



УДК 577.15.07+543.544

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ
АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ****V *. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПИРУВАТДЕКАРБОКСИЛАЗЫ
ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ***Кляцицкий Б. А., Позднев В. Ф., Митина В. Х.**Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва**Воскобоев А. И., Черникевич И. П.**Отдел регуляции обмена веществ Академии наук БССР, Гродно*

Синтезированы новые биоспецифические адсорбенты, содержащие в качестве лиганда тиамин, тиаминпирофосфат или имидазол и различающиеся степенью гидрофобности. С целью выяснения вклада неспецифических и биоспецифических взаимодействий в адсорбцию фермента и выбора оптимальных условий хроматографического процесса изучено поведение апоформы пируватдекарбоксилазы на указанных адсорбентах. Разработан метод выделения электрофоретически гомогенной пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей с суммарным выходом 14% и степенью очистки 310 раз. Метод включает экстракцию раствором глицерин — EDTA, фракционирование ацетоном и сернистым аммонием, обработку $Pb(Si_3COO)_2$, гель-фильтрацию на сефадексе G-25 и аффинную хроматографию на тиаминпирофосфат — 4-азобензоил-ε-аминокапроилгидразидосефарозе.

Пируватдекарбоксилаза (карбокси-лиаза 2-оксикислот, КФ 4.1.1.1) из микроорганизмов, в частности из дрожжей, катализирует реакцию простого декарбоксилирования пировиноградной кислоты с образованием уксусного альдегида и CO_2 . Из всей группы тиаминовых ферментов, участвующих в данной реакции, пируватдекарбоксилаза — единственный фермент, в результате действия которого образующийся альдегид выделяется в среду в свободном виде. Для проявления каталитической активности ферменту необходим кофактор — тиаминпирофосфат.

Недавно было установлено [2, 3], что при очистке пируватдекарбоксилазы классическими методами полипептидные цепи фермента подвергаются частичному расщеплению в результате действия сопутствующих протеиназ. С целью исключения или уменьшения протеолиза в последнее время были предприняты попытки выделения пируватдекарбоксилазы или пируватдегидрогеназного комплекса методом АФХ с применением в качестве лигандов аналогов субстрата, а также тиамина или его пирофосфорного эфира [3, 4]. Хроматография на N-оксалоил-аминогексилсефарозе 4В показала [3], что сходство к адсорбенту было недостаточным для эффективного связывания фермента. Аналогичные результаты получены [3]

* Сообщение IV см. [1]; сокращения: АФХ — аффинная хроматография.

при хроматографии пируватдекарбоксилазы или ее апоформы на тиаминпирофосфате, присоединенном через γ -аминомасляную кислоту по 4'-аминогруппе пириимидинового кольца к сефарозе 4В, активированной BrCN . В то же время связывание апо- или холофермента с тиаминпирофосфатом — или тиамин-N-4-азобензоил- ω -аминогексилсефарозой, даже в отсутствие ионов Mg^{2+} как эффектора, было настолько сильным, что десорбировать сколько-нибудь заметное количество белка удалось лишь теплым 30 мМ додецилсульфатом натрия [3]. Трудность элюции фермента в данном случае может быть обусловлена отмечавшимся ранее [5] жестким неспецифическим связыванием многих белков с указанными адсорбентами ввиду наличия на последних заряженных и гидрофобных групп (холопируватдекарбоксилаза, например, адсорбируется на гидрофобной гексилсефарозе [3]). Кроме того, при получении адсорбентов с азосвязью все синтетические стадии проводили на сефарозе [5], что в конечном счете могло привести к химически неоднозначному сорбенту, а это осложнило бы выбор оптимальных условий очистки и интерпретацию полученных результатов.

В работах [4, 6] описано получение адсорбентов присоединением тиаминпирофосфата к аминоэтилсефарозе 2В карбодимидным методом. К недостаткам этих адсорбентов относится их лабильность, выражающаяся в постоянном отщеплении лиганда даже при хранении адсорбента. Это препятствует использованию адсорбентов такого типа для препаративной очистки пируватдекарбоксилазы.

В настоящем сообщении описано получение четырех новых адсорбентов, не имеющих катионного заряда в месте присоединения вставки к носителю и различающихся степенью гидрофобности: тиамин-N-4-азобензоил- ϵ -аминокапроилгидразидосефароза (адсорбент А), тиаминпирофосфат-N-4-азобензоил- ϵ -аминокапроилгидразидосефароза (адсорбент Б), тиаминпирофосфат-N-4-азобензоилглицилглицилгидразидосефароза (адсорбент В) и имидазол-N-4-азобензоил- ϵ -аминокапроилгидразидосефароза (адсорбент Г). Исследовано влияние электростатических и гидрофобных взаимодействий на адсорбцию пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей и проведена очистка фермента до электрофоретически гомогенного состояния с использованием АФХ на адсорбенте Б.

Синтез адсорбентов А—В представлен на схеме. Метиловый эфир ϵ -аминокапроновой кислоты (I) или этиловый эфир глицилглицина (II) ацилировали хлорагидридом 4-нитробензойной кислоты. Полученные 4-нитробензоилпроизводные (III) или (IV) обработкой гидразингидратом превращали соответственно в гидразид N-4-нитробензоил- ϵ -аминокапроновой кислоты (V) или гидразид N-4-нитробензоилглицилглицина (VI). Вещества (V) и (VI) — удобные исходные соединения для получения аффинных адсорбентов путем присоединения к BrCN -активированной сефарозе через гидразидную группу, последующего восстановления нитрогруппы, диазотирования и сочетания с различными лигандами. При этом связь вставка—носитель в полученном сорбенте оказывается незаряженной при физиологических значениях рН [7] и исключается обычно использу-

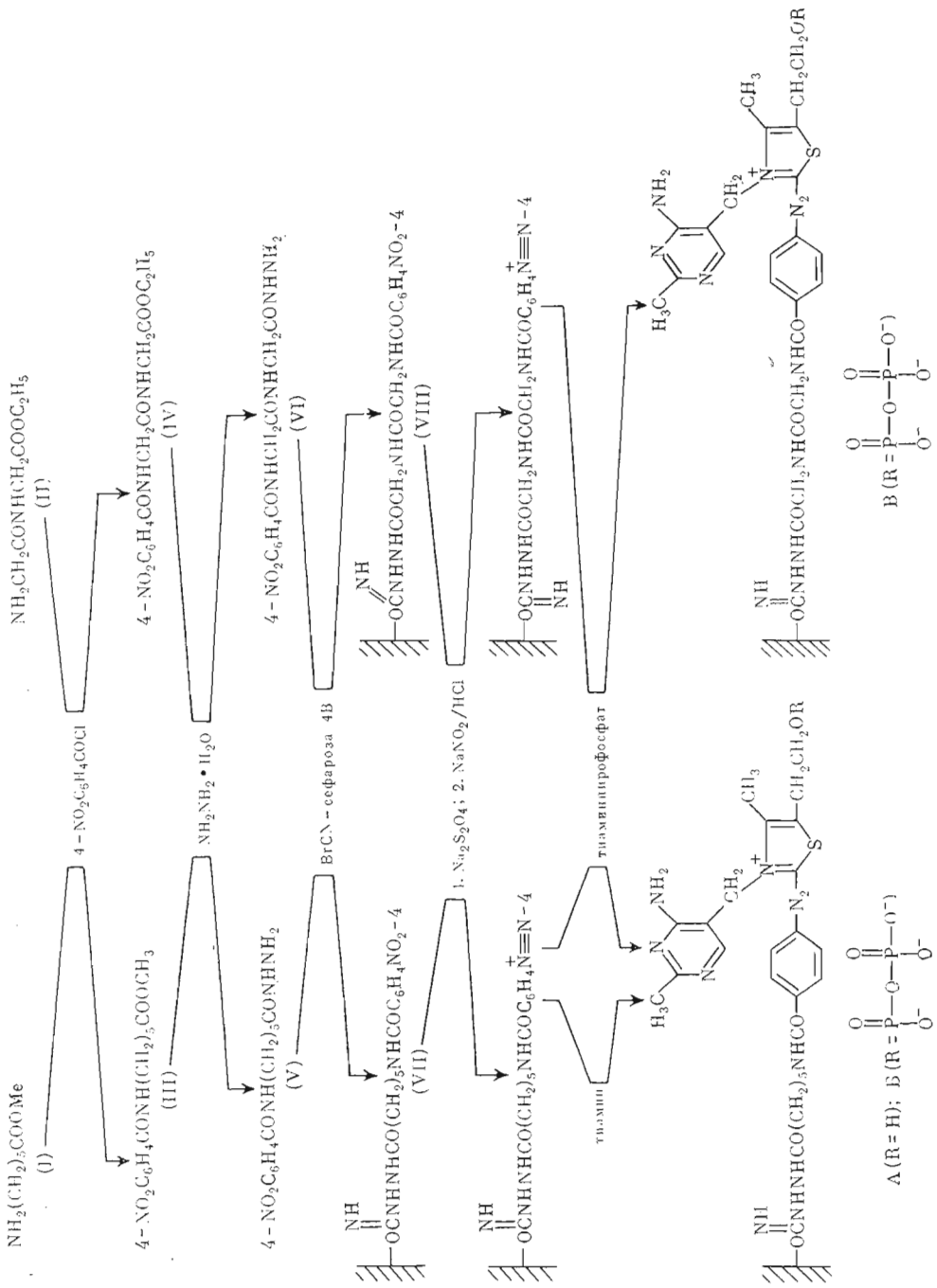
Таблица 1

Сравнительная характеристика адсорбентов А—Г

Адсорбент	Емкость по белку*, мг/мл адсорбента	Белок, десорбируемый 1 М NaCl в УБР, % к связавшемуся с адсорбентом	Емкость по апопируватдекарбоксилазе** в отсутствие Mg^{2+} , мг/мл адсорбента	Емкость по апопируватдекарбоксилазе** в присутствии Mg^{2+} , мг/мл адсорбента
А	5,71	6,4	1,23	1,07
Б	5,84	6,7	1,42	1,21
В	3,67	4,8	0,31	0,28
Г	1,53	5,6	0,13	0,00

* Белок, десорбируемый 5 М мочевиной.

** Десорбируется ЭБР (рН 8,6).



мая при получении адсорбентов такого рода [8] стадия конденсации аминоклипронизводного твердого носителя с азидом 4-нитробензойной кислоты, в результате которой на адсорбенте могут оставаться непрореагировавшие заряженные аминоклильные группы.

Присоединение соединений (V) или (VI) к BrCN-активированной сефарозе проводили в 0,1 М NaHCO₃, pH 8,0, или в уксусной кислоте. Восстановление нитрогруппы на полученных сорбентах (VII) и (VIII) с помощью дитионита натрия, последующее диазотирование и присоединение тиаминили тиаминпирофосфата осуществляли в условиях, описанных в работе [5]. Аналогично адсорбентам А и Б был синтезирован контрольный адсорбент Г, содержащий вместо тиаминили тиаминпирофосфата имидазол. Полученные ярко-красные адсорбенты А—Г хранили в водной суспензии при 4°С в присутствии 0,02% азидата натрия.

В модельных экспериментах при хроматографии частично очищенного препарата пируватдекарбоксилазы на адсорбенте А было установлено, что наиболее эффективное связывание с адсорбентом наблюдается при pH 6,8—6,9 (рис. 1) в условиях, оптимальных для рекомбинации тиаминпирофосфата с апопируватдекарбоксилазой [9]. В этих условиях с адсорбентом связывалось 5,71 мг белка/мл геля. Электрофорез фракций, элюированных 5 М раствором мочевины, показал, что помимо основной полосы, соответствующей пируватдекарбоксилазной активности, присутствуют еще 5 дополнительных полос сопутствующих белков. Более высокие концентрации мочевины, а также 0,5% раствор додецилсульфата натрия при 60°С не вызывали дополнительной десорбции белка.

Попытки биоспецифической элюции пируватдекарбоксилазы с адсорбента А 5% раствором субстрата (пирувата натрия) оказались безуспешными. Десорбция с помощью уравнивающего буферного раствора (УБР — 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 6,8), 0,5 мМ EDTA и 5 мМ 2-меркаптоэтанол), содержащего 1 М NaCl, приводила лишь к незначительной элюции белка (6—7%), не обладающего пируватдекарбоксилазной активностью. Электрофоретически гомогенная пируватдекарбоксилаза была количественно выделена при использовании 20 мМ трис-HCl-буфера с 0,5 мМ EDTA и 10 мМ 2-меркаптоэтанолом (ЭБР — элюирующий буферный раствор), pH 8,6 (рис. 2) — в условиях образования апоформы фермента [9]. Емкость адсорбента А, определенная при заведомом его насыщении пируватдекарбоксилазой, составляла в этих условиях 1,23 мг фермента/мл геля. Введение в УБР ионов Mg²⁺ приводит даже к некоторому снижению емкости адсорбента — возможно, ввиду неполной десорбции фермента в условиях элюции (табл. 1). При более высоких значениях pH ЭБР наблюдалась десорбция балластных белков, загрязняющих ферментный препарат.

При хроматографии апофермента на адсорбенте Б получены подобные результаты (табл. 1), причем емкость адсорбента оказалась несколько выше — 1,42 мг апопируватдекарбоксилазы/мл геля. Кроме того, 5% раствор пирувата натрия в УБР частично десорбировал фермент с адсорбента Б, однако добиться количественной элюции увеличением концентрации субстрата не удалось, а полученный препарат был электрофоретически неоднородным.

Для изучения влияния гидрофобных взаимодействий при адсорбции

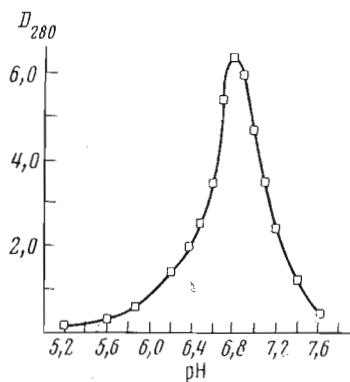


Рис. 1. Зависимость связывания апопируватдекарбоксилазы на адсорбенте А от pH

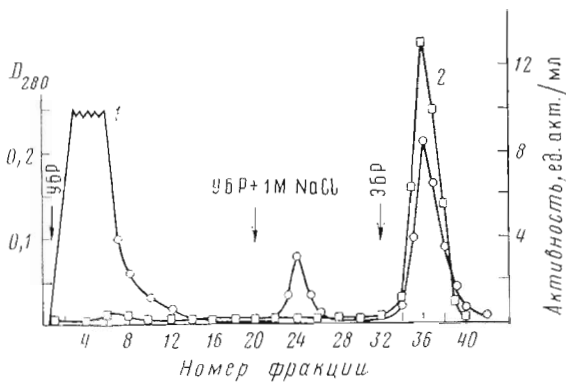


Рис. 2. Хроматография пируватдекарбоксилазы на адсорбенте А. Стрелки указывают на изменение условий элюции. 1 — поглощение при 280 нм; 2 — ферментативная активность. Условия хроматографии приведены в тексте

апопируватдекарбоксилазы на аффинных адсорбентах была проведена хроматография фермента на адсорбенте В, содержащем гидрофильную глицилглициновую вставку, и контрольном адсорбенте Г с гидрофобной ϵ -аминокапроильной вставкой и имидазолом в качестве лиганда. Как видно из табл. 1, связывание белков и емкость адсорбента В были существенно выше, чем у адсорбентов А или Б. Вместе с тем ~10% апопируватдекарбоксилазы задерживалось на колонке с контрольным адсорбентом Г. Полученные данные свидетельствуют об участии гидрофобных взаимодействий в адсорбции фермента на синтезированных биоспецифических адсорбентах.

Таким образом, поведение апоформы пируватдекарбоксилазы на адсорбентах А—Г отражает сложный комплекс взаимодействий фермента с адсорбентом, которые носят как неспецифический, так и биоспецифический характер. На биоспецифический характер сорбции фермента указывает тот факт, что лишь апоформа пируватдекарбоксилазы способна связываться с адсорбентами А—Г. Холопируватдекарбоксилаза не задерживается на указанных адсорбентах. На участие биоспецифических сил в связывании апофермента указывает также возможность его частичной элюции с адсорбента Б с помощью высоких концентраций субстрата и лишь незначительная адсорбция на сорбенте Г.

Данные приведенных выше экспериментов показали, что лучшие результаты при АФХ пируватдекарбоксилазы достигаются на адсорбенте Б, содержащем в качестве лиганда кофермент — тиаминпирофосфат, при введении фермента в УБР с pH 6,8 и последующей элюции при pH 8,6. АФХ в указанных условиях была включена в качестве заключительной и наиболее эффективной стадии препаративной очистки пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей (табл. 2). Суммарный выход фермента составил 14% со степенью очистки 310 раз. Полученный препарат давал одну белковую полосу при электрофорезе в полиакриламидном геле и отличался крайней нестабильностью в отсутствие 2-меркаптоэтанола, оказывающего,

Таблица 2

Очистка пируватдекарбоксилазы из пивных дрожжей

Стадия очистки	Белок, мг	Активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Выход, %	Степень очистки
Исходный экстракт	5900	1180	0,2	100	1
Фракционирование ацетоном	1530	840	0,55	71	2,75
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	450	625	1,4	53	7
Обработка $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	170	459	2,7	39	13,5
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	146	425	2,9	36	14,5
АФХ на адсорбенте Б	2,64	164,4	62	14	310

по-видимому, стабилизирующий эффект на SH-группы апопируватдекарбоксылазы. В присутствии 2-меркаптоэтанола удельная активность фермента практически не снижалась в течение суток и в отличие от данных [3] фрагментации белка при этом не наблюдалось.

Полученные в настоящей работе результаты демонстрируют возможность препаративной очистки дрожжевой пируватдекарбоксылазы до гомогенного состояния с использованием метода АФХ на новых тиаминсодержащих биоспецифических адсорбентах. Следует отметить, что в процессе многократного использования свойства и емкость указанных адсорбентов постепенно ухудшались. Так, при хроматографии пируватдекарбоксылазы на свежеприготовленном адсорбенте Б суммарный выход фермента составил 14%, а после 14—15-кратного использования адсорбента выход не превышал 2—3%.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефадекс G-25 и сефарозу 4 В (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), 2-меркаптоэтанол и BrCN (Serva, ФРГ), тиамин и тиаминпирофосфат (Fluca, Швейцария). Остальные реактивы — высокой чистоты («Союзреактив», СССР).

Апопируватдекарбоксылазу выделяли по методу [9]. Активность фермента определяли спектрофотометрически по убыли пирувата натрия в ходе реакции [10]. Удельную активность выражали в мкмоль субстрата, расщепленного 1 мг пируватдекарбоксылазы за 1 мин [2]. Диск-электрофорез (10—40 мкг белка) в 7% полиакриламидном геле (рН 8,9) проводили при силе тока 2 мА на трубку в первые 20 мин, а затем 4 мА на трубку в течение 2 ч [11]. Белковые полосы обнаруживали инкубацией в 0,1% растворе кумасси в 30% трихлоруксусной кислоте в течение 20—30 мин. Концентрацию белка находили по методу Лоури [12] и по поглощению в УФ-области при 280 нм.

ИК-спектры снимали на приборе Pye-Unicam SP-1000 в таблетках с KCl. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol NV-254 (ЧССР) в системе растворителей бензол — ацетон — уксусная кислота (100:100:1); вещества обнаруживали в УФ-свете.

Метилловый эфир N-4-нитробензоил-ε-аминокапроновой кислоты (III). К раствору 1,8 г (10 ммоль) хлоргидрата метилового эфира ε-аминокапроновой кислоты (I) и 2,5 г (13,5 ммоль) хлорангидрида 4-нитробензойной кислоты в 30 мл хлороформа при охлаждении водой добавляли раствор 2,5 мл триэтиламина в 10 мл хлороформа. Смесь перемешивали 30 мин при 20°С и 15 мин при 40°С, промывали 1 М K₂CO₃ (2×20 мл), водой, 1 М HCl (2×20 мл), водой, рассолом, сушили Na₂SO₄ и упаривали в вакууме. Кристаллический остаток перекристаллизовывали из смеси бензол — петролейный эфир, осадок отфильтровывали, промывали петролейным эфиром, сушили и получали 2,5 г (88%) соединения (III). Т.пл. 80—81°С, R_f 0,84. ИК-спектр (см⁻¹): 3340, 1730, 1640, 1620, 1530, 1520, 1360. Найдено, %: С 57,45; Н 6,07; N 9,08. C₁₄H₁₈N₂O₅. Вычислено, %: С 57,11; Н 6,15; N 9,51.

Этиловый эфир N-4-нитробензоилглицилглицина (IV). К раствору 6 г (30 ммоль) хлоргидрата этилового эфира глицилглицина (II) и 10 мл триэтиламина в 60 мл CH₂Cl₂ постепенно добавляли при перемешивании раствор 6 г (32 ммоль) хлорангидрида 4-нитробензойной кислоты в 30 мл CH₂Cl₂. Смесь перемешивали 2 ч при ~20°С. Осадок отфильтровывали, промывали водой (3×15 мл), CH₂Cl₂ (15 мл) и сушили в вакууме над P₂O₅. Получали 7,4 г (77,5%) этилового эфира (IV), т.пл. 199—200°С, R_f 0,5. ИК-спектр (см⁻¹): 3380, 3340, 1740, 1680, 1650, 1600, 1560, 1525, 1410, 1380, 1210. Найдено, %: С 50,41; Н 5,02; N 13,31. C₁₅H₁₅N₃O₆. Вычислено, %: С 50,48; Н 4,89; N 13,52.

Гидразид N-4-нитробензоил-ε-аминокапроновой кислоты (V). Смесь

1,5 г метилового эфира (III) и 2 мл гидразингидрата кипятили 4–6 ч, упаривали в вакууме и остаток растворяли в 20 мл 2 н. H_2SO_4 . Раствор обрабатывали этилацетатом, экстракт промывали водой, объединенный водный раствор подщелачивали твердым K_2CO_3 и оставляли на 5–6 ч при $10^\circ C$. Кристаллический осадок отфильтровывали, промывали водой (2×10 мл) и перекристаллизовывали из 10 мл спирта. Осадок промывали эфиром, высушивали в вакууме и получали 1,1 г (73,2%) гидразида (V), т.пл. $151,5\text{--}152,0^\circ C$, R_f 0,4. ИК-спектр (cm^{-1}): 3340, 1685, 1655, 1600, 1570, 1520, 1360, 1310. Найдено, %: C 53,05; H 6,50; N 19,15. $C_{13}H_{18}N_4O_4$. Вычислено, %: C 53,05; H 6,16; N 19,03.

Гидразид N-4-нитробензоилглицилглицина (VI). Смесь 2,7 г (8,7 ммоль) соединения (IV) в 20 мл метанола и 2 мл гидразингидрата кипятили 1 ч. Осадок отфильтровывали, промывали спиртом, эфиром и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Получали 2,4 г (89%) гидразида N-4-нитробензоилглицилглицина (VI). Т.пл. $244\text{--}245^\circ C$. После перекристаллизации из спирта т.пл. $251\text{--}252^\circ C$, R_f 0,16. ИК-спектр (cm^{-1}): 3300, 1700, 1645, 1600, 1560. Найдено, %: C 45,18; H 4,65; N 23,40. $C_{11}H_{13}N_5O_5$. Вычислено, %: C 44,76; H 4,43; N 23,71.

Получение тиамин-4-азобензоил-ε-аминокапроилгидразидосефарозы (адсорбент А). К перемешиваемой суспензии 10 мл сефарозы 4В, предварительно промытой 100 мл дистиллированной воды, в 10 мл 5 М К-фосфатного буфера, pH 11,9, добавляли раствор 3 г BrCN в 1,6 мл ацетонитрила и 3,5 мл воды при $4^\circ C$. Смесь перемешивали 6 мин при $4^\circ C$, быстро отделяли гель, промывали ледяной водой (100 мл) и немедленно суспендировали в растворе 294 мг (1 ммоль) гидразида (V) в 10 мл уксусной кислоты. Смесь осторожно перемешивали 16 ч при $4^\circ C$, гель отделяли, промывали 30 мл AcOH, 30 мл 50%-ного водного диоксиана и 100 мл воды. Затем гель перемешивали 2 ч при $20^\circ C$ с 10 мл 1 М этаноламина при pH 9 и промывали водой, затем 10 мл полученной N-4-нитробензоил-ε-аминокапроилгидразидосефарозы (VII) перемешивали 40 мин при $40^\circ C$ с 10 мл 0,1 М раствора дитионита натрия в 0,5 М $NaHCO_3$. Гель промывали 0,5 М $NaHCO_3$ (50 мл), водой (50 мл), 0,5 н. HCl (50 мл), суспендировали в 10 мл 0,1 М $NaNO_2$ и перемешивали 7 мин при $4^\circ C$. Гель отделяли, быстро промывали холодной водой (~50 мл) и переносили в раствор 1 г тиаминбромида в 7 мл холодного насыщенного Na-боратного буфера. С помощью 5 н. NaOH pH смеси немедленно доводили до 8,6 и перемешивали 8 ч при $4^\circ C$. Ярко-красный адсорбент А промывали 100 мл воды и хранили в водной суспензии в присутствии 0,02% азиды натрия.

Аналогично получали адсорбенты Б и В, используя в качестве лиганда тиаминпирофосфат, и адсорбент Г с имидазолом вместо тиамин.

Выделение и частичная очистка пируватдекарбоксилазы. Пируватдекарбоксилазу получали по методу [2] с разработанными нами модификациями, касающимися экстрагирования белка из дрожжей, а также изменения параметров ацетонового и аммонийного фракционирования фермента. Свежие пивные дрожжи (*Saccharomyces carlsbergensis*) центрифугировали в центрифуге S-25 (ГДР). Осадок дрожжевых клеток промывали водой, высушивали при $20^\circ C$ и измельчали на гомогенизаторе. Пируватдекарбоксилазу экстрагировали при $37^\circ C$ в течение 3 ч 800 мл 10 mM трис-HCl-буфера, pH 7,4, содержащего 1 mM EDTA и 2,5% глицерин, из 150 г измельченных дрожжей. Смесь центрифугировали 1 ч при 105000g на суперцентрифуге VAC-601 (ГДР). Охлажденную до $0^\circ C$ надосадочную жидкость (500 мл) подвергали фракционированию ацетоном, выделяя фракцию между 60–75% насыщения. Полученный осадок растворяли в 50 мл 50 mM фосфатного буфера, pH 6,8, содержащего 0,1 mM EDTA, 0,2 mM $MgSO_4$ и 0,1 mM тиаминпирофосфат, после чего диализовали против этого же буфера в течение 12 ч при $4^\circ C$. Диализованный раствор разбавляли до 300 мл и проводили фракционирование с помощью $(NH_4)_2SO_4$. Частично очищенный ферментный препарат, полученный в пределах 40–53% на-

сыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, разбавляли 100 мл дистиллированной воды и на каждые 40 мг белка добавляли по 1 мл 250 мМ раствора $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Осадок удаляли, а надосадочную жидкость смешивали со 100 мМ фосфатным буфером, рН 6,8, содержащим 1 мМ EDTA, из расчета 1 объем буфера на 3 объема добавленного раствора $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Образовавшийся на холоде в течение 30 мин осадок удаляли центрифугированием. Белок надосадочной жидкости (85 мл) высаливали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (53% насыщение). Отделение тиаминпирофосфата от холопируватдекарбоксилазы и обессоливание фермента на колонке с сефадексом G-25 (1,7×40 см) при рН 6,8 осуществляли в соответствии с работой [2].

АФХ на адсорбентах А-Г. Раствор частично очищенного препарата апопируватдекарбоксилазы в УБР (10 мл, ~146 мг белка) наносили на колонки с адсорбентами А-1' (0,8×10 см), уравновешенные тем же буфером при 4° С. Неадсорбированные белки отмывали УБР до исчезновения поглощения при 280 нм. Затем колонку промывали УБР в присутствии 1 М NaCl. Апопируватдекарбоксилазу элюировали 20 мМ трис-HCl-буфером, рН 8,6, содержащим 0,5 мМ EDTA и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, со скоростью элюции 6 мл/ч. Объем фракций 2 мл (рис. 2).

Рекомбинацию апофермента с 20 мМ тиаминпирофосфатом в присутствии 10 мМ Mg^{2+} проводили в УБР, как описано в работе [9].

При определении рН-оптимума связывания апопируватдекарбоксилазы на адсорбенте А адсорбцию фермента осуществляли в 100 мМ Na-цитратном (рН 5,2–6,0) или 50 мМ Na-фосфатном (рН 6,2–7,6) буферах, содержащих 0,5 мМ EDTA и 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Регенерацию адсорбентов для повторного использования проводили 5 М мочевиной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кляццкий Б. А. (1979) Химия природн. соед., 709–712.
2. Ullrich J., Wittorf J. H., Gubler C. J. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, 113, 595–604.
3. Ullrich J., Ortlieb E. (1979) *FEBS Special meeting on enzymes*, S 7–29, Zagreb.
4. Visser J., Strating M., Dongen W. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, 524, 37–44.
5. O'Brien T. A., Schrock H. L., Russell P., Blake R. II, Gennis R. B. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, 452, 13–29.
6. Matsuura A., Iwashima A., Nose Y. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 51, 241–246.
7. Wilchek M., Miron T. (1974) *Mol. Cell. Biochem.*, 4, 181–187.
8. Cuatrecasas P. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3059–3065.
9. Ullrich J. (1969) *Habitualisationsschrift*, Universität Freiburg.
10. Островский Ю. М., Ульрих И., Хольцер Х. (1971) *Биохимия*, 35, 3–11.
11. Ornstein L., Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 305–320.
12. Lowry R., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.

Поступила в редакцию
16.I.1980

После доработки
28.IV.1980

ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY. V. AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF PYRUVATE DECARBOXYLASE FROM BREWER'S YEAST

KLYASHCHITSKY B. A., POZDNEV V. F., MITINA V. Kh.,
VOSKOBOYEV A. I., CHERNIKEVICH I. P.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow; Division of Metabolic Regulation, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Grcdno

New biospecific adsorbents containing thiamine, thiamine pyrophosphate or imidazole as ligands and distinguished by various degree of hydrophobicity have been prepared. The pyruvate decarboxylase behaviour on these adsorbents has been studied with the aim of elucidating the contribution of non-specific and biospecific interaction to enzyme adsorption and to choose optimal conditions for chromatography. A method for isolation of electrophoretically homogeneous 310-fold pyruvate decarboxylase from brewer's yeast in 14% overall yield has been developed. It involves extraction by glycerol-EDTA solution, acetone and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ treatment, gel-filtration of Sephadex G-25, and affinity chromatography on thiamine pyrophosphate-4-azobenzoyl-ε-aminocaproyl-hydrozido-Sepharose.