

Purification du chymotrypsinogène-B du boeuf

Le chymotrypsinogène-B (ChTg-B), dont les proportions dans le suc pancréatique de boeuf sont égales¹ à celles du chymotrypsinogène-A de NORTHROP ET KUNITZ², a été cristallisé depuis plusieurs années³⁻⁵. De nombreux travaux, encouragés par l'apparente homogénéité électrophorétique du produit cristallisé⁶, ont été consacrés à l'étude de ses propriétés physicochimiques^{5,6}, de son activation⁷ et de sa structure⁸⁻¹⁰. Les études de structure ayant toutefois montré que le produit n'était pas homogène, même après une purification ultérieure, nous avons cherché à mettre au point une technique satisfaisante pour la préparation d'un précurseur dont l'intérêt est évident.

Notre procédé de purification est basé sur le fait que ChTg-B, protéine acide de point isoélectrique 5.2, peut être séparé des principaux composés qui l'accompagnent (ChTg-A et trypsinogène), grâce à une solubilité moindre dans le sulfate d'ammonium à 0.4 de saturation (SO_4Am_2) et une élution plus aisée au cours d'une chromatographie par échange de cations. Toutes les opérations doivent être effectuées à froid et à un pH légèrement acide, sous peine de modifier la structure du précurseur et d'abaisser son activité potentielle. Les principales étapes de la purification ont été contrôlées en mesurant individuellement, après activation trypsique à 0°, les activités chymotrypsiques A et B, au moyen de l'acetyl-L-tyrosine éthylester et de l'acetyl-L-tryptophane éthylester¹. Les activités spécifiques ont été déterminées à l'aide de l'acetyl-L-tyrosine éthylester, après activation à 35° (ref. 11).

2 kg de pancréas de boeuf sont extraits par SO_4H_2 0.25 N selon la méthode classique décrite par KUNITZ pour ChTg-A². L'extrait limpide (rapport ChTg-B/ChTg-A, 0.43; teneur en protéines totales, 1.0-1.5 %) est précipité à 0° par addition de SO_4Am_2 saturé jusqu'à une concentration de 0.8 satn. Le précipité est dissous dans HCl 10⁻³ M (teneur en protéines, 2.0 %). Le nouveau précipité obtenu à 0° entre 0.0 et 0.4 satn. est dissous dans HCl 10⁻³ M, dialysé contre cet acide et lyophilisé (rapport ChTg-B/ChTg-A, 1.4; rendement en ChTg-B, 84 %).

Le produit lyophilisé (0.6 g), dissous dans du citrate 0.05 M, pH 4.2 (20 ml), est chromatographié dans une colonne de carboxyméthylcellulose équilibrée avec ce tampon (Fig. 1, diagramme de gauche). Après la sortie d'un petit pic inactif, ChTg-B est élut par du citrate 0.05 M, pH 4.6 en un pic presque symétrique mais hétérogène. On dialyse et lyophilise la ou les fractions dont l'activité est 2.5-2.6. On chromatographie à nouveau les autres fractions dans les mêmes conditions (Fig. 1, diagramme de droite). Les fractions d'activité 2.5-2.6 sont réunies aux précédentes, après dialyse et lyophilisation. Celles dont l'activité est inférieure, sont définitivement rejetées. Rendement global en ChTg-B, 38 %; taux de purification, 7.

Afin d'évaluer l'homogénéité du produit d'activité 2.5-2.6, un échantillon est soumis à une chromatographie d'équilibre sur DEAE-cellulose à pH 8.0 (Fig. 2). Bien que la dialyse prolongée à laquelle il est indispensable de procéder* avant chromatographie fasse tomber l'activité à 2.2, même en présence de diisopropylfluorophosphate 0.7 · 10⁻⁴ M, le diagramme de la Fig. 2 révèle une homogénéité satisfaisante. En utilisant des phosphates de molarités différentes, le pic de ChTg-B est déplacé dans un sens ou dans l'autre. Mais il reste toujours à peu près homogène.

Abbréviation: ChTg, chymotrypsinogène; SO_4Am_2 , sulfate d'ammonium; DEAE-, diethylaminoethyl.

* Quand la solution de ChTg-B est complètement amenée à pH 8.0 avec de la soude, l'augmentation de force ionique est suffisante pour empêcher l'adsorption de la protéine sur DEAE-cellulose.

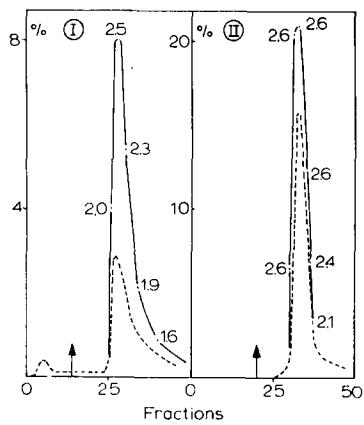


Fig. 1. Chromatographie du chymotrypsinogène-B sur carboxyméthylcellulose. Le tampon d'équilibrage (citrate 0.05 M pH 4.2) est remplacé par du citrate 0.05 M pH 4.6 au moment indiqué par la flèche. En trait plein: courbe de l'activité potentielle chymotrypsique en %. En pointillé, courbe des protéines en %. Colonne 3.0 × 9.0 cm. Débit, 60 ml. Volume des fractions, 10 ml. Temp., 5°. A gauche, précipité 0.0-0.4 satn. (voir le texte). A droite, nouvelle chromatographie des fractions dont l'activité est inférieure à 2.5 dans le diagramme de gauche.

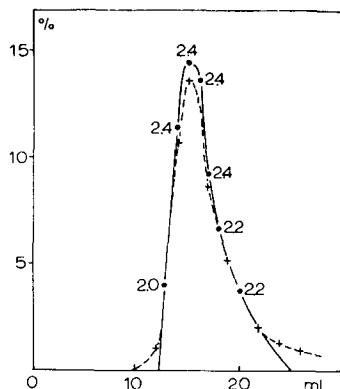


Fig. 2. Chromatographie d'équilibre du chymotrypsinogène-B sur DEAE-cellulose. Colonne (0.9 × 15 cm) de DEAE-cellulose équilibrée avec du phosphate 0.05 M pH 8.0, 0.7 10⁻⁴ M en diisopropylfluorophosphate. Solution (1.3 ml) de ChTg-B (20 mg). Activité spécifique initiale, 2.5-2.6; après une dialyse de 24 h à pH 8.0, 2.2. Elution avec le tampon d'équilibrage. Les conventions d'écriture et de dessin sont celles de la Fig. 1.

Le ChTg-B ainsi préparé est totalement inactif. Il possède, comme le ChTg-A¹², 1 résidu N-terminal de 1/2 cystine par mole. Aucun autre résidu N-terminal ne peut y être décelé, ce qui est un signe supplémentaire d'homogénéité. L'étude de sa séquence C-terminale et de sa composition en amino acides est en cours.

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,
Marseille (France)*

M. ROVERY
O. GUY
P. DESNUELLE

- ¹ P. J. KELLER, E. COHEN ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 344.
- ² J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, 2 ed., Columbia University Press, New York, 1948.
- ³ M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 166 (1946) 555.
- ⁴ C. K. KEITH, A. KAZENKO ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 170 (1947) 227.
- ⁵ E. L. SMITH, D. M. BROWN ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 639.
- ⁶ V. KUBACKI, K. D. BROWN ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 73.
- ⁷ K. D. BROWN, R. E. SHUPE ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 99.
- ⁸ B. KASSEL, *Federation Proc.*, 18 (1959) 257.
- ⁹ B. KASSEL ET M. LASKOWSKI, *Federation Proc.*, 19 (1960) 332.
- ¹⁰ J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 911.
- ¹¹ C. H. W. HIRS, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 93.
- ¹² F. R. BETTELHEIM, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 235.

Reçu le 11 juillet 1960