



УДК 547.96

ПОЛУЧЕНИЕ НЕРАСТВОРИМОГО НОСИТЕЛЯ С АКТИВИРОВАННОЙ SH-ГРУППОЙ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ХИМИИ БЕЛКА

*Егоров Ц. А., Шахпаронов М. И., Давидович Ю. А.,
Лозинский В. И., Заславский Б. Ю., Рогожин С. В.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина
Академии наук СССР, Москва;*

*Институт элементоорганической химии
Академии наук СССР, Москва*

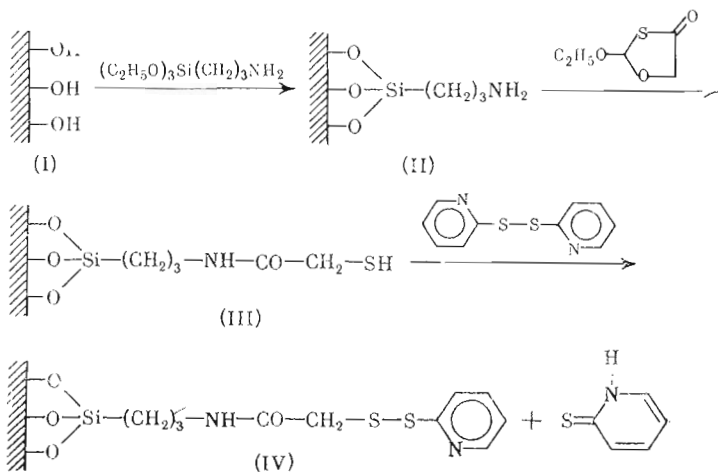
Предложен новый нерастворимый носитель для ковалентной хроматографии — активированный тиол-кремнезем, который может быть использован для выделения цистеинсодержащих фрагментов путем химического расщепления или ферментативного гидролиза иммобилизованных белков, а также для анализа последовательности аминокислот таких фрагментов с помощью твердофазного секвенсера.

Стратегия и тактика изучения первичной структуры белков в настоящее время достаточно хорошо разработаны. Однако разделение пептидных смесей, получаемых в результате различных способов фрагментации белков, все еще представляет собой трудную задачу, для решения которой требуется много времени и ручного труда. Особенно большие трудности возникают при расшифровке структуры больших белков, состоящих из 500—1000 аминокислотных остатков. Классические методы разделения пептидов, основанные на заряде, размере молекулы и т. д., оказываются малоэффективными при изучении таких белков.

В последнее время для выделения пептидов все большее применение находит аффинная и ковалентная хроматография. Из них последняя заслуживает наибольшего внимания благодаря своей простоте и высокой степени селективности [1]. Так, с помощью активированной тиол-сефарозы 4В был создан удобный метод выделения цистеинсодержащих пептидов, получаемых гидролизом иммобилизованного белка пепсином [2]. Недавно с помощью другого метода показана возможность выделения триптофансодержащих пептидов [3]. Однако большинство доступных носителей, получающихся на основе гидрофильных полисахаридных матриц (агароза, целлюлоза и др.), имеют ряд недостатков, к главным из которых относятся подверженность микробному заражению, малая химическая устойчивость, возможность использования ограниченного круга органических растворителей и т. п. Многих этих недостатков лишены носители на основе неорганических матриц из пористого стекла, двуокиси кремния, диатомита, керамики и т. п.

В настоящей работе описаны получение нерастворимого носителя на основе макропористого кремнезема с активированной SH-группой и предварительные результаты его использования в химии белка.

В качестве исходного материала использовали макропористый кремнезём марки «Силохром» (ВНИИ люминофоров, г. Ставрополь) со следующими характеристиками: диаметр пор 680—700 Å, рабочая поверхность 60,8 м²/г, внутренний объём 1,8 см³/г, размер зерна 0,4—0,5 мм. Синтез носителя осуществляли по следующей схеме:



Вначале к кремнезему (I) «пришивали» ножку, обрабатывая последний γ -аминопропилтриэтоксисиланом в кипящем толуоле [4]. Затем взаимодействием соединения (II) с избытком 1-оксо-2-этокси-3-тиолан-5-оном получали продукт (III) со свободной SH-группой на конце (длина ножки ~ 10 Å). Обрабатывая продукт (III) избытком 2,2-дипиридилдисульфида (Aldrich, США), растворенного в смеси диметилформамид — буфер (0,1 М Трис-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) в соотношении 1:1, получали конечный продукт — активированный тиол-кремнезем (IV), который тщательно промывали диметилформамидом, метанолом и высушивали. Для данной работы получали носитель с емкостью 40 мкмоль/г сухого препарата.

В качестве модельного белка мы выбрали β -цепь гемоглобина крупного рогатого скота известной структуры [5], которую также выделяли с помощью ковалентной хроматографии на полученном носителе.

Экспериментальная часть

Выделение β -цепи гемоглобина. Известно, что гемоглобин состоит из двух α - и двух β -субъединиц ($\alpha_2\beta_2$). В гемоглобине крупного рогатого скота только β -цепь содержит один остаток цистеина (α -цепь его не содержит). Обычно ~ 32 мг очищенного гемоглобина (компонент B) иммобилизовали на 0,5 г носителя при pH 8 (0,1 М Трис-HCl, 6 М гуанидингидрохлорид, 1 mM EDTA) во вращающемся флакончике под азотом при комнатной температуре в течение 2 ч.

Флакончик закрепляли на оси мотора таким образом, чтобы обеспечить эффективное перемещение носителя. По окончании иммобилизации носитель промывали несколькими объемами указанного буфера, водой, кислым ацетоном (0,1 мл конц. HCl на 100 мл ацетона) для удаления гема, метанолом, высушивали и хранили при 4° до использования.

Иммобилизованную β -цепь подвергали воздействию ферментов или химических агентов, в результате получали смесь фрагментов, переходящих в раствор, за исключением одного, который содержит остаток цистеина и связан с ножкой носителя S-S-связью (рис. 1). После отмывания фрагментов, не содержащих остатка цистеина (фракция I), тиолсодержащий фрагмент «снимали» с носителя после восстановления дисульфидной связи меркаптоэтанолом (фракция II).

Фракцию II обычно лиофилизировали и очищали от минорных примесей и продуктов реакции гель-хроматографией в присутствии меркаптоэтанола. Чистоту полученных фрагментов определяли по анализу N-концевых аминокислот [6]. β-Цепь гемоглобина крупного рогатого скота содержит 11 остатков лизина, 4 остатка аргинина и 3 остатка метионина (включая N-концевой), а также одну связь аспартил—пролин, которая достаточно легко расщепляется в кислой среде в мягких условиях [7]. Поэтому иммобилизованную β-цепь гидролизовали трипсином с предварительным блокированием остатков лизина, расщепляли бромцианом, а также расщепляли по связи аспартил—пролин (рис. 2) с последующим выделением в каждом случае тиолсодержащего фрагмента. Кроме того, иммобилизованную β-цепь подвергали деградации по Эдману на твердофазном секвенсере.

Расщепление иммобилизованной β-цепи (~100 нмоль) бромцианом осуществляли в затемненной термостатируемой колонке при 25° в атмосфере азота путем циркуляции раствора реагента (100-кратный избыток) в смеси 0,1 н. HCl и 6 М гуанидингидрохлорида. За ходом расщепления следили, измеряя поглощение раствора при 280 нм. Через 6 ч, когда поглощение практически перестало изменяться, что свидетельствовало о прекращении выделения фрагментов и соответственно об окончании расщепления, колонку промывали двумя объемами 10% уксусной кислоты. Уксуснокислую фракцию, содержащую смесь растворимых пептидов (фракция I), разбавляли водой и лиофилизировали.

Далее колонку промывали водой и раствором 6 М гуанидинхлорида в 0,1 М Трис-HCl-буфере (pH 8). Восстановление дисульфидной связи проводили путем циркуляции через колонку 0,1 М Трис-HCl-буфера, содержащего 20 ммоль меркаптоэтанола, в течение 30 мин. Затем колонку промывали одним объемом этого буфера, объединенные растворы лиофилизировали и наносили на колонку (1×90 см) с сефадексом G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), уравновешенную 10% уксусной кислотой.

Обнаружение фракций осуществляли с помощью проточного УФ-детектора модели LC-55 (Perkin-Elmer, США) при 254 нм. Анализ N-концевой аминокислоты цистеинсодержащего фрагмента показал наличие лизина и небольшие примеси глицина и аспарагиновой кислоты, что хорошо согласуется со специфичностью действия бромциана и структурой β-цепи.

Специфический гидролиз иммобилизованной β-цепи по остаткам аргинина. Около 100 нмоль иммобилизованной β-цепи предварительно обрабатывали 300-кратным избытком янтарного ангидрида. Для этого через колонку с иммобилизованным белком пропускали с помощью перистальтического насоса 1 М фосфатный буфер (pH 9,5) со скоростью ~300 мл/ч, добавляя порциями реагент в ячейку, снабженную магнитной мешалкой и комбина-

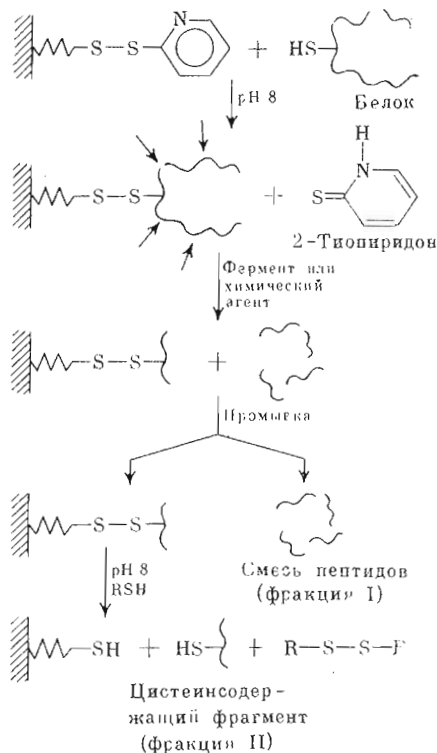


Рис. 1. Схема специфического выделения тиолсодержащих фрагментов путем фрагментации иммобилизованного белка на активированном тиол-кремнеземе (показан условно) ферментами или химическими агентами

следовательности по Эдману. Ранее было показано, что связь Si—O устойчива в условиях эдмановской деградации пептидов [8]. Потери составляют только ~0,1—0,2% на каждый цикл деградации. Для определения аминокислотной последовательности было взято ~80 нмоль иммобилизованной β-цепи. Анализ выполняли на автоматическом твердофазном секвенсере типа 4020 (ЛКВ, Швеция) в стандартном режиме. Фенилтиогидантоины аминокислот определяли на аминокислотном анализаторе модели D-500 (Durrum, США) после их превращения в свободные аминокислоты гидролизом иодистоводородной кислотой. Исходя из вышеуказанного количества β-цепи удалось четко идентифицировать 18 аминокислот.

Полученные результаты ясно показывают преимущества ковалентной хроматографии при выделении больших фрагментов и в конечном счете при определении первичной структуры белков. Таким образом, в дополнение к существующим методам присоединения пептидов к нерастворимым носителям по остаткам лизина, гомосерина (после превращения в гомосеринлактон) и аргинина (после превращения в орнитин [9]) предложен еще один метод для цистеинсодержащих пептидов и белков, которые могут быть иммобилизованы в концентрированных растворах гуанидинхлорида или мочевины.

Описанный подход успешно применяется нами при изучении первичной структуры ряда белков.

Авторы выражают благодарность Ю. А. Овчинникову за критические замечания и поддержку этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brocklehurst K., Carlsson J., Kierston M. P. J., Crook E. M. (1973) *Biochem. J.*, **133**, 573—584.
2. Egorov Ts. A., Svenson A., Ryden L., Carlsson J. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3029—3033.
3. Rubinstein M., Shechter Y., Patchornik A. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1257—1263.
4. Weetall H. H. (1969) *Nature*, **223**, 959—960.
5. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Robertson B., Rabin D. R. (1967) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **120**, 124—135.
6. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 59P.
7. Piszkiwicz D., London M., Smyth E. L. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1173—1178.
8. Wachter E., Hofner H., Machledit W. (1975) in *Solid-phase methods in protein sequence analysis* (Laursen R. A., ed.), pp. 3—9.
9. Laursen R. A. (1975) in *Solid-phase methods in protein sequence analysis* (Laursen R. A., ed.), pp. 34—46.

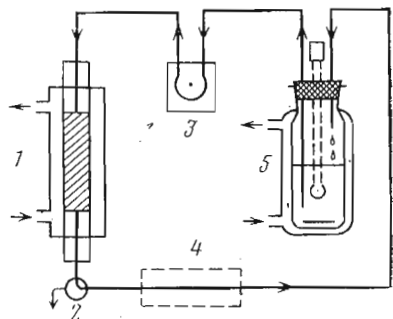


Рис. 3. Реакционная колонка с иммобилизованным белком: 1 — реакционная колонка с рубашкой, 2 — двухходовой кран, 3 — перистальтический насос, 4 — УФ-монитор, 5 — ячейка с рубашкой, магнитной мешалкой и электродом

Поступила в редакцию
29.III.1977

THE PREPARATION OF INSOLUBLE SUPPORT WITH ACTIVATED SH-GROUPS AND ITS USE IN PROTEIN CHEMISTRY

EGOROV Ts. A., SHAKHPARONOV M. I., DAVIDOVITCH Yu. A.,
LOSINSKY V. I., ZASLAVSKY B. Yu., ROGOZHIN S. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Biorganic Chemistry; Institute of
Organo-Element compounds, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The support bearing activated SH-groups has been obtained from the macroporous silica of 680-700 Å pore size diameter. It can be used for reversible immobilization of proteins and peptides by thiol-disulfide exchange. As an illustration, β-chain of bovine hemoglobin was immobilized and subjected to cyanogen bromide cleavage, as well as to trypsin hydrolysis at arginine residues and splitting at the Asp-Pro bond, followed by the isolation of corresponding cysteine-containing fragments.

The activated thiol-silica may find an application as a support for solid-phase sequence analysis of cysteine-containing peptides and proteins.
