

Isolement de l' α_1 -cristalline purifiée du cristallin de boeuf

L'isolement de fractions homogènes des protéines constitutives du cristallin représente la première étape de l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et de leur état dynamique. MÖRNER¹ avait déjà montré en 1894 qu'à un pH voisin de 7, le cristallin ne se dissolvait pas totalement dans l'eau. La partie insoluble, appelée albumoïde, n'est pas constituée d'une seule protéine, mais de plusieurs, dont certaines ont été récemment isolées². Dans la partie soluble, il avait distingué trois protéines: l' α cristalline, la β cristalline, appartenant aux globulines et une albumine. Ces fractions, ont été retrouvées par KRAUSE³, par WOODS ET BURKY⁴ et par NORDMANN⁵. La méthode d'isolement de ces fractions, la plus souvent utilisée, est celle de KRAUSE. Elle ne donne malheureusement pas de produits homogènes, comme on le voit sur un diagramme d'ultracentrifugation (Fig. 1) correspondant à l' α cristalline préparée selon KRAUSE. Le présent travail donne une méthode qui permet d'obtenir l'une des fractions protéiques appelée α_1 cristalline, sous une forme apparemment homogène.

Des cristallins de boeuf, prélevés aux abattoirs, lavés à l'eau salée à 0.9 %, sont congelés dans l'air liquide et broyés. Toutes les manipulations sont alors effectuées à 0°. La poudre obtenue est agitée avec une solution de PO_4HNa_2 0.1 M à raison de 300 ml par 100 g de tissus, pendant 24 heures. On centrifuge à 30 000 t/min à 0°, dans l'appareil Spinco, pendant 1 heure. Dans la solution riche en protéines que l'on décante, on a 10 mg N total/ml. Le rapport S/N est 0.02. On ajoute à cette solution du sulfate d'ammonium jusqu'à 42 % de la saturation. Le précipité qui se forme est redissous par dialyse contre de l'acétate de soude 0.1 M. On poursuit jusqu'à élimination des ions SO_4^{2-} . On reprécipite la solution obtenue par le sulfate d'ammonium jusqu'à atteindre 32 % de la saturation. Le précipité qui apparaît est rejeté. On augmente la concentration en sulfate d'ammonium des eaux-mères jusqu'à 42 %; des protéines précipitent à nouveau.

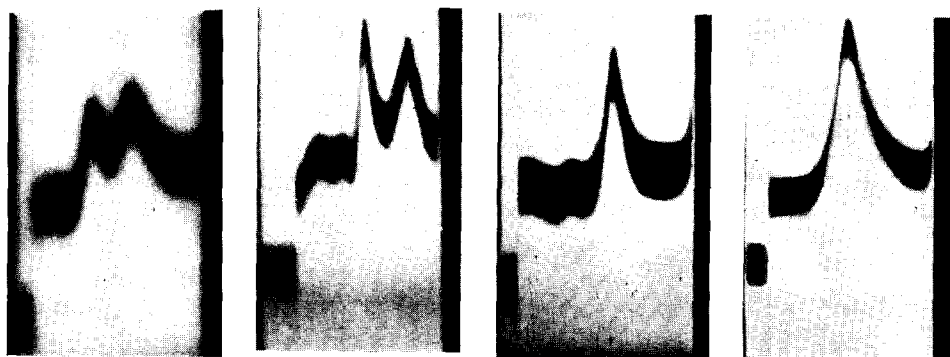


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 1. Temps 48 min; 2 mg N/ml; pH 8.2; tampon acétate 0.1 M.

Fig. 2. Temps 48 min; 8.34 mg N/ml; pH 7.75; tampon acétate 0.1 M.

Fig. 3. Temps 32 min; 3.2 mg N/ml; pH 7.2; tampon acétate 0.1 M.

Fig. 4. Temps 48 min; 4.7 mg N/ml; pH 6.88; tampon acétate 0.1 M.

On dissous par dialyse contre de l'acétate de Na 0.1 M. Cette fraction (A) qui se révèle constituée, à l'ultracentrifugation, de deux protéines principales et de deux autres dont la concentration est plus faible (Fig. 2), est très analogue à celle préparée par SZENT-GYÖRGYI⁶. On précipite la solution obtenue (A) à pH 7.75 (8.3 mg N/ml) par du sulfate de magnésium à saturation. 50 % de l'azote total, précipitent. A la partie insoluble, recueillie et dissoute par dialyse contre de l'acétate de sodium, correspond le diagramme d'ultracentrifugation de la Fig. 3. On voit qu'une purification a eu lieu (solution B). Cette dernière solution est alors additionnée d'acide perfluorooctanoïque. Ce réactif déjà employé par MURRAY, LUCK⁷ comme précipitant des protéines, n'insolubilise aucun des constituants de la solution B aux pH supérieurs à 7, à la concentration: $2.3 \cdot 10^{-3}$ M. Aux pH inférieurs à 7, en tampon acétate/acide acétique 0.1 M, une précipitation apparaît, qui est presque totale à pH: 5.22.

Si donc on mélange à 0°, 100 ml de la solution B, renfermant 500 mg d'N total avec 100 ml de solution à 2 % de perfluoro-octanoate de sodium et 200 ml de tampon acétate 0.1 M de pH 5.3, on obtient un précipité, qui après dialyse contre du phosphate disodique 0.1 M et électrodialyse en présence de Dowex-50 forme H, donne une solution claire, fluorescente, qui renferme 82 %

de l'azote total, présent dans la solution B. Cette solution, soumise à l'ultracentrifugation (Spinco 220 000 g) dans les conditions suivantes, ne donne qu'un seul pic de sédimentation (Fig. 4).

| Concentration N total | pH | Tampon | S_{16} |
|-----------------------|------|------------------|----------|
| 2.35 mg N/ml | 7.63 | Phosphate 0.05 M | 7.16 |
| 4.7 mg N/ml | 6.88 | Acétate 0.1 M | 8.85 |
| 2.35 mg N/ml | 8.25 | Phosphate 0.25 M | 13.3 |

De plus, la protéine ainsi préparée présente une courbe de précipitation par le sulfate d'ammonium qui est linéaire, en coordonnées semi-logarithmiques (Fig. 5). Le pH de solubilité minimum en présence d'un tampon acétate 0.1 M, est de 5.16. La protéine ainsi isolée, que nous proposons d'appeler α_1 cristalline, possède la composition suivante: C = 53 % \pm 1; N = 14.5 % \pm 0.2; S = 0.5 % \pm 0.05. En solution dans la soude N/10, le spectre de l' α_1 cristalline présente un

maximum à 280 m μ et un second à 286 m μ . En milieu HCl N/10, il n'y a qu'un maximum à 275 m μ . De la valeur de l'absorption à 280 m μ et à 294 m μ on peut calculer, selon BEAVEN ET HOLIDAY⁸, qu'il y a un rapport Tyrosine/Tryptophane égal à 1.

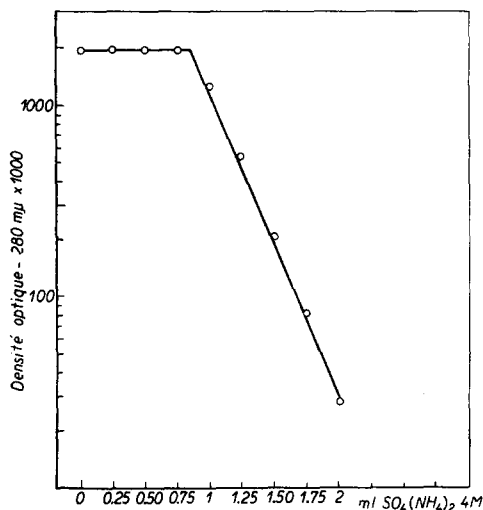


Fig. 5. Relargage de l' α_1 cristalline par le sulfate d'ammonium 4 M. Volume total 10 ml; 0.24 mg N total par ml; temp. 0°.

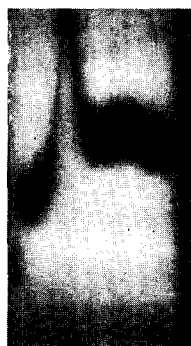


Fig. 6. Temps 48 min; 5.92 mg N/ml; pH 8; tampon acétate 0.1 M.

Il est important, au cours de la préparation de l' α_1 cristalline de ne pas laisser vieillir la solution B, d'une part, et de ne pas mettre en contact le précipité obtenu par l'acide perfluorooctanoïque, avec une solution d'un pH supérieur à celui du phosphate disodique 0.1 M. Même dans ces conditions, il est avantageux d'éliminer l'excès d'acide perfluorooctanoïque par électrodialyse. Si ces données ne sont pas observées on assiste à une dénaturation partielle de la protéine, et à l'apparition, sur le diagramme d'ultracentrifugation, d'un pic correspondant à une molécule plus lourde (Fig. 6).

Service de Biologie du Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay (France)

P. FROMAGEOT
J. SIRCHIS
L. PETIT
M. PRIoux

¹ C. T. MÖRNER, *Z. physiol. Chem.*, 18 (1894) 214.

² P. FROMAGEOT ET J. SIRCHIS, *Compt. rend.*, 240 (1955) 1730.

³ A. C. KRAUSE, *Arch. Ophthalm. Chicago*, 8 (1932) 166.

⁴ A. C. WOODS ET E. L. BURKY, *Am. J. Ophthalmol.*, 16 (1933) 951.

⁵ A. BONOT ET J. NORDMANN, *Bull. soc. chim. biol.*, 38 (1946) 850.

⁶ A. SZENT-GYÖRGYI, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 167.

⁷ J. MURRAY LUCK, A. C. GRIFFIN, G. BOER ET M. WILSON, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 767.

⁸ G. H. BEAVEN ET E. R. HOLIDAY, *Advances in Protein Chem.*, 7 (1952) 319.

Reçu le 27 octobre 1955