

УДК 577.151

БИОХИМИЯ

З. С. Мкртчян, М. Г. Газарянц, Л. С. Нерсесова,
Ж. И. Акопян, Г. А. Невинский

Получение высокоочищенных препаратов креатинкиназы
из мышц кролика с помощью аффинной хроматографии

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. А. Галояном 8/IV 1981)

Креатинкиназа (АТР : креатин-фосфотрансфераза; КФ 2.7.3.2) осуществляет обратимый перенос фосфорильной группы с Mg^{2+} АТР на креатин. Препараты фермента, получаемые с помощью классических методов, например, метода Кьюби (¹) в модификации Четвериковой (²), обычно представляют собой белки 85—90%-ной чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Однако для исследования каталитических и физико-химических свойств фермента и его отдельных субъединиц требуются еще более чистые препараты креатинкиназы (^{3,4}). В настоящей работе описано получение гомогенных препаратов фермента на сефарозе с иммобилизованным голубым декстраном.

В работе использованы: креатинфосфат, АТР, АДР фирмы «Reanal» (ВНР), креатин фирмы «Chemapol» (ЧССР), кумасси (бриллиантовый голубой) фирмы «Sigma» (США). Остальные реагенты были аналитически чистыми.

Активность креатинкиназы в прямой реакции определяли потенциометрически. Измерения проводили в термостатированной кювете при 30°C при непрерывном перемешивании. Реакционная смесь объемом 1,5 мл содержала: $4 \cdot 10^{-2}M$ креатина, $4 \cdot 10^{-3}M$ АТР, $5 \cdot 10^{-3}M$ ацетата магния, $1 \cdot 10^{-3}M$ дитиотрейтола, $1 \cdot 10^{-4}M$ ЭДТА, 0,1 M ацетата натрия. Реакцию запускали добавлением 1 мкг фермента. О начальной скорости судили по расходу 0,01 н NaOH за первые 3 мин, поддерживая pH раствора равным 9. Белок определяли по методу Лоури. За единицу активности фермента принимали количество мкэкв ионов водорода, образовавшихся за одну минуту на мг белка.

Активность фермента в обратной реакции определяли колориметрическим методом (⁵). Реакционная смесь объемом 0,16 мл содержала $1,3 \cdot 10^{-3}M$ АДР, $7,5 \cdot 10^{-3}M$ креатинфосфата, $3,8 \cdot 10^{-3}M$ ацетата

магния в 0,1 М трис-ацетатном буфере, рН 7,5. Реакцию запускали добавлением креатинфосфата. После 2 мин инкубации при 30°C реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 1%-ного щелочного раствора α -нафтола и 0,1 мл 2,5% диацетила. Полученный раствор разбавляли 2 мл воды и определяли количество образовавшегося креатина колориметрически при длине волны 520 нм. За единицу активности принимали количество мкмоль креатина, образовавшегося за 1 мин на мг белка.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводили согласно (6). Время электрофореза 4—5 ч, на трубку наносили 20—30 мкг белка, использовали 7,5%-ный гель. Гели окрашивали в 0,25%-ном растворе кумасси, после отмывки гели сканировали с помощью денситометра Scan—400 (Joyce, Loble, Англия).

Для очистки фермента использовали сефарозу с иммобилизованным голубым декстраном (2 мг декстрана на 1 мл смолы).

На первом этапе очистку препарата креатинкиназы проводили по методу Кьюби (1) в модификации Четвериковой с сотр. (2). Процедура очистки состояла из нескольких стадий: разрушения икроножных мышц кролика, экстрагирования белкового материала 0,01 М КСl, последовательного фракционирования хлористым аммонием и этанолом. В таблице приведены результаты типичной очистки фермента.

Белковый препарат, полученный после повторного фракционирования этанолом, далее очищали на сефарозе с иммобилизованным голубым декстраном (по аналогии с очисткой креатинкиназы из тканей рыб на сефарозе с иммобилизованным цибакроном—С (7)). Для этого 5—20 мг фермента растворяли в 50—100 мл 0,02 М К-фосфатного буфера, рН 5,7, содержащего $1,5 \cdot 10^{-3}$ М MgCl_2 , $1 \cdot 10^{-4}$ М ЭДТА и $1 \cdot 10^{-5}$ М дитиотрейтола. Раствор фермента наносили на колонку с сефарозой (1×25 см), предварительно уравновешенную тем же буфером. Скорость нанесения и последующей элюции—12 мл/ч. Хроматографию проводили при 4°C. Колонку промывали указанным буфером до полного исчезновения поглощения элюата при 280 нм. Специфическую элюцию креатинкиназы со смолы проводили 0,05 М К-фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим те же компоненты, что и указанный выше буфер. Для анализа плотности элюата использовали микроспектрофотометр «Обь» отечественного производства. Выход гомогенного белка на этом этапе составлял 50—80%. Активность исходного препарата креатинкиназы до хроматографирования на аф-

финном сорбенте составляла 100—120 единиц $\left(\frac{\text{мкэкв Н}^+}{\text{мг/мин}} \right)$, а после хроматографирования возрастала до 200—400 единиц. Полученный препарат фермента хранили в лиофилизованном виде.

Из таблицы видно, что достигнута 16-кратная очистка фермента с достаточно высоким выходом общей активности—36%. На рис. 1 приведены данные хроматографической очистки креатинкиназы на аффинном сорбенте. Видно, что при нанесении фермента и последующей промывке элюируется часть наносимого белка. Специфическая

элюция креатинкиназы со смолы достигается при использовании буфера pH 8,0. Небольшое количество белкового материала элюируется при промывке колонки этим же буфером, содержащим 1 н NaCl. Однако этот белок (пик 3) не обладает киназной активностью.

Данные типичной очистки креатинкиназы скелетных мышц кролика

Фракция	Объем, мл	Концентра- ция фермен- та, ед/мл	Общее чис- ло единиц	Концентра- ция белка, мг/мл	Удельная активность, мкмоль мг мин	Выход, %	Степень очистки
Исходный экстракт	300	188	56400	11.9	15.1	100	1
Фракционирование NH ₄ Cl и этанолом	600	78	46800	2.2	35.7	81	2.36
Повторное фракционирование этанолом	7.6	4710	36000	39.2	115	65	7.6
Хроматографирование на сефаро- зе с иммобилизованным голубым декстраном	8.1	2520	20400	11	250	31.6	16

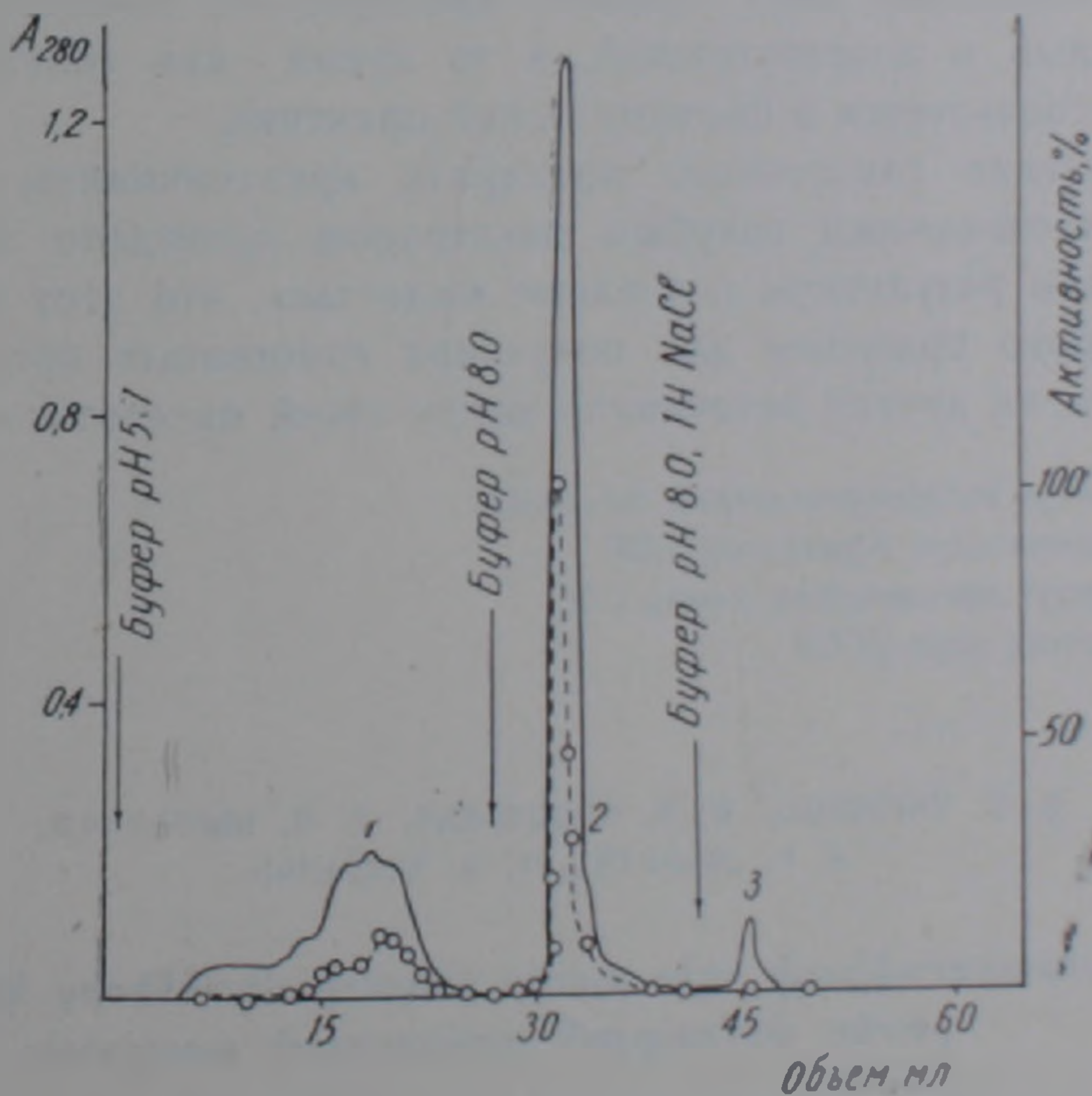


Рис. 1. Хроматографическое разделение креатинкиназы на сефарозе с иммобилизованным голубым декстраном. 9 мг белка в 50 мл К-фосфатного буфера, pH 5,7, нанесено на колонку с сефарозой. A₂₈₀ (—); относительная активность фермента в реакции образования креатинфосфата из креатина и АТФ при pH 9,0 (—o—).

Полученный препарат фермента гомогенен по данным электрофореза в условиях сохранения нативной структуры (рис. 2). Таким

образом, использование аффинного сорбента позволило получить нам препараты креатинкиназы с более высокой степенью очистки, чем в случае использования метода Кьюби ⁽¹⁾ в модификации Четвериковой с сотр. ⁽²⁾. Как было указано выше, изоферменты креатинкиназы

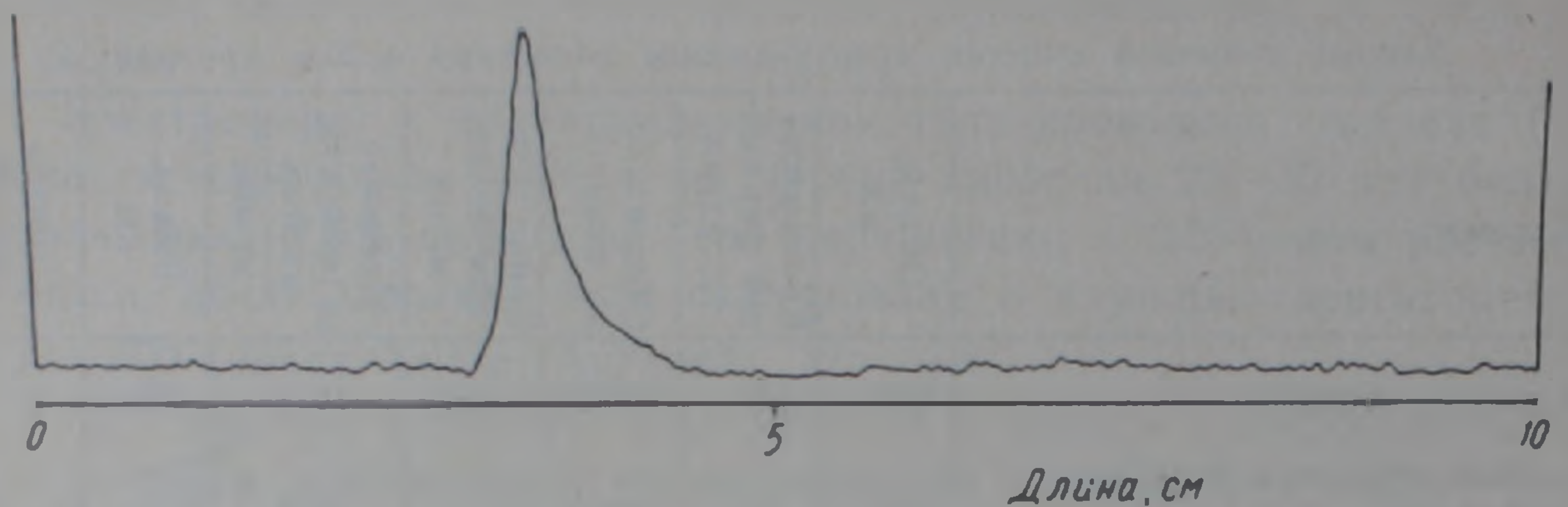


Рис. 2. Денситограмма геля после электрофореза препарата креатинкиназы, очищенного на сефарозе с иммобилизованным голубым декстраном (препарат соответствует пику 2 рис. 1)

из тканей рыб были очищены на сефарозе с иммобилизованным цибакроном—С ⁽⁷⁾. Этот сорбент, по-видимому, по свойствам близок к использованному нами. Однако цибакрон—С малодоступен, синтез его сложный и дорогостоящий, в то время как голубой декстран широко используется в биохимической практике.

Получение гомогенного препарата креатинкиназы на сефарозе с иммобилизованным голубым декстраном проведено нами впервые. Полученные результаты позволяют надеяться, что этот подход может быть широко применен для получения гомогенных препаратов креатинкиназы из других источников ввиду своей простоты и доступности.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР
Институт органической химии СО
Академии наук СССР

Զ. Ս. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Մ. Գ. ՂԱԶԱՐՅԱՆՅ, Լ. Ս. ՆԵՐՍԵՍՈՎԱ,
Ժ. Ի. ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Գ. Ա. ՆԵՎԻՆՍԿԻ

Աֆին հոմատոգրաֆիայի օգնությամբ ճազարի մկաններից կրեատինկինազի
բարձր մաքրության պրեպարատի ստացումը

Նկարագրված է ճազարի մկաններից կրեատինկինազի հոմոգեն պրեպարատի ստացման մեթոդը երկնագույն դեքստրանով իմմոբիլիզացված սեֆարոզի վրա:

Ստացված ֆերմենտի պրեպարատը հոմոգեն է ըստ էլեկտրոֆորեզի տվյալների՝ նաեւ կառուցվածքի պահպանման պայմաններում:

Ստացված տվյալները թույլ են տալիս հուսալու, որ նկարագրված մեթոդը իր պարզությամբ և հասանելիությամբ մեծ կիրառում կստանա ուրիշ աղբյուրներից կրեատինկինազի հոմոգեն պրեպարատներ ստանալու:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ S. A. Kuby, L. Noda, H. A. Lardy, J. Biol. Chem., vol. 209, 203—211 (1954).
² Е. П. Четверикова, А. В. Крикская, Н. А. Розанова и др., Биохимия, т. 35, 953—956 (1970). ³ З. С. Мкртчян, Л. С. Нерсесова, Ж. И. Акопян и др., Биохимия, т. 45, 808—809 (1980). ⁴ Ж. И. Акопян, М. Г. Газарянц, З. С. Мкртчян и др., Биохимия, т. 46, 262—267 (1981). ⁵ A. H. Ennor, H. Rozenberg, Biochem. J., vol. 51, 606—616 (1952). ⁶ K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., vol. 244, 4406—4412 (1969).
⁷ H. J. Fisher, G. Whitt, Analyt. Biochemistry, vol. 94, 89—95 (1979). ⁸ H. J. Keutel, K. Okabe, H. K. Jacobs a. o., Archives Biochem. Biophys., vol. 150, 648—678 (1972).