Б., Лихтенштейн А. В. (1979) *Биоорганическая химия*, 5, 92—99.
2. Викторова Л. Н., Раменский Е. В. (1975) *Докл. АН СССР*, 222, 1463—1466.
3. Viktorova L. N., Ramensky E. V. (1974) in: *Abstracts of Joint USA-USSR Symposium on Biological Pyridoxal Catalysis*, p. 161, Leningrad.
4. Er-El Z., Zaidenzaig Y., Shatiel S. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 49, 383—390.
5. Jenissen H. P., Heilmeyer L. M. G., Jr. (1975) *Biochemistry*, 14, 754—759.
6. Livanova N. B., Eronina T. B., Silonova G. V., Ramensky E. V. (1976) *FEBS Lett.*, 69, 95—98.
7. Cuatrecasas P. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3059—3065.
8. Wilchek M., Miron T. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 72, 108—113.
9. Tkachuk R. (1975) *FEBS Lett.*, 52, 66—69.
10. Schatiel S. (1974) in: *Methods in Enzymology* (Jacoby W. B., Wilchek M., eds), vol. XXXIV, pp. 126—140, Acad. Press, N. Y.
11. Lamed R., Levin Y., Oplatka A. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, 305, 163—171.
12. Lowry R., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275.
13. Kastenschmidt L., Kastenschmidt J., Helmreich E. (1968) *Biochemistry*, 7, 3590—3607.
14. Illingworth B., Cori C. F. (1953) in: *Biochem. Prep.* (Snell E. E., ed.), vol. 3, pp. 4—7, N. Y. — London.
15. Ornstein L., Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 305—320.
16. Failla D., Santi D. V. (1973) *Anal. Biochem.*, 52, 363—368.

Поступила в редакцию
11.IV.1978

ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY. II. PURIFICATION OF SMOOTH MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE *b* USING BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON GLYCOGEN-SEPHAROSE

VIKTOROVA L. N., KLYASHCHITSKII B. A., RAMENSKY E. V.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A new method for purification of glycogen phosphorylase *b* (EC 2.4.1.1) from cow uterus has been developed. The procedure included extraction by NaF-EDTA solution. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, preparation of a glycogen-enzyme complex and hydrophobic chromatography on aminohexyl-Sepharose. Affinity chromatography on glycogen-hydrazidosuccinyl-Sepharose enabled the isolation of the enzyme in electrophoretically homogeneous state. The elution of homogeneous phosphorylase *b* in the presence of AMP₁ and P₁ was accompanied by phosphorolysis of the immobilized glycogen. The enzyme was purified about 2500-fold in 12% overall yield.