



УДК 547.96:543.545

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ АКТИНОКСАНТИНА  
В ИСКУССТВЕННОМ ГРАДИЕНТЕ рН*Решетов П. Д., Жигис Л. С., Стерлигова Н. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва**Ажицкий Г. Ю.**Крымский государственный медицинский институт, Симферополь*

Описан препаративный вариант изоэлектрофокусирования белков в искусственном градиенте рН. Фокусирование проводили в специально сконструированной колонке. Градиент рН 3,0—4,5 формировали с помощью изменения концентрации маннита в боратном буфере. Получены две изоформы актиноксантина, характеризующиеся изоточками 3,5 и 3,8. Устойчивая изоформа получена в виде кристаллов, пригодных для целей рентгеноструктурного анализа.

В ходе изучения противоопухолевого белка актиноксантина была определена его первичная структура и положение дисульфидных связей [1], найдены условия кристаллизации и получены предварительные данные о группе симметрии и параметрах элементарной ячейки [2]. Однако имеющиеся кристаллы по форме и размерам не удовлетворяли требованиям рентгеноструктурного анализа. Более того, препараты актиноксантина, охарактеризованные N- и C-концевыми аминокислотами (аланин и глицин соответственно), аминокислотным составом и гомогенные при диск-электрофорезе, оказались негомогенными при изоэлектрофокусировании в присутствии амфолинов (см. ниже). В связи с этим нами были изучены причины гетерогенности актиноксантина, разработаны условия его дополнительной очистки и в конечном итоге найдены условия выращивания кристаллов, удовлетворяющих требованиям рентгеноструктурного анализа. При этом для систематического получения препарата мы впервые использовали препаративное изоэлектрофокусирование в искусственном градиенте рН. В настоящей работе мы даем описание этого метода, который, как нам кажется, может найти широкое применение в химии белка.

Изоэлектрофокусирование в естественном градиенте рН широко применяется в биоорганической химии как высокоэффективный метод фракционирования белков. Однако в ряде случаев амфолины, применяющиеся для создания градиента рН, образуют с белками прочные комплексы, что приводит к изменению изоточек и появлению артефактов. Разрушение комплексов и отделение остаточных амфолинов требуют специальных методов [3—5]. Поскольку амфолины имеют молекулярную массу в диапазоне 300—600, их трудно отделить от пептидов, а следовательно, изоэлектрофокусирование в естественном градиенте рН практически невоз-

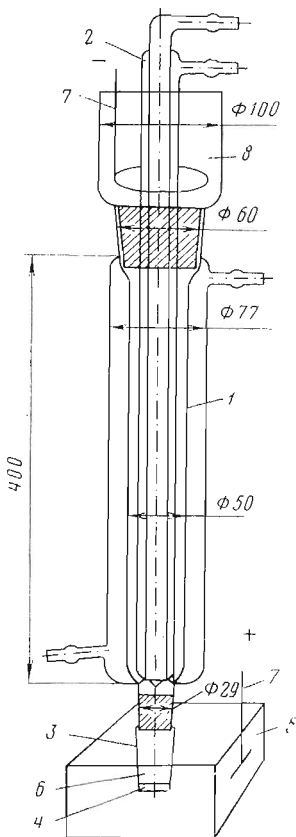


Рис. 1

Рис. 1. Схема колонки для изоэлектрофокусирования в искусственном градиенте рН. 1 — собственно колонка с паружным кожухом, 2 — пальцевый вкладыш, 3 — пористый фильтр, 4 — нижняя насадка, 5 — нижний электродный сосуд, 6 — акриламидный гель, 7 — электроды, 8 — верхняя насадка

Рис. 2. Изменение начального градиента (1) до конечного (2) в процессе изоэлектрофокусирования при начальном линейном (а) и компенсирующем (б) градиенте. Состав ступеней градиента см. в таблице

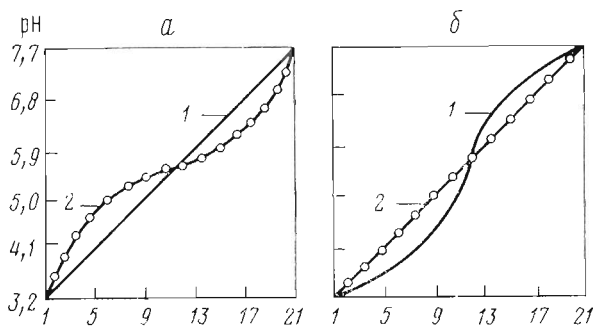


Рис. 2

можно использовать для фракционирования смеси пептидов. В связи с этим неоднократно предпринимались попытки разработать устойчивые искусственные и естественные градиенты рН на основе обычных кислот и оснований [6—8]. Эти исследования, хотя и расширили понимание механизма формирования и изменения градиента рН, не привели к каким-либо полезным практическим рекомендациям. Более того, было принято считать, что искусственные градиенты рН не стабильны во времени и, следовательно, не могут найти применения для фракционирования белков.

В 1973 г. проф. Г. В. Троицким с сотр. [9] была выдвинута перспективная идея о формировании искусственного градиента рН на основе смеси электролита (буферного раствора) с неэлектролитом и предложены различные варианты системы, построенной на этом принципе. Наиболее интересным в практическом отношении оказался борат-полиольный буфер, позволяющий получить устойчивый градиент рН в диапазоне 4,0—9,0. Поскольку аналитические эксперименты по фракционированию альбумина дали положительный результат [10], мы использовали этот метод для анализа актиносаптина, а также предложили препаративный вариант метода, рассчитанный на фракционирование не менее 100 мг суммарного препарата.

Аналитическое изоэлектрофокусирование проводили на колонке объемом 50 мл, рассчитанной на 5—10 мг препарата. Для препаративного разделения нами была сконструирована специальная колонка, существенно отличающаяся от известных колонок фирмы LKB. Последние были непригодны в техническом отношении, поскольку рассчитаны на 15—20 мл электродных растворов, а при работе в борат-полиольной системе объем католита и анолита составляет 800—1000 мл.

В разработанной нами колонке удовлетворительно решены вопросы отвода тепла, герметизации и элюирования. Как показано на рис. 1, конструкция включает в себя собственно колонку с наружным кожухом, погружной холодильник, нижнюю и верхнюю насадки и нижний резервуар. Колонка с кожухом является основным рабочим элементом, в котором формируют градиент рН. Погружной холодильник, выполненный в виде пальца, закрепляют в штатив независимо от колонки: для его опоры при сборке служат выступы в нижней части пальца. Верхняя насадка служит резервуаром для католита и в отличие от аналитической колонки не имеет пробки из полиакриламидного геля. Такой пробкой снабжена нижняя насадка, которая служит для поддержания рабочего буфера и контакта с анолитом. Все элементы колонки просты в изготовлении и надежны в работе. Подачу и отбор рабочего буфера осуществляют сверху, причем перемещение полиэтиленового шланга микронасоса проводят с помощью полуавтоматического устройства. Отбор сверху при элюции позволяет избежать размывания зон, что обеспечивает более высокое разрешение. Кроме того, при этом исключается растворение полиола (маннита), выпавшего в осадок в нижней части колонки, а следовательно, и изменение рН буферного раствора. В качестве источника питания использовали стабилизированный по току выпрямитель, обеспечивающий оптимальный режим работы (1500 В, 25 — 5 мА) на протяжении всего эксперимента.

Искусственный градиент рН формировали, создавая переменную концентрацию маннита в боратном буфере на фоне линейного градиента концентрации сахарозы. Предварительно нами было установлено, что линейный градиент рН на основе одного полиола приобретает в ходе эксперимента S-образную форму (рис. 2а), что связано с более высокой подвижностью борат-полиольных комплексов в области основных значений рН. Вследствие этого был построен на графике, а затем создан в колонке «компенсирующий» градиент рН (рис. 2б), который в ходе эксперимента самопроизвольно приобретает линейную форму. Совмещение двух градиентов концентрации маннита и сахарозы осуществляли путем последовательного наслаивания серии заранее приготовленных растворов с различным содержанием сахарозы и маннита согласно таблице. В кислотной области рН использовали насыщенный раствор маннита.

Как показано на рис. 3, при правильном выборе исходного градиента рН в конце эксперимента в колонке действительно создавался линейный градиент рН в диапазоне 3,0—4,5. В результате удалось осуществить хорошее разрешение двух изоформ актиноксантина (I —  $rI$  3,8, II —  $rI$  3,5) и сопутствующих примесей (X). После отделения от сахарозы, маннита и боратного буфера обе формы были получены в виде лиофилизированных препаратов в количестве 30 и 25 мг соответственно. По аминокислотному составу и N-концевым аминокислотам обе изоформы оказались идентичными суммарному препарату [1]. Примеси, присутствующие в препарате, нами не исследовались. С учетом потерь при отделении от низкомолекулярных веществ (ультрафильтрация, гель-фильтрация, лиофилизация) выход белка (из 100 мг суммарного препарата) следует считать удовлетворительным.

Аналогичные данные о гетерогенности актиноксантина получены нами при аналитическом изоэлектрофокусировании в амфолинах с узким диапазоном рН (см. рис. 4а). Существенно, что две изоформы найдены только в свежеприготовленных биологически активных препаратах (см. рис. 3 и 4а), тогда как инактивированные при хранении препараты представляют собой изоформу II (см. рис. 4б). Для разделения изоформ можно также использовать электрофорез в колонке с целлюлозой по Порату [11]. В изоформе I, полученной с помощью изоэлектрофокусирования, вновь обнаруживается биологически малоактивная изоформа II.

Существование в виде двух и более изоформ характерно для многих белков, в том числе и для гомологичных актиноксантину противоопухолевых белков — неокарциностатина [12, 13] и макромоицина [14]. У нео-

Рис. 3. Изоэлектрофокусирование свежеприготовленного препарата актиноксантина в искусственном градиенте рН (см. «Экспер. часть»): I — рI 3,8; II — рI 3,5; объем фракций 10 мл

Рис. 4. Изоэлектрофокусирование свежеприготовленного (а) и денатурированного при хранении (б) препаратов актиноксантина в присутствии амфолинов (колонка LKB 110 мл, 1400 В, 25–5 мА, 40 ч): а — 16 мг препарата, объем фракций 5 мл; I — рI 3,85; II — рI 3,48; б — 11 мг препарата, объем фракций 2,5 мл; II — рI 3,44

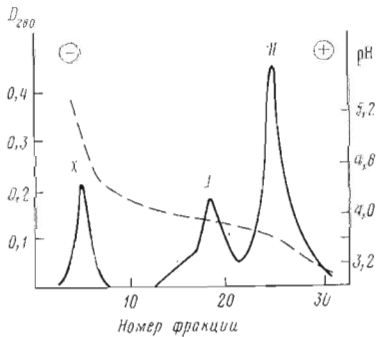


Рис. 3

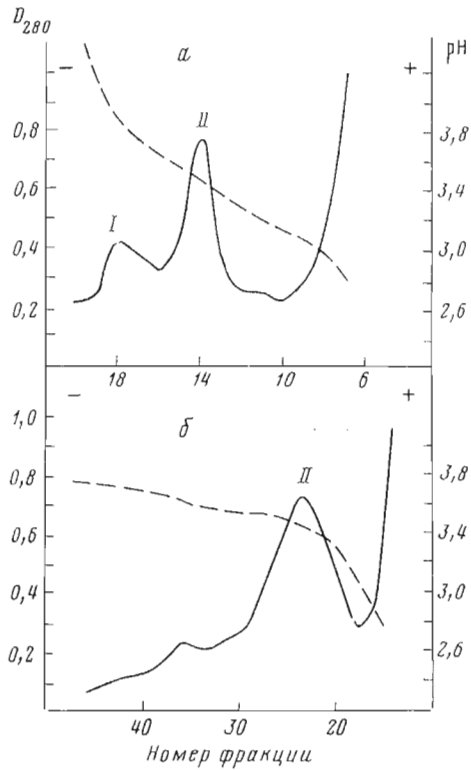


Рис. 4

карципостатина, например, биологическая активность также свойственна изоформе с более высокой изоточкой (рI 3,26–3,28). Эта изоформа нестабильна и в растворе спонтанно переходит во вторую, малоактивную изоформу (рI 3,13–3,15).

В ряде работ [15, 16] приводятся убедительные доказательства того, что одной из причин гетерогенности белков и пептидов является гидролитическое дезамидирование амидных групп глутамина и аспарагина. Экспериментально показано, что на скорость реакции существенное влияние оказывают такие факторы, как непосредственное окружение остатков глутамина и аспарагина в полипептидной цепи, величина рН, ионная сила, температура и даже природа буферного раствора. В частности, скорость дезамидирования максимальна в фосфатном буфере и минимальна в боратном и триссодержащем буферных растворах [15]. Поскольку факторы, способствующие дезамидированию, не всегда принимаются во внимание, многие белки теряют амидный азот *in vitro* при выделении и фракционировании. К таким белкам относится, например, аспаратаминотрансфераза [17]. Некоторые белки, например  $\alpha$ A- и  $\alpha$ B-цепи кристаллина — структурного белка хрусталика глаза, — способны дезамидироваться и *in vivo* [18]. Более того, в препаратах кристаллина из зрелых особей обнаружен наиболее высокий уровень де-

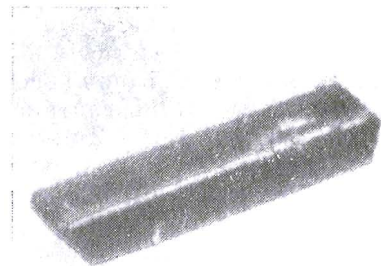


Рис. 5. Кристаллы актиноксантина (0,25×0,25×1 мм)

**Приготовление растворов для формирования градиентов рН  
в диапазоне рН 3,0–4,5**

Номер ступени	рН	Раствор 1, мл	Раствор 2, мл	Номер ступени	рН	Раствор 1, мл	Раствор 2, мл
1	3,00	0	20	12	5,68	11	9
2	3,45	1	19	13	5,72	12	8
3	3,92	2	18	14	5,81	13	7
4	4,55	3	17	15	5,95	14	6
5	5,00	4	16	16	6,08	15	5
6	5,20	5	15	17	6,26	16	4
7	5,27	6	14	18	6,40	17	3
8	5,36	7	13	19	6,62	18	2
9	5,45	8	12	20	6,98	19	1
10	5,54	9	11	21	7,40	20	0
11	5,63	10	10				

Примечание: рН каждой фракции доводят маннитом. Раствор 1: 0,02 M боратный буфер, рН 7,4. Раствор 2: 40% раствор сахарозы в растворе 1.

замирирования и протеолиза [19, 20]. На этом основании некоторые исследователи отводят остаткам глутамина и аспарагина в белках роль биологических часов, определяющих время существования того или иного белка, а также связывают процесс дезамирирования со старением организма в целом [16].

Что касается дезамирирования белков, гомологичных актиноксантину, то наиболее детально этот вопрос изучен на примере неокарциностаина [21]. Оказалось, что потеря амидного азота наблюдается при диализе неокарциностаина в достаточно мягких условиях (рН 3,2; 4° С). Далее было показано, что быстрому дезамирированию подвергается лишь один остаток аспарагина, расположенный в последовательности -Val-Asn-Cys- (82—84). В связи с этим важно отметить, что аналогичный фрагмент имеется и в актиноксантине: -Val-Asp-Cys- (81—83). По-видимому, можно с достаточным основанием предполагать, что остаток аспарагиновой кислоты-82 появился в результате спонтанного дезамирирования остатка аспарагина, собственного активной изоформе I. В то же время три остатка аспарагина (в положениях 89, 94, 98) и четыре остатка глутамина вполне устойчивы и изоформа II (рI 3,5) не меняет характеристик при хранении. Поскольку нам не удалось найти способ стабилизации изоформы I, для дальнейших исследований использовали изоформу II.

Кристаллы актиноксантина выращивали при диализе против концентрированного раствора 2-метил-2,4-пентадиола (см. «Экспериментальную часть»). Кристаллы имели призматическую форму со средним размером 0,25×0,25×1,0 мм (рис. 5) и характеризовались высокой устойчивостью к рентгеновскому излучению. Они позволяли получать дифракционное поле, обеспечивающее разрешение до 1,8 Å, что указывает на высокое качество материала.

Положительные результаты были получены нами при препаративном изоэлектрофокусировании в борат-полиольной системе некоторых других белков (каталазы и глюкозооксидазы, миоглобина, альбумина человека и бычьего сывороточного альбумина). На этом основании можно с уверенностью утверждать, что изоэлектрофокусирование в борат-полиольной системе представляет собой удобный препаративный метод фракционирования белков, доступный широкому кругу исследователей.

### Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы квалификации ч.д.а и х.ч., а также маннит (ч.д.а.) производства Chemapol (ЧССР). Препараты актиноксантина фракционировали методом изоэлектрофокусирования на колонке раз-

мером 50×350 см (объем 400 мл). Схема колонки приведена на рис. 1. Охлаждение осуществляли водопроводной водой. В нижней части колонки помещена насадка (муфта нш 29), заполненная 7% акриламидным гелем. Верхний и нижний электродные сосуды заполняли 0,1 М боратным буферным раствором с рН 7,4. Для создания градиента концентрации сахарозы и рН использовали 0,02 М боратный буферный раствор (рН 7,4), 40% раствор сахарозы в рабочем буфере и маннит. Предварительно готовили 21 фракцию объемом 20 мл с переменным содержанием сахарозы в боратном буфере, а затем в каждую фракцию добавляли порошкообразный маннит (см. таблицу). Фракции последовательно вносили в колонку с помощью перистальтического насоса со скоростью подачи 60 мл/ч. Тщательно обезсоленные препараты актиноксантина (в количестве 100 мг) растворяли во фракциях № 18 или 19 и вносили в колонку. После заполнения рабочей части колонки осторожно наслаивали верхний электродный буферный раствор и включали источник питания. Изоэлектрофокусирование проводили при 5—6 мА и 600—1500 В в течение 48 ч. Отбор фракций (объемом 10 мл) проводили сверху с помощью перистальтического насоса со скоростью 150—200 мл/ч. Запись электропроводности и поглощения проводили на проточном денситометре РЭППС отечественного производства. Результаты фракционирования приведены на рис. 3. Объединенные фракции, содержащие компоненты I и II, добавляли в 2—3 раза дистиллированной водой и концентрировали до конечного объема 20 мл на мембранах для ультрафильтрации УАМ-50 отечественного производства на приборе для ультрафильтрации ФМ-01 отечественного производства. Остатки солей и реактивов удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в 0,05 М бикарбонате аммония. Выход компонентов I и II при фракционировании 100 мг свежеприготовленного препарата составил 30 и 25 мг соответственно. В препарате, подвергнутом длительному хранению, обнаружен главным образом компонент II (рI 3,5).

*Изоэлектрофокусирование актиноксантина в амфолинах.* Амфолины рН 3—10 (ЛКВ, Швеция) фракционировали в колонке для изоэлектрофокусирования объемом 110 мл (ЛКВ, Швеция) в стандартном градиенте сахарозы при концентрации амфолинов 4%. Фракционирование проводили при 500 В и 5 мА в течение 2 ч. Содержимое колонки элюировали и объединенные фракции с рН 3,0—5,0 использовали для фракционирования препаратов актиноксантина. Изоэлектрофокусирование актиноксантина (в количестве 11—16 мг) проводили на той же колонке при 1000—1400 В и 25—5 мА в течение 40 ч. Результаты фракционирования приведены на рис. 4.

*Кристаллизация актиноксантина.* Кристаллы актиноксантина (изоформа II, рI 3,5) выращивали в течение 3—4 недель при 2°С в 60—70% растворе 2-метил-2,4-пентандиола в 20 мМ Na-ацетатном буфере, рН 4,4, при диализе против 75% 2-метил-2,4-пентандиола в том же буферном растворе. Полученные кристаллы изображены на рис. 5.

Авторы выражают признательность чл.-кор. А. С. Хохлову и проф. Г. В. Троицкому за интерес к работе и ценные советы при обсуждении результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Khokhlov A. S., Reshetov P. D., Chupova L. A., Cherches B. Z., Zhigis L. S., Stoyachenko I. A. (1976) *J. Antibiotics*, **29**, 1026—1034.
2. Мелик-Адамян В. Р., Решетов П. Д. (1974) Докл. АН СССР, **214**, 1440—1441.
3. Isoelectric focusing (1976) pp. 71—73, Acad. Press, Inc.
4. Антонов В. К., Воротынцева Т. И., Александров С. Л., Гаврилова Н. А., Арсеньева Е. Л. (1975) Докл. АН СССР, **221**, 1215—1218.
5. Baumann G., Chrambach A. (1975) *Analyt. Biochem.*, **69**, 649—651.
6. Caspers M. L., Chrambach A. (1977) *Analyt. Biochem.*, **81**, 28—39.
7. Nguyen N. I., Chrambach A. (1976) *Analyt. Biochem.*, **79**, 462—469.

8. Nguyen N. I., Chrambach A. (1976) *Anatyl. Biochem.*, **74**, 145-153.
9. Troitsky G. V., Zavyalov V. P., Kiryukhin I. F., Abramov V. M., Agitsky G. Ju. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **400**, 24-31.
10. Троицкий Г. В., Ажицкий Г. Ю., Малый К. Д. (1976) *Вопр. мед. химии*, **22**, 282-285.
11. Porath J. (1956) *Biochim. et biophys. acta*, **22**, 151-175.
12. Kikuchi M., Shoji M., Ishida N. (1974) *J. Antibiotics*, **27**, 766-774.
13. Veerman T. A., Poon R., Goldberg I. H. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **475**, 294-306.
14. Wha Bin Im, Chao-Kuo Chiang, Montgomery R. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 3259-3264.
15. McKerrow J. H., Robinson A. B. (1971) *Analyt. Biochem.*, **42**, 565-568.
16. Robinson A. B. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 885-888.
17. Williams J. A., John R. A. (1979) *Biochem. J.*, **177**, 121-127.
18. Van Kleff F. S. M., Willems-Thijssen W., Hoenders H. J. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **66**, 477-483.
19. Van Kleff F. S. M., De Jong W. W., Hoenders H. J. (1975) *Nature*, **258**, 264-265.
20. Dillee K. J., Harding J. J. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **286**, 391-408.
21. Maeda H., Kuromizu K. (1977) *J. Biochem.*, **81**, 25-35.

Поступила в редакцию  
11.X.1979

После доработки  
3.I.1980

## ISOELECTRIC FOCUSING OF ACTINOXANTHINE IN ARTIFICIAL pH GRADIENT

RESHETOV P. D., ZHIGIS L. S., STERLIGOVA N. N., AZHITSKY G. Yu.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Crimean State Medical Institute, Simpheropol*

A novel preparative version of protein isoelectric focusing in artificial pH gradients has been worked out. The separation is carried out in a specially designed column, and the pH gradient from 3,0 to 4,5 is formed by changing the mannitol concentration in a borate buffer. Two actinoxanthine isoforms of pI 3,8 and 3,5 are obtained. From the stable isoform the crystals are prepared which are suitable for X-ray structure analysis.