



УДК 577.15.013

**АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ***Яварковская Л. Л., Осипов А. П., Егоров А. М.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет*

Изучено удерживание NAD-зависимой формиатдегидрогеназы из грамотрицательных мезофильных бактерий на колонке с АН-сефарозой, содержащей кофактор в окисленной и восстановленной форме. Из хроматографических данных определены константы связывания фермента с иммобилизованным и свободным кофактором. Аффинной хроматографией на NADH-сефарозе в одну стадию проведено выделение формиатдегидрогеназы из гомогената бактерий с выходом 44% и степенью очистки 10,8 раза.

Аффинная хроматография на матрицах, содержащих иммобилизованные лиганды, широко используется для очистки дегидрогеназ. Наиболее детально разработаны способы получения сорбентов с иммобилизованными пиридиндинуклеотидами [1, 2]. Одним из основных требований к получаемым сорбентам является специфичность и эффективность взаимодействия иммобилизованного кофактора с ферментом. Из данных рентгеноструктурного анализа комплексов никотинамидадениндинуклеотида с рядом дегидрогеназ [3] и сравнительного изучения влияния способа пришивки молекул кофактора к носителям [2] следует, что С(6)-аминогруппа аденинового кольца не взаимодействует с белковой глобулой, а следовательно, через нее можно осуществлять пришивку молекул кофактора к носителю с сохранением специфической активности.

В настоящей работе осуществлена иммобилизация NAD через его С(6)-аминогруппу на сефарозе 4В. Носитель с восстановленной формой кофактора использован для одностадийного выделения формиатдегидрогеназы из гомогената грамотрицательных мезофильных бактерий, штамм № 1 [4], и определения количественных характеристик связывания фермента с иммобилизованным кофактором.

Для получения иммобилизованного на сефарозе кофактора было использовано два подхода: 1) к активированной ВrCN-сефарозе 4В пришивали N⁶-[N-(6-аминогексил)ацетамид]-NAD, 2) осуществляли связывание N⁶-карбоксиметил-NAD с аминогруппами АН-сефарозы. Полученные препараты практически не отличались по содержанию связанного кофактора (~1 мкмоль/г влажного геля) и по своим хроматографическим свойствам.

Так как константы связывания окисленной и восстановленной форм кофактора с формиатдегидрогеназой сильно различаются между собой (соответственно $2,2 \cdot 10^{-4}$ и $2,0 \cdot 10^{-5}$ М [5]), было изучено удерживание фермента на колонке с иммобилизованными окисленной и восстановленной формами кофактора. При нанесении формиатдегидрогеназы на колон-

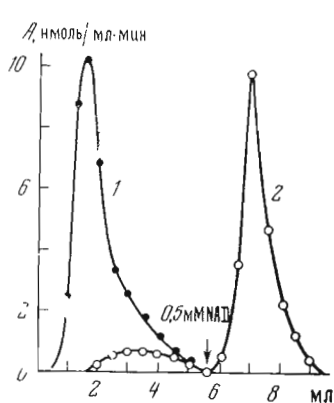


Рис. 1

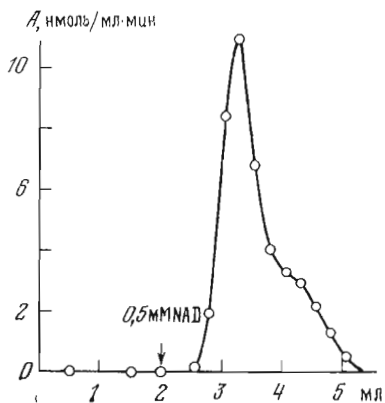


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография формиатдегидрогеназы на колонке (0,24×16 см) с NAD-сефарозой (1) и NADH-сефарозой (2)

Рис. 2. Хроматография формиатдегидрогеназы на колонке (0,24×16 см) с NAD-сефарозой, уравновешенной KN_3 (1 мкМ)

ку с NAD-сефарозой фермент удерживался носителем слабо и смывался полностью при пропускании 10-кратного объема рабочего буфера (рис. 1). Действительно, учитывая, что концентрация иммобилизованного NAD лишь в несколько раз превышает константу связывания фермента с кофактором, а концентрация фермента в растворе после нанесения на колонку составляет $\sim 10^{-7}$ — 10^{-8} М, можно показать, что значительная часть фермента в этих условиях всегда будет находиться в несвязанном виде, а следовательно, фермент не будет прочно удерживаться носителем. Для того чтобы сорбция фермента проходила более эффективно, необходимо либо увеличивать концентрацию иммобилизованного лиганда на носителе, либо улучшать связывание фермента с лигандом. Так как количество иммобилизованного на носителе кофактора ограничено, а восстановленная форма NADH обладает лучшей константой связывания с формиатдегидрогеназой, было изучено связывание фермента на колонке с NADH-сефарозой. В этом случае формиатдегидрогеназа довольно прочно удерживается даже при пропускании 10-кратного объема буфера (рис. 1). Элюция фермента может быть осуществлена 0,5 мМ раствором NAD.

Ранее было показано [6], что формиатдегидрогеназа, NAD и ион азиды образуют прочный тройной комплекс. Величина константы связывания азиды в тройном комплексе составляет $1,5 \cdot 10^{-7}$ М. Можно было полагать, что в присутствии азиды практически весь фермент будет находиться в комплексе с иммобилизованным лигандом. Действительно, при хроматографии фермента на колонке с NAD-сефарозой, уравновешенной 0,05 М фосфатным буфером, содержащим KN_3 в концентрации 1 мкМ, наблюдается полное удерживание фермента на колонке (рис. 2). При элюции фермента 0,5 мМ раствором NAD выход по активности составил 100%. Таким образом, из приведенных данных следует, что эффективность сорбции фермента на носителе при постоянной концентрации лиганда в значительной степени зависит от величины константы связывания фермента с лигандом. Фермент на носителе удерживается полностью, если концентрация иммобилизованного лиганда значительно превышает величину константы связывания его с ферментом.

Для количественной оценки эффективности связывания формиатдегидрогеназы с NADH-сефарозой был использован метод Дана и Чэйкена [7], позволяющий из хроматографических данных определять константы связывания фермента с иммобилизованным лигандом и лигандом, раствором которого проводят элюцию. Связь между наблюдаемой величиной объема элюции (определяемой по положению максимума пика элюции) и кон-

Выделение формиатдегидрогеназы из грубого экстракта метанолиспользующих граммотрицательных бактерий аффинной хроматографией на NADH-сефарозе

Стадия	Содержание белка, мг	Общая акт., мкмоль/мин	Уд. акт., мкмоль/мг·мин	Степень очистки	Выход фермента, %
Исходный экстракт	2,7	2,33	0,863	1	100
Этп II при аффинной хроматографии (рис. 5)	0,082	0,766	9,34	10,8	44

центрацией свободного кофактора в растворе, которым предварительно уравновешивается колонка, устанавливается следующим соотношением [7]:

$$\frac{1}{V - V_c} = \frac{K_{\overline{NH}}}{(V_c - V_0) \cdot [\overline{NH}]} + \frac{K_{\overline{NH}} \cdot [N]}{K_N \cdot (V_c - V_0) \cdot [NH]}, \quad (1)$$

где V — объем элюции формиатдегидрогеназы при данной концентрации свободного NAD в растворе; V_c — объем элюции формиатдегидрогеназы на колонке с сефарозой, не содержащей иммобилизованного лиганда; V_0 — свободный объем колонки; $[\overline{NH}]$ — концентрация связанного кофактора (NADH); $[N]$ — концентрация свободного кофактора (NAD) в растворе; $K_{\overline{NH}}$ — константа связывания фермента с иммобилизованным кофактором (NADH); K_N — константа связывания фермента со свободным кофактором (NAD).

Из данных хроматографии формиатдегидрогеназы на колонке с иммобилизованным NADH, уравновешенной буфером с различными концентрациями свободного NAD, следует, что уменьшение концентрации свободного нуклеотида улучшает удерживание формиатдегидрогеназы на колонке (рис. 3а). На рис. 3б показана зависимость наблюдаемого объема элюции формиатдегидрогеназы от концентрации NAD в растворе в координатах уравнения 1. На основе найденных в отдельных опытах значений $V_c = 0,24$ мл, $V_0 = 0,18$ мл и $[\overline{NH}] = 0,87$ мкмоль/мл геля были определены значения K_N и $K_{\overline{NH}}$, равные соответственно $3 \cdot 10^{-4}$ и $0,9 \cdot 10^{-5}$ М. Эти величины близки к соответствующим константам связывания в растворе, определенным ранее по тушению белковой флуоресценции, из кинетических измерений или методом скоростной седиментации [6]. Этот результат свидетельствует о том, что связывание фермента с иммобилизованным кофактором полностью обратимо и происходит, по-видимому, таким же образом, как и со свободным кофактором.

Прежде чем использовать NADH-сефарозу для очистки формиатдегидрогеназы из грубого экстракта бактерий, был проведен модельный эксперимент по разделению смеси бычьего сывороточного альбумина и формиатдегидрогеназы (рис. 4). Неактивный белок свободно проходил через колонку, а фермент удерживался на носителе. Элюирование формиатдегидрогеназы осуществлялось пропуском 0,5 мМ раствора NAD. Выход составлял ~90% по активности. В контрольном опыте с АН-сефарозой в качестве носителя, не содержащей иммобилизованный кофактор, сывороточный альбумин и формиатдегидрогеназа выходили одним пиком. Этот факт свидетельствует о том, что неспецифическая сорбция фермента на носителе, содержащем гексаметилендиаминовую «ножку», отсутствует.

Выделение формиатдегидрогеназы из гомогената метанолиспользующих граммотрицательных бактерий аффинной хроматографией на NADH-сефарозе (рис. 5) позволяет в одну стадию повысить удельную активность в 10,8 раза с выходом по активности 44% (таблица). По данным

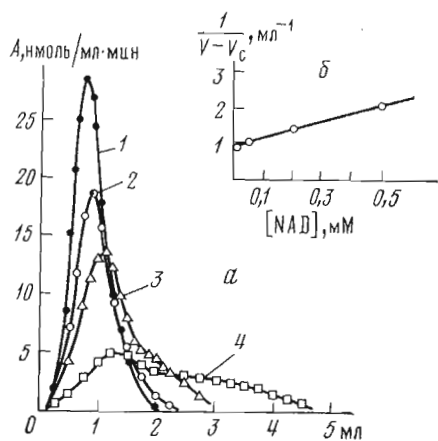


Рис. 3

Рис. 3. Элюция форматдегидрогеназы с колонки (0,24×16 см) с NADH-сефарозой 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,0), содержащим NAD в концентрации: 1 – 500, 2 – 200, 3 – 50, 4 – 5 мкМ; б – та же зависимость в координатах уравнения 1

Рис. 4. Разделение бычьего сывороточного альбумина и форматдегидрогеназы на колонке (0,6×4 см) с NADH-сефарозой; контроль по активности (1) и белку (2); образец содержал 0,85 мг белка с общей активностью 0,262 мкмоль/мин

Рис. 5. Выделение форматдегидрогеназы из грубого экстракта бактерий с помощью аффинной хроматографии на колонке (0,24×16 см) с NADH-сефарозой: 1 – активность, 2 – белок по Лоури

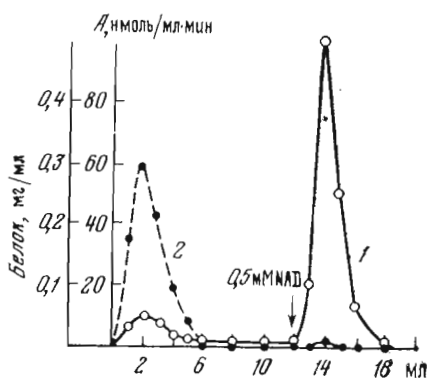


Рис. 4

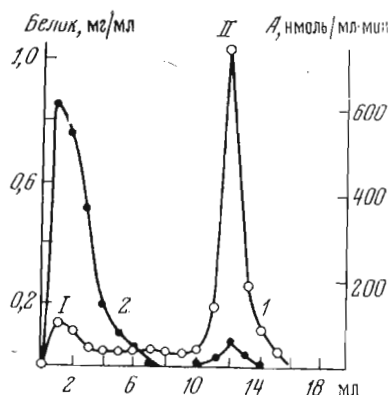


Рис. 5

электрофореза в полиакриламидном геле, очищенный препарат фермента имеет одну основную полосу и две слабые, относящиеся, возможно, либо к примесным белкам, обладающим способностью связываться с NADH, либо к изоформам форматдегидрогеназы. При обычном способе выделения форматдегидрогеназы фракционированием сульфатом аммония, хроматографией на DEAE-целлюлозе и препаративным электрофорезом выход гомогенного препарата составляет 39%, степень очистки 11,6 [4].

Таким образом, с использованием носителя, содержащего ковалентно иммобилизованный кофактор, возможна быстрая и эффективная очистка форматдегидрогеназы из грубого экстракта в одну стадию.

Экспериментальная часть

В работе использовали NAD, бычий сывороточный альбумин (Reanal, Венгрия), BrCN-активированную сефарозу 4В, АН-сефарозу 4В (1,6-диаминоксан-сефароза), голубой декстран (Pharmacia, Швеция), дауэкс 1×2, 1×4, 50W×4 (Serva, ФРГ), мето-*n*-толуолсульфат N-диглюксил-N'-(2-морфолиноэтил)карбодимид (Sigma, США), полиэтиленгликоль (M 40 000), дитионит натрия (Merck, ФРГ). Остальные использованные реагенты – соли, компоненты буферных растворов, кислоты – аналитической степени чистоты.

Были использованы гомогенат граммотрицательных метилотрофных бактерий, штамм № 1, а также выделенная из гомогената форматдегидрогеназа [4]. Активность форматдегидрогеназы определяли по измене-

нию поглощения кофактора при 340 нм в автоматическом анализаторе скоростей ферментативных реакций (модель 8600, ЛКВ, Швеция), конструкция которого предусматривает вывод цифрового значения начальной скорости на печать. В цилиндрическую кювету добавляли буфер, растворы субстрата, фермента и NAD до общего объема 1 мл. Измерения проводили в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0) при 37° С и концентрации NAD 1,6 мМ, формиата натрия — 0,3 М. Удельная активность исходного очищенного препарата формиатдегидрогеназы составляла ~11 мкмоль/мин·мг при 37° С, рН 7,0.

N⁶-карбоксиметил-NAD и N⁶-[N-(6-аминогексил)ацетамид]-NAD были синтезированы как описано в работе [8]. Идентификацию модифицированных производных NAD осуществляли на спектрофотометре Hitachi-200-20 (Япония) [2] и при помощи аналитического изотоподфореза на приборе Tachophor (ЛКВ, Швеция). Величины температурных скачков (по отношению к капроновой кислоте) для NAD, N⁶-карбоксиметил-NAD и N⁶-[N-(6-аминогексил)ацетамид]-NAD составляли соответственно 85, 43 и 63%.

N⁶-карбоксиметил-NAD иммобилизовали на АН-сефарозе 4В с помощью растворимого карбодимеда, а N⁶-[N-(6-аминогексил)ацетамид]-NAD — непосредственно на BrCN-активированной сефарозе 4В [8]. Количество связанного кофактора определяли спектрофотометрически. В кювету, содержащую 2 мл 6 мМ раствора полиэтиленгликоля в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,0), добавляли 20 мг отжатой на стеклянном фильтре сефарозы с иммобилизованным кофактором, смесь тщательно перемешивали. Кювета сравнения содержала такое же количество сефарозы без кофактора. Содержание связанного кофактора определяли по разности поглощения, принимая коэффициент молярного поглощения при λ 266 нм равным 21700 М⁻¹·см⁻¹ [8]. Для получения носителя с восстановленной формой кофактора через колонку с иммобилизованным NAD пропускали 5 мл 0,01 М раствора дитронита натрия. Степень восстановления иммобилизованного кофактора составила 100%. Определение проводили, как и в случае NAD, спектрофотометрически, принимая коэффициент молярного поглощения NADH при λ 340 нм равным 6200 М⁻¹·см⁻¹ [8].

Электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли на приборе Model 69 (Reanal, Венгрия) согласно [9].

Аффинную хроматографию формиатдегидрогеназы проводили на колонках размером 0,24×16 и 0,6×4,0 см при 23° С. Колонку с иммобилизованным на сефарозе кофактором уравнивали 0,05 М фосфатным буфером, рН 7,0 (рабочий). Скорость элюирования регулировали перистальтическим насосом Multiperex 2115 (ЛКВ, Швеция). Во всех экспериментах она составляла 11 мл/ч. Для повторного использования колонку промывали 1 М KCl и затем уравнивали рабочим буфером. Свободный объем колонки определяли, пропуская через колонку, содержащую эквивалентное количество сефарозы 4В, голубой декстран.

На колонку с аффинным носителем наносили раствор препарата формиатдегидрогеназы объемом 10–50 мкл для очищенного фермента и 0,5 мл для гомогената, содержащий 0,005–0,2 мг фермента. Колонку промывали рабочим буфером и элюировали фермент 0,5 мМ раствором NAD в буфере. Собирали фракции по 0,25, 0,5 или 1,0 мл и измеряли их ферментативную активность. Количество белка определяли по методу Лоури [10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee C.-Y., Kaplan N. O. (1976) *J. Macromol. Sci.*, **A10**, 15–52.
2. Егоров А. М., Осипов А. П. (1978) Биологическая химия («Итоги науки и техники»), т. 12, с. 153–208, изд-во ВИНТИ АН СССР, М.
3. Eventoff W., Rossmann M. G. (1976) *Trends in Biochem. Sci.*, **1**, 227–229.

4. Родионов Ю. В., Авилова Т. В., Захарова Е. В., Платоненкова Л. С., Егоров А. М., Березин И. В. (1977) Биохимия, **42**, 1896-1904.
5. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. (1978) Биоорган. химия, **4**, 117-129.
6. Попов В. О., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Березин И. В. (1978) Докл. АН СССР, **239**, 1482-1485.
7. Dunn B. M., Chaiken I. M. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 2382-2385.
8. Lindberg M., Larsson P. O., Mosbach K. (1973) Eur. J. Biochem., **40**, 187-193.
9. Davis B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404-427.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. T., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.

Поступила в редакцию
13.II.1979

После доработки
16.V.1979

AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF BACTERIAL FORMATE DEHYDROGENASE

YAVARKOVSKAYA L. L., OSIPOV A. P., EGOROV A. M.

Chemical Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The adsorption of NAD-dependent formate dehydrogenase from Gram-negative methylotrophic bacteria on the column with AH-Sepharose containing the oxidized or reduced coenzyme has been studied. The dissociation constants for the enzyme binding to immobilized or free coenzyme were determined from the chromatographic data. Using affinity chromatography on NADH-Sepharose, one-step isolation of 10.8-fold purified formate dehydrogenase was achieved from bacterial homogenate in 44% yield.
