



УДК 577.15.083 + 543.544

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИIII*. ХРОМАТОГРАФИЯ α -L-ФУКОЗИДАЗЫ ИЗ ПОЧЕК ЧЕЛОВЕКА
НА АФФИННЫХ АДСОРБЕНТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫЕ L-ФУКОЗЫ

Бейер Е. М., Кляцицкий Б. А., Видершайн Г. Я.

*Институт биологической и медицинской химии Академии медицинских
наук СССР, Москва*

Проведена хроматография α -L-фукозидазы из почек человека на нескольких аффинных адсорбентах, содержащих в качестве лиганда производные L-фукозы, с различным количеством заряженных и гидрофобных групп. Изучен вклад неспецифических взаимодействий в адсорбцию фермента. На биоспецифическом адсорбенте N-(ϵ -аминокапроил)- β -L-фукозилранозилламин-сефарозе осуществлена очистка α -L-фукозидазы в 2600 раз с выходом 40—50%. Обсуждены оптимальные условия аффинной очистки α -L-фукозидазы, а также некоторые общие аспекты аффинной хроматографии гликозидов.

Использование в аффинных адсорбентах лигандов с низким сродством к выделяемому ферменту (константа диссоциации $K_d > 10^{-4}$ М), как правило, неэффективно [2]. В ряде случаев, особенно при биоспецифической очистке гликозидаз [3, 4], связывание фермента с такого рода адсорбентами усиливается за счет неспецифических эффектов (гидрофобные и ионные взаимодействия). Последние могут быть настолько сильны, что связывание фермента имеет место на адсорбенте с гидрофобными и заряженными вставками даже в отсутствие лиганда [5]. Сложная природа взаимодействия фермента с адсорбентом затрудняет интерпретацию результатов аффинной хроматографии гликозидаз [3, 4, 6] и выбор оптимальных условий для очистки того или иного фермента.

Эти проблемы возникают и при аффинной хроматографии α -L-фукозидазы (КФ 3.2.1.51). α -L-Фукозидаза относится к группе лизосомных гидролитических ферментов и катализирует отщепление концевой L-фукозы от содержащих ее биополимеров и от низкомолекулярных субстратов. Фермент обладает строгой субстратной специфичностью к L-фукозильному остатку и α -аномерной связи [7] и, как было показано, существует в различных молекулярных формах [8—11]. Генетическая недостаточность в организме человека α -L-фукозидазы приводит к развитию тяжелого наследственного заболевания — фукозидоза [12].

Изучение α -L-фукозидазы до недавнего времени было затруднено в связи со сравнительно низкой концентрацией этого фермента в различных

* Сообщение II см. [4]. Сокращения: УБР — уравнивающий буферный раствор (10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 5,5, с 0,02% NaN_3); ЭДАК — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; ДЦГК — дициклогексилкарбодимид.

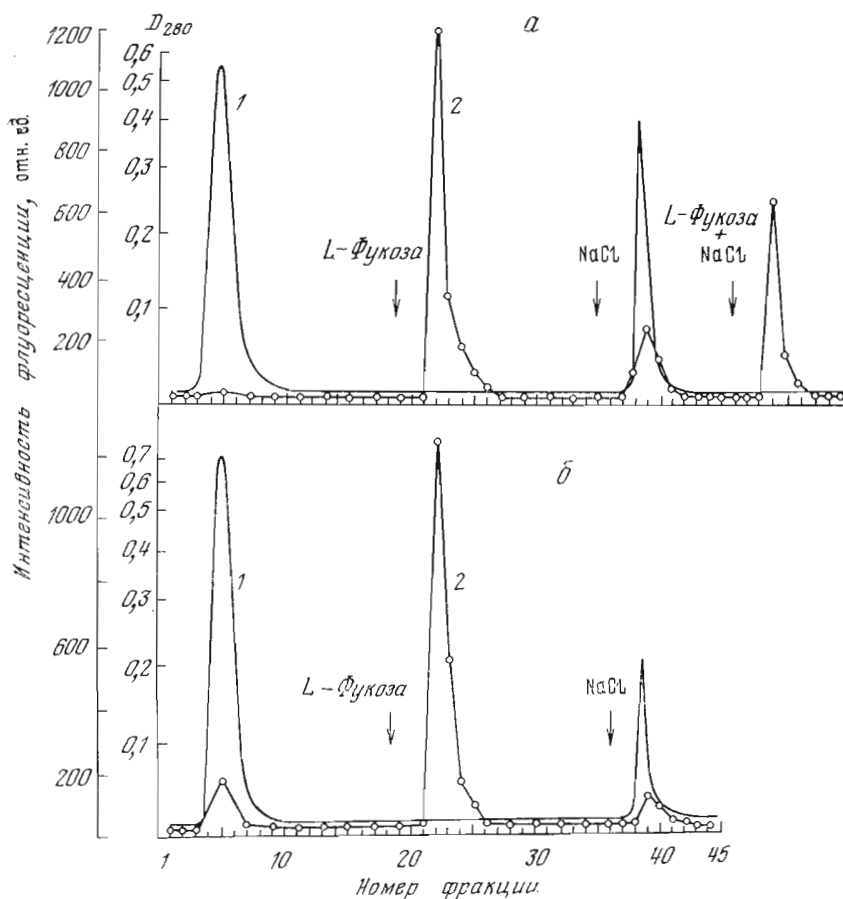


Рис. 1. Хроматография α -L-фукозидазы на адсорбентах А (а) и А' (б); элюция УБР с добавлением 60 мМ L-фукозы, 1 М NaCl, 60 мМ L-фукозы + 1 М NaCl (моменты добавления соответствующего компонента к УБР указаны стрелкой). 1 — поглощение при 280 нм; 2 — α -L-фукозидазная активность. Условия хроматографии здесь и на других рисунках см. «Экспер. часть»

органах человека и отсутствием высокоэффективных методов его очистки. После синтеза N-(ϵ -аминокапроил)- β -L-фукозилламин-сефарозы (адсорбент А) [13], использовавшейся для аффинной хроматографии белков растительного происхождения, связывающих L-фукозу, этот адсорбент нашел широкое применение при очистке α -L-фукозидазы из различных источников: печени [6, 14], плаценты [15], мозга [16], сыворотки крови [17], культуры фибробластов кожи [18] человека, печени [19] и эпидидимисов [20] крысы. В указанных работах степень очистки фермента колебалась от 50 [20] до десятков тысяч раз [16, 17], а выход — от 20 [20] до 90% [6].

Причина сродства α -L-фукозидазы, характеризующейся строгой специфичностью к α -гликозидной связи, к лиганду с β -конфигурацией гликозидной связи до конца не выяснена. Было показано, что N-(ϵ -аминокапроил)- β -L-фукопиранозиламин и L-фукоза являются слабыми ингибиторами фермента (K_i соответственно $2,6 \cdot 10^{-3}$ М [6] и $0,8 \cdot 10^{-3}$ М [14]), что, казалось, не могло обеспечить эффективное связывание α -L-фукозидазы на адсорбенте [21]. Робинсон и Торпе [6] предположили наличие в β -L-фукопиранозиламине примеси α -аномера (до 10%), обеспечивающей адсорбцию α -L-фукозидазы на колонке.

В настоящей работе описано получение ряда биоспецифических адсорбентов для очистки α -L-фукозидазы, содержащих различное коли-

Очистка фукозидазы методом аффинной хроматографии на адсорбенте А

Ферментный препарат	Общее количество белка, мг	Активность		Степень очистки	Выход, %
		общая, ед. акт.	удельная, ед. акт./мг белка		
Исходный [7]	75	6480	86	—	—
После аффинной хроматографии (элюция УБР с 60 мМ <i>L</i> -фукозой)	0,012	2640	220000	2600	41

Таблица 2

Поведение гликозидаз, присутствующих в исходном препарате α -*L*-фукозидазы [7], при хроматографии на адсорбентах А, А', Б и Б'*

Гликозидазы	Активность в элюате, % от введенной на колонку с адсорбентами							
	А		А'		Б		Б'	
	I	II	I	II	I	II	I	II
α - <i>L</i> -Фукозидаза	0	2	4	0	0	1,6	27	1,8
α - <i>D</i> -Галактозидаза	0	27	30	0	13	3,7	24	0
α - <i>D</i> -Глюкозидаза	6	20	29	5	17	6	31	3
N-Ацетил- β - <i>D</i> -глюкозаминидаза	1	9	16	7	13	4	29	8
α - <i>D</i> -Маннозидаза	33	6	47	0	36	1,3	46	0
β - <i>D</i> -Галактозидаза	1	46	35	23	7	2	22	0

* I — элюция УБР, II — элюция УБР с 1 М NaCl (после биоспецифической элюции α -*L*-фукозидазы).

чество катионных и гидрофобных групп, с целью выяснения вклада неспецифических взаимодействий в адсорбцию этого фермента. Впервые проведена очистка α -*L*-фукозидазы из почек человека (далее фукозидаза) методом аффинной хроматографии.

Представленный на рис. 1а профиль элюции частично очищенной фукозидазы [7] при аффинной хроматографии на адсорбенте А свидетельствует о том, что фукозидаза прочно связывалась с адсорбентом при введении в УБР и специфически элюировалась тем же буферным раствором, содержащим 60 мМ *L*-фукозу. При дальнейшем промывании колонки УБР с 1 М NaCl наблюдалась дополнительная элюция 2—3% фукозидазы. Это может указывать на то, что некоторая часть фермента связана с адсорбентом за счет электростатических взаимодействий, как было обнаружено ранее для α -*L*-фукозидазы из других органов [14, 15]. Дальнейшая инкубация колонки с раствором *n*-нитрофенил- α -*L*-фукопиранозиды при 37° приводила к расщеплению субстрата. Это свидетельствовало о том, что часть фермента все еще оставалась связанной с адсорбентом. Последующая элюция с помощью УБР, содержащего 1 М NaCl и 60 мМ *L*-фукозу, приводила к дополнительной десорбции около 30% фукозидазы (рис. 1а).

Как видно из табл. 1, фермент на адсорбенте А был очищен в 2600 раз. При использовании этого же метода α -*L*-фукозидаза из эпидидимисов крыс [20], печени [14] и сыворотки крови [17] человека была очищена соответственно в 50, 6300 и 241200 раз. Такие различия можно объяснить использованием исходных препаратов фермента с различной степенью предварительной очистки. Недостаточно высокий выход α -*L*-фукозидазы

при аффинной хроматографии ферментного препарата из почки человека может быть обусловлен, в частности, быстрой инактивацией фермента (согласно данным работ [14, 16], очищенный ферментный препарат лабилен при концентрации белка менее 0,4 мг/мл). В связи с этим при определении активности и выхода фукозидазы мы добавляли в очищенный препарат фермента сывороточный альбумин человека в концентрации 3 мг/мл. Кроме того, наличие указанных выше неспецифических взаимодействий, препятствующих специфической элюции фермента, также снижает выход фукозидазы.

При электрофорезе в полиакриламидном геле (рис. 2) очищенный препарат фукозидазы дает три полосы, соответствующие α -L-фукозидазной активности.

При изучении поведения других гликозидаз, присутствовавших в частично очищенном препарате фукозидазы [7], установлено, что α -D-галактозидаза (КФ 3.2.1.22), α -D-глюкозидаза (КФ 3.2.1.20), β -D-галактозидаза (КФ 3.2.1.23) и N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (КФ 3.2.1.30) также связывались с адсорбентом А (α -D-маннозидаза (КФ 3.2.1.24) адсорбировалась в меньшей степени) и после биоспецифической элюции фукозидазы частично элюировались 1 М NaCl (табл. 2). Следовательно, часть гликозидаз (вместе с ~30% α -L-фукозидазы) остается адсорбированной на колонке после промывания 1 М NaCl и десорбируется лишь после регенерации адсорбента с помощью 7 М раствора мочевины.

С целью дальнейшего изучения поведения фукозидазы на аффинных адсорбентах, содержащих производные L-фукозы, был синтезирован ряд адсорбентов с различным количеством заряженных и гидрофобных групп. Структура полученных адсорбентов приведена на схеме. Для синтеза адсорбента Б, содержащего в отличие от адсорбента А гидрофильную триглицидную вставку, присоединяли триглицид к BrCN-активированной сефарозе и полученную триглицид-сефарозу конденсировали с β -L-фукопиранозиламином с помощью ЭДАК.

Адсорбенты А и Б содержат катионные группы, возникающие при присоединении первичной аминогруппы к BrCN-активированной сефарозе [22], что создает возможность электростатического взаимодействия с ними белковой молекулы. Вильчек и Мирон [23] показали, что ацетилирование такого рода адсорбентов по вторичному атому азота образующейся изоуретидной группы приводит к незаряженным производным. Ацетилированием адсорбентов А и Б с помощью уксусного ангидрида при pH 8,5—9 получали соответствующие незаряженные адсорбенты А' и Б'.

Получение аффинных адсорбентов, содержащих в качестве лиганда отличные от β -L-фукопиранозиламина производные L-фукозы с β -гликозидной связью, могло бы способствовать выяснению роли конфигурации гликозидной связи для адсорбции фермента. С этой целью мы синтезировали адсорбент В — N-(ϵ -аминокапроил)-*n*-аминофенил- β -L-фукопиранозид-сефарозу. Конденсация *n*-аминофенил- β -L-фукопиранозид-сефарозы, полученного каталитическим гидрированием соответствующего *n*-нитропроизводного, с N-Вос- ϵ -аминокапроновой кислотой [24] в пиридине в присутствии ДЦГК привела к N-(N-Вос- ϵ -аминокапроил)-*n*-аминофенил- β -L-фукопиранозиду. Последний после удаления защитной Вос-группы присоединя-

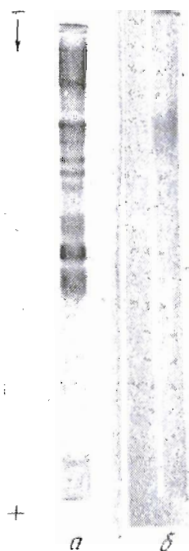
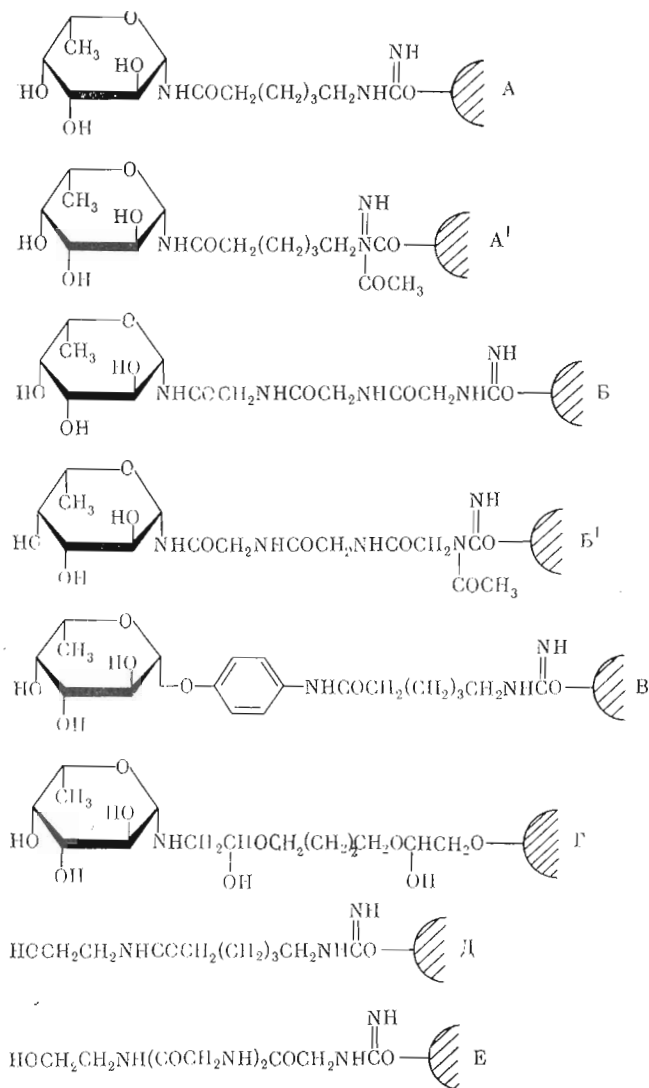


Рис. 2. Электрофорез в полиакриламидном геле исходного препарата α -L-фукозидазы (а), препарата после аффинной хроматографии на адсорбенте А (б)



ли к BrCN-активированной сефарозе и получали адсорбент В. Как видно из структуры этого адсорбента (схема) он содержит катионные группы и характеризуется повышенной гидрофобностью по сравнению с адсорбентом А ввиду наличия бензольного кольца. Для синтеза незаряженного адсорбента с гидрофильной вставкой было осуществлено присоединение β -L-фукопиранозиламина к эпоксиактивированной сефарозе В. В соответствии с работой [25], в которой изучалась реакция углеводов с эпоксиактивированной сефарозой, в полученном адсорбенте Г наиболее вероятно присоединение фукозиламина по аминогруппе, оказавшейся в несколько раз более реакционноспособной в реакции с эпоксисефарозой, чем гидроксильные группы. Были получены также контрольные адсорбенты Д и Е, не содержащие фукопиранозильного лиганда, реакцией СН-сефарозы или триглицинсефарозы, соответственно, с избытком этаноламина в присутствии ЭДАК. Адсорбенты Д и Е, кроме того, ацетилировали аналогично адсорбентам А и Б.

Как видно из рис. 3а, профиль элюции фукозидазы при хроматографии на адсорбенте Б был идентичен данным для адсорбента А. Согласно табл. 2, адсорбция других гликозидаз на адсорбенте Б была значительно ниже,

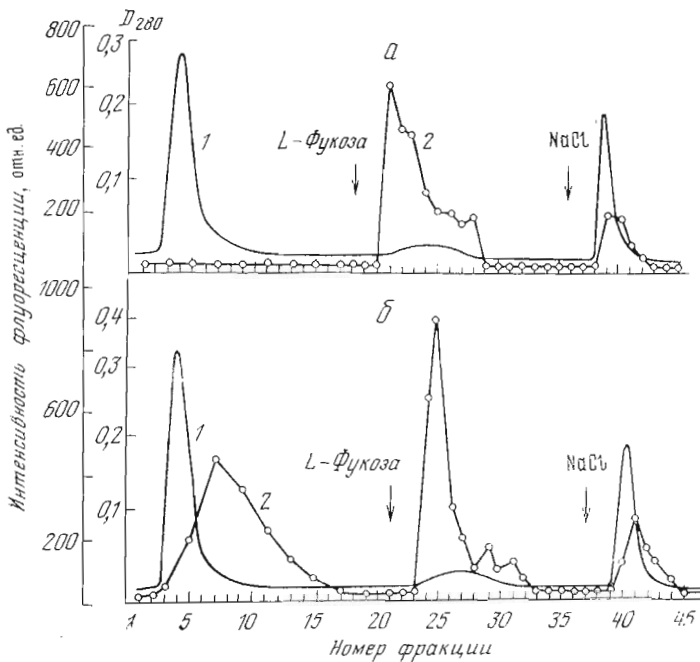


Рис. 3. Хроматография α -L-фукозидазы на адсорбентах В (а) и В' (б). Обозначение как на рис. 1

чем на адсорбенте А. По-видимому, наличие гидрофильной вставки уменьшало в этом случае неспецифическую адсорбцию гликозидаз.

Проведение аффинной хроматографии фукозидазы на ацетилированных адсорбентах А' и В' показало, что связывание этого фермента (рис. 16 и 3б), а также других гликозидаз (табл. 2) с указанными адсорбентами, как правило, существенно уменьшается. При хроматографии фукозидазы на контрольных адсорбентах Д и Е было обнаружено определенное связывание фермента (до 30%), обусловленное, в частности, присутствием положительно заряженных групп на этих адсорбентах. Однако на колонках с ацетилированными адсорбентами Д и Е 80—90% фукозидазы не задерживалось. Полученные данные соответствуют современным представлениям [5, 23] о роли катионных зарядов в неспецифическом связывании белков с аффинными адсорбентами.

Изучение поведения фукозидазы на адсорбенте В показало, что фермент на нем полностью сорбировался, причем связывание фукозидазы было настолько сильным, что десорбировать сколько-нибудь заметное количество фермента, используя различные условия элюции, оказалось невозможным. Это обстоятельство, по-видимому, объясняется повышенной гидрофобностью адсорбента. Для подтверждения указанного предположения в уравнивающем и элюирующем буферный раствор добавляли 10% диметилформамида, успешно использованного в аффинной хроматографии для ослабления гидрофобных взаимодействий [26]. В этих условиях 40% фукозидазы не связывалось с адсорбентом В и выходило с колонки вместе с балластным белком.

Недавно Джейн и др. [27] успешно провели аффинную хроматографию α -L-фукозидаз из различных источников на *n*-аминофенил-1-тио- α -L-фукопиранозиде, присоединенном к сукцинил-3,3'-диаминодипропиламин-серафозе. Им удалось десорбировать фермент, используя буферный раствор, содержащий 4% (240 мМ) L-фукозы. Неспецифическую элюцию в этом случае можно объяснить довольно высокой ионной силой примененного буферного раствора (0,2 М натрий-цитратный буфер, рН 6,0) и вы-

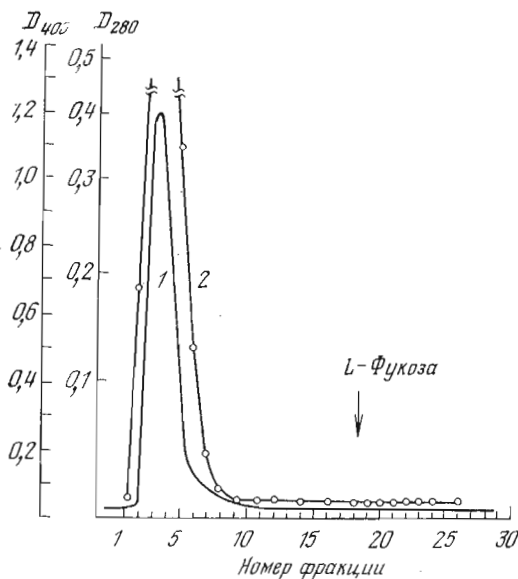


Рис. 4. Хроматография α -L-фукозидазы на адсорбенте Г. Обозначения как на рис. 1

человека была успешно очищена на том же аффинном адсорбенте [29].

Для аффинной очистки фукозидазы, не сопровождающейся неспецифическими эффектами, была предпринята хроматография частично очищенного препарата на адсорбенте Г, однако оказалось, что в описанных выше условиях фермент не задерживался на колонке (рис. 4). Проведение процесса очистки при pH 6,8 [6] привело к аналогичному результату. Можно предположить, что при «истинной» аффинной хроматографии сродство фермента к лиганду было недостаточным для эффективного связывания.

Подобные результаты были получены нами при использовании для очистки γ -амилазы эпоксиактивированной сефарозы, содержащей в качестве лиганда трегалозу — ингибитор γ -амилазы ($K_d \sim 10^{-3}$ М). Адсорбция γ -амилазы на таком адсорбенте не происходила. В то же время конканавалин А — лектин, обладающий сильным сродством к невосстанавливающей концевой D-глюкозе, эффективно сорбировался на указанном адсорбенте*.

Таким образом, связывание фермента с адсорбентом, содержащим лиганд со слабым сродством к α -L-фукозидазе ($K_d > 10^{-4}$ М) становится, вероятно, невозможным без участия неспецифических взаимодействий. Поэтому адсорбенты А и Б, содержащие тот же лиганд, что и адсорбент Г, были успешно использованы для аффинной очистки фукозидазы (рис. 1 и 3), а при хроматографии на адсорбенте В, содержащем заряженные группы и более гидрофобную вставку, преобладало уже жесткое неспецифическое связывание белков.

Вместе с тем сорбция фукозидазы на адсорбентах А и Б, несмотря на участие неспецифических взаимодействий, носит в основном биоспецифический характер, что показано возможностью элюции фермента раствором L-фукозы. Использование в элюирующем буферном растворе смеси сахаров, состоящей из D-глюкозы (60 мМ), D-галактозы (60 мМ), L-рамнозы (60 мМ) и N-ацетил-D-глюкозамина (60 мМ), вызывало лишь незначительную десорбцию α -L-фукозидазы (около 2%) с адсорбента, причем при увеличении концентрации указанных сахаров выход α -L-фукозидазы

сокой концентрацией в нем L-фукозы. Остается неясным, почему α -L-фукозидаза не связывалась с аналогичным адсорбентом с β -конфигурацией гликозидной связи [27], так как последний адсорбент, отличаясь по структуре от адсорбента В, тем не менее содержит достаточное количество катионных и гидрофобных групп. Однако следует учитывать, по-видимому, возможные различия в свойствах гликозидаз, в том числе и α -L-фукозидаз, из различных источников. Например, при хроматографии β -D-гексозаминидазы из *Streptococcus* 6646 К на сефарозе, замещенной *n*-аминофенил-N-ацетил- β -D-тиоглюкозамином, наблюдалось жесткое необратимое связывание фермента [28], в то время как β -D-гексозаминидаза из мочи

* Результаты будут опубликованы в отдельном сообщении.

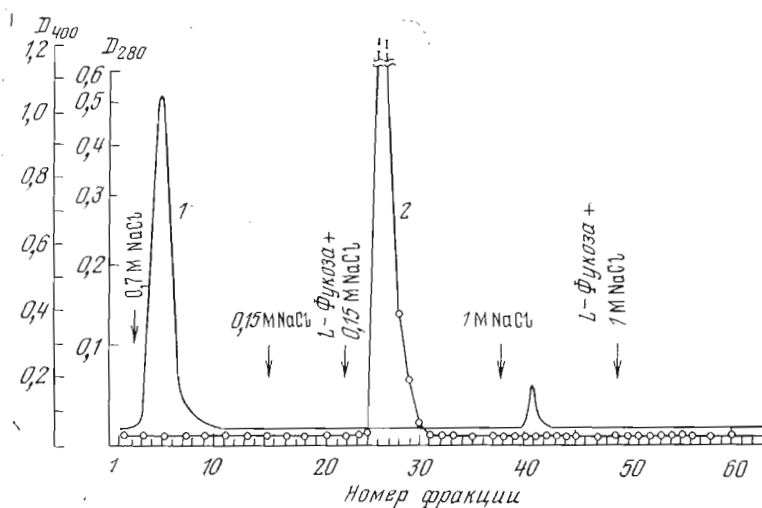


Рис. 5. Хроматография α -L-фукозидазы на адсорбенте А в модифицированных условиях (подробности приведены в тексте). Обозначения как на рис. 1

не повышался. На преимущественно биоспецифический характер адсорбции фукозидазы на адсорбентах А и Б указывает и тот факт, что фермент лишь слабо связывается с адсорбентами Д и Е, не содержащими углеводного лиганда.

Как было указано выше, при хроматографии фукозидазы на адсорбенте А после биоспецифической элюции раствором L-фукозы 2—3% фукозидаза десорбируется дополнительно УБР, содержащим 1 М NaCl. Если же проводить последующую элюцию УБР с 1 М NaCl и 60 мМ L-фукозой, то удастся выделить еще до 30% фукозидазы (рис. 1а). Можно предположить, что при элюции 1 М NaCl значительная часть фермента, неспецифически связанного с адсорбентом, вновь сорбируется биоспецифически на участки связывания, освободившиеся в результате биоспецифической элюции УБР с 60 мМ L-фукозой. Элюция этой части фермента растворами с 1 М NaCl становится невозможной. Однако после добавления в этот элюирующий раствор 60 мМ L-фукозы имеет место повторная биоспецифическая элюция α -L-фукозидазы (до 30%).

Это побудило нас предпринять попытку оптимизировать условия проведения аффинной хроматографии α -L-фукозидазы. За основу модифицированного процесса очистки была принята методика, описанная в работе [19]. Введение фермента на колонку проводили в УБР, содержащем 0,7 М NaCl. Увеличение полной силы буфера существенно уменьшает неспецифическую адсорбцию белков. После выхода балластных белков колонку промывали УБР с 0,15 М NaCl и элюцию фукозидазы осуществляли добавлением 60 мМ L-фукозы (рис. 5). В этом случае выход фермента достигал 70—80%. Последующее промывание колонки УБР с 1 М NaCl или УБР с 1 М NaCl в присутствии 60 мМ L-фукозы не приводило к появлению в элюатах α -L-фукозидазной активности.

Представленные в настоящей работе данные демонстрируют возможный общий подход к поиску оптимальных условий проведения аффинной хроматографии при использовании лигандов с низким сродством к выделяемому биополимеру. Этот подход заключается в достижении связывания биополимера с аффинным адсорбентом путем введения в последний подобранного количества заряженных и (или) гидрофобных групп при сохранении биоспецифической природы процесса очистки.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефадекс G-25, сефарозу 4В, СН-сефарозу и эпоксиактивированную сефарозу 6В (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), все *n*-нитрофенилгликозиды, а также N-ацетилглюкозамин и BrCN (Serva, ФРГ), 4-метилумбеллиферил- α -L-фукопиранозид (Koch-Light, Англия), ЭДАК (Sigma, США), триглицид-сульфат и сывороточный альбумин человека (Reanal, Венгрия), L-фукозу (B. D. H. Laboratory Chemicals, Англия), L-рамнозу и ДЦГК (Chemapol, ЧССР), D-глюкозу и D-галактозу (Союзреактив, СССР).

β -L-Фукозилламин, т. пл. 145—146°, $[\alpha]_D^{20}$ — 50° (с 1, вода), получали по методике [13]. Активацию сефарозы BrCN проводили как описано ранее (1,5—2 г BrCN на 10 мл сефарозы 4В) [30].

Кислотный гидролиз производных сефарозы, содержащих ϵ -аминокапроновую кислоту или триглицид, осуществляли нагреванием аликвот адсорбента (0,1—0,3 мл) с 4 н. HCl в течение 16 ч при 105°. Аминокислотный анализ гидролизата проводили на агрегатном хроматографе 71100 А (ЧССР). Содержание азота в адсорбенте Г определяли по методу [31]. Концентрирование растворов белка осуществляли методом ультрафильтрации на Diaflo-мембране типа PM-30 (Amicon, США). Концентрацию белка определяли по методу Лоури [32], по поглощению в УФ-области при 280 нм и при использовании флуорескамина [33].

Электрофорез белка (10—60 мкг) в 7,5% полиакриламидном геле выполняли по методу [34] при pH 8,9 в течение 1—2 ч при силе тока 2 мА на трубку в первые 20 мин, а затем 4 мА на трубку. Обнаружение белковых полос осуществляли 0,1% раствором кумасси на 30% растворе трихлоруксусной кислоты в течение 20—30 мин. Для определения локализации фукозидазы в полиакриламидном геле извлеченный из трубок (0,5 × 7 см) гель инкубировали 20—30 мин в 1 мМ растворе 4-метилумбеллиферил- α -L-фукопиранозид в 0,05 М натрий-ацетатном буферном растворе (pH 5,0) при 37°. После инкубации гель помещали в 0,4 М глицин-NaOH-буферный раствор, pH 10,4, и в УФ-свете локализовали флуоресцирующие зоны.

Частично очищенный ферментный препарат α -L-фукозидазы получали из гомогената почек человека по методике [7], включающей осаждение белка $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60% от полного насыщения) и прогревание аммонийной белковой фракции при 55° в течение 20 мин.

Определение активности гликозидаз. Об активности α -L-фукозидазы и других гликозидаз судили по количеству *n*-нитрофенола или 4-метилумбеллиферона, выделяющихся при расщеплении соответствующих гликозидов. Инкубационная проба (конечный объем 0,25 мл) содержала 0,15 мл ферментного препарата и 0,1 мл (1 мМ) раствора соответствующего субстрата, приготовленного в 0,05 М ацетатном буфере (pH 5,0), содержащем 1 мМ EDTA. После инкубации проб при 37° реакции останавливали добавлением 0,25—1,5 мл 0,4 М глицин-NaOH-буферного раствора (pH 10,4). Свободный *n*-нитрофенол определяли по поглощению при 400 нм на спектрофотометре СФ-4А с использованием микрокувет и диафрагмы [35]. Об отщеплении свободного 4-метилумбеллиферона судили по определению флуоресценции на флуориметре [36].

При определении активности фукозидазы в очищенном препарате концентрацию *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид увеличивали до 3 мМ и в инкубационную пробу добавляли сывороточный альбумин человека (3 мг/мл). Об активности фукозидазы на колонке с аффинным адсорбентом судили по появлению свободного *n*-нитрофенола в элюате после инкубации колонки, уравновешенной раствором *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид (1 мМ) в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,0, с 1 мМ EDTA, в течение 1 ч при 37°. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое расщепляло 1 нмоль субстрата за 1 мин в стандартных условиях.

Адсорбент А. Растворяли 2,6 ммоль β -L-фукозиламина в 6,5 мл воды, добавляли 1 н. HCl до pH 4,8 и смешивали с 7 мл CN-сефарозы, предварительно промытой 50 мл воды. К полученной суспензии при 20° и перемешивании постепенно добавляли раствор 245 мг ЭДАК в 3 мл воды и перемешивали 16 ч, поддерживая pH 4,6—4,8 в течение первых 1,5 ч. Адсорбент промывали водой (~100 мл, до отсутствия положительной реакции с нингидрином в промывных водах) и хранили в 50 мМ натрий-фосфатном буферном растворе (pH 6,8) в присутствии 0,02% NaN₃. По данным кислотного гидролиза с последующим определением ϵ -аминокапроновой кислоты, адсорбент А содержал 5,1 мкмоль лиганда/мл геля.

Адсорбент Б. 1. Триглицин-сефароза. Растворяли 204,8 мг (0,4 ммоль) триглицин-сульфата в 4 мл воды, с помощью 1 н. NaOH доводили pH раствора до 9,5 и смешивали с 4 мл BtCN-активированной сефарозы [30]. Суспензию перемешивали 16 ч при 4°, адсорбент промывали водой (50 мл, отсутствие положительной реакции с нингидридом в промывных водах). По данным определения количества глицина после кислотного гидролиза аликвоты адсорбента с сефарозой связалось 3 мкмоль триглицина на 1 мл геля.

2. К 3 мл триглицин-сефарозы добавляли раствор 163 мг (1 ммоль) β -L-фукозиламина в 3 мл воды и 50 мг ЭДАК при pH 4,5 и, как описано при синтезе адсорбента А, получали адсорбент Б.

Ацетилирование адсорбентов А и В (адсорбенты А' и Б'). Ацетилирование проводили по методике [23]. 7 мл адсорбента промывали 50 мл 1 М КНСО₃ (pH 8,5), суспендировали в 3,5 мл 1 М КНСО₃ и 3,5 мл диоксана, в течение 30 мин при 4° добавляли 2 мл уксусного ангидрида, поддерживая pH 8,5 с помощью 5 н. КОН. Суспензию перемешивали 1 ч при 4°, адсорбент промывали 50% водным диоксаном (50 мл) и водой (100 мл).

Адсорбент В. 1. N-(N-Вос- ϵ -аминокапроил)-*n*-аминофенил- β -L-фукопиранозид. К раствору 255 мг (1 ммоль) *n*-аминофенил- β -L-фукопиранозид, полученного гидрированием соответствующего *n*-нитрофенилгликозида над Pd-чернью, и 231 мг (1 ммоль) N-Вос- ϵ -аминокапроновой кислоты [24] в 16 мл пиридина добавляли 226 мг (1 ммоль) ДЦГК и оставляли на 2 сут при 20°. К реакционной смеси добавляли 23,1 мг (0,1 ммоль) N-Вос- ϵ -аминокапроновой кислоты и 22,6 мг (0,1 ммоль) ДЦГК, через 24 ч фильтровали, фильтрат разбавляли 80 мл воды и оставляли на 16 ч при 4°. Затем смесь вновь фильтровали, фильтрат упаривали, нагревали с 50 мл воды и выделяли 247 мг (52,7%) N-Вос- ϵ -аминокапроил-*n*-аминофенил- β -L-фукопиранозид, т. пл. 148—150°. Продукт содержал, по данным ТСХ (силуфол; *n*-бутанол — AcOH — вода, 6 : 2 : 2), незначительную примесь *n*-аминофенил- β -L-фукопиранозид и был использован в следующей стадии без очистки.

2. Выдерживали при 20° в течение 2 ч смесь 63 мг N-Вос- ϵ -аминокапроилпроизводного, полученного в предыдущем опыте, и 2 мл 4,68 М раствора хлористого водорода в диоксане. По данным ТСХ (силуфол; СНCl₃ — MeOH — NH₃ — AcOH, 150 : 30 : 2 : 1), реакция прошла полностью. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 3 мл 0,1 М NaHCO₃, содержащего 0,5 М NaCl (pH 9,0), и смешивали с 3 мл BtCN-активированной сефарозы. Суспензию перемешивали 16 ч при 4°, адсорбент промывали водой (50 мл) и перемешивали 2 ч при 20° с 3 мл 1 М этаноламина (pH 9), фильтровали, гель промывали большим количеством воды и хранили в 0,05 М Na-фосфатном буферном растворе (pH 6,8) с 0,02% NaN₃ или несколькими каплями хлороформа. По данным кислотного гидролиза и последующего определения количества ϵ -аминокапроновой кислоты, адсорбент содержал 2,6 мкмоль лиганда/мл геля.

Адсорбент Г. Присоединение 60 мг β -L-фукозиламина к 4 мл эпокси-активированной сефарозы проводили в 0,1 н. NaOH в течение 16 ч при 37° по методике [29]. Оставшиеся активные группы блокировали обработкой

4 М этаноламином (рН 11,2) в течение 4 ч при 20°. Количество присоединившегося фукозиламина определяли по содержанию азота в полученном адсорбенте, используя в качестве контроля исходную эпоксиактивированную сефарозу, а также аналогично синтезированный адсорбент, исключая обработку этаноламином. По данным элементного анализа, с сефарозой связалось 5,36 мкмоль фукозиламина/мл геля.

Адсорбенты Д и Е. К суспензии 5 мл СН-сефарозы в 4 мл 1 М этаноламина при рН 4,5 (доведен с помощью 6 М НСl) постепенно добавляли раствор 50 мг ЭДАК в 1 мл воды, перемешивали 1,5 ч при 20°, поддерживая рН 4,5—4,7, и оставляли на 16 ч при 20°. Затем гель промывали большим количеством воды и полученный адсорбент Д хранили в 0,05 М Na-фосфатном буферном растворе (рН 6,8) с 0,02% NaN₃.

Аналогично, исходя из 5 мл триглицид-сефарозы, получали адсорбент Е.

Хроматография α-L-фукозидазы на адсорбентах А — Е. Аффинную хроматографию проводили на стеклянных колонках (0,6 × 11 см) при 4°. Колонку уравнивали 10 мМ Na-фосфатным буферным раствором (рН 5,5) с 0,02% NaN₃ (УБР) и наносили частично очищенный препарат фукозидазы (360 ед./мл адсорбента) в том же буферном растворе, полученный после гель-фильтрации на сефадексе G-25. Адсорбент промывали УБР до отсутствия поглощения при 280 нм в элюате. Элюцию фукозидазы проводили как описано выше (см. рис. 1, 3—5). Объем фракций 1 мл, скорость тока через колонку 15 мл/ч. Фракции, проявляющие α-L-фукозидазную активность, объединяли и концентрировали методом ультрафильтрации. Регенерацию адсорбента для повторного использования проводили 7 М мочевиной при 20°. Адсорбенты А и Б могут быть использованы 8—10 раз без заметного ухудшения их сорбционных свойств.

Авторы искренне благодарны Е. Л. Розенфельд за постоянный интерес к настоящей работе и полезное обсуждение результатов, Л. М. Лихошерстову (ИОХ АН СССР) за проведение аминокислотного анализа гидролизатов адсорбентов, М. П. Струковой (МИТХТ им. М. В. Ломоносова) за микроаналитическое определение содержания азота в адсорбенте Г, а также С. Э. Лурье за техническую помощь при оформлении настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Викторова Л. Н., Клящицкий Б. А., Раменский Е. В. (1979) Биорган. химия, 5, 100—104.
2. Клящицкий Б. А., Шапот В. С. (1976) Успехи биол. химии, 17, 234—267.
3. Mega T., Matsushima Y. (1976) J. Biochem. (Tokyo), 79, 185—194.
4. Mega T., Matsushima Y. (1977) J. Biochem. (Tokyo), 81, 571—578.
5. Nishikawa A. H., Bailon P. (1975) Arch. Biochem. and Biophys., 168, 576—584.
6. Robinson D., Thorpe R. (1974) FEBS Lett., 45, 191—193.
7. Wiederschain G., Rosenfeld E. L. (1969) Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1075—1084.
8. Wiederschain G. Ya., Rosenfeld E. L. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 44, 1008—1014.
9. Wiederschain G., Kolibaba L. G., Rosenfeld E. L. (1973) Clin. chim. acta, 46, 305—310.
10. Robinson D., Thorpe R. (1973) Clin. chim. acta., 47, 403—407.
11. Впдершайн Г. Я. (1974) Докл. АН СССР, 214, 462—464.
12. Alhadeff J. A., O'Brien J. S. (1977) Practical Enzymology of the Sphingolipidoses (Glew R. H., Peters S. P., Liss A. R., eds.), pp. 247—281, vol. 1, Inc., N. Y.
13. Blumberg S., Hildesheim J., Yariv J., Wilson K. J. (1972) Biochem. et biophys. acta, 264, 171—176.
14. Alhadeff J. A., Miller A. L., Wenaas H., Vedvick T., O'Brien J. S. (1975) J. Biol. Chem., 250, 7106—7113.
15. Alhadeff J. A., Miller A. L., O'Brien J. S. (1974) Anal. Biochem., 60, 424—430.
16. Alhadeff J. A., Janowsky A. J. (1977) J. Neurochem., 28, 423—427.
17. Alhadeff J. A., Janowsky A. J. (1978) Clin. chim. acta, 82, 133—140.
18. Dawson G., Tsay G. (1977) Arch. Biochem. and Biophys., 184, 12—23.
19. Opheim D. J., Touster O. (1977) J. Biol. Chem., 252, 739—743.
20. Wright K., Northcote D. H., Davey R. M. (1976) Carbohydr. Res., 47, 141—150.
21. Lowe C. R., Dean P. D. G. (1974) Affinity chromatography, pp. 33—34, A Wiley — Interscience Publication, London.

22. Schaar R. L., Sparks T. F., Roseman S. (1977) *Anal. Biochem.*, **49**, 513—525.
23. Wilchek M., Miron T. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **72**, 108—113.
24. Frank J., Kriwaczek V. M., Murchand C., Schwyzer R. (1977) *Helv. chim. acta*, **60**, 2550—2558.
25. Uy R., World F. (1977) *Anal. Biochem.*, **81**, 98—107.
26. Aukrust L. E., Norum K. R., Skalhegg B. A. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **438**, 13—22.
27. Jain R. S., Binder R. L., Levy-Benshimol A., Buck C. A., Warren L. (1977) *J. Chromatogr.*, **139**, 283—290.
28. Kiyohara T., Terao T., Shioiri-Nakano K., Osawa T. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 9—17.
29. Grebner E. E., Parikh I. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **350**, 437—441.
30. Клящицкий Б. А., Митина В. Х. (1978) *Ж. общ. химии*, **48**, 913—919.
31. Струкова М. П., Веслова Г. И. (1973) *Ж. анал. химии*, **28**, 1025—1027.
32. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
33. Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairmann W., Leimgruber W., Weigele M. (1972) *Science*, **178**, 871—872.
34. Davis B. Y. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.
35. Видершайн Г. Я., Колябаба Л. Г. (1971) *Вопр. мед. химии*, **17**, 428—439.
36. Пеккель В. А. (1977) *Лаб. дело*, **5**, 313—314.

Поступила в редакцию
14.VII.1978

**ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY BIOSPECIFIC
AFFINITY CHROMATOGRAPHY. III. CHROMATOGRAPHY OF HUMAN
KIDNEY α -L-FUCOSIDASE ON THE AFFINITY ADSORBENTS CONTAINING
L-FUCOSE DERIVATIVES**

BEYER E. M., KLYASHCHITSKY B. A., WIEDERSCHAING. Ya.

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

Chromatography of human kidney α -L-fucosidase on a series of affinity adsorbents containing L-fucose derivatives and varying amounts of charged and hydrophobic groups has been carried out. Nonspecific interactions were shown to operate in the enzyme adsorption. The crude enzyme preparation was purified about 2600-fold with 40-50% yield by chromatography on the biospecific adsorbent, N-(ϵ -aminocaproyl)- β -L-fucopyranosylamine-Sepharose. Optimal conditions of the affinity purification of α -L-fucosidase and some general aspects of affinity chromatography of glycosidases were discussed.