

### Purification du chymotrypsinogène-B du boeuf

Le chymotrypsinogène-B (ChTg-B), dont les proportions dans le suc pancréatique de boeuf sont égales<sup>1</sup> à celles du chymotrypsinogène-A de NORTHROP ET KUNITZ<sup>2</sup>, a été cristallisé depuis plusieurs années<sup>3-5</sup>. De nombreux travaux, encouragés par l'apparente homogénéité électrophorétique du produit cristallisé<sup>6</sup>, ont été consacrés à l'étude de ses propriétés physicochimiques<sup>5,6</sup>, de son activation<sup>7</sup> et de sa structure<sup>8-10</sup>. 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 ( $\text{SO}_4\text{Am}_2$ ) 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 tryptique à 0°, les activités chymotrypsiques A et B, au moyen de l'acétyl-L-tyrosine éthylester et de l'acétyl-L-tryptophane éthylester<sup>1</sup>. Les activités spécifiques ont été déterminées à l'aide de l'acétyl-L-tyrosine éthylester, après activation à 35° (ref. 11).

2 kg de pancréas de boeuf sont extraits par  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0.25 *N* selon la méthode classique décrite par KUNITZ pour ChTg-A<sup>2</sup>. 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  $\text{SO}_4\text{Am}_2$  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 élué 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  $0.7 \cdot 10^{-4}$  *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;  $\text{SO}_4\text{Am}_2$ , sulfate d'ammonium; DEAE-, diéthyl-aminoéthyl.

\* Quand la solution de ChTg-B est simplement 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.

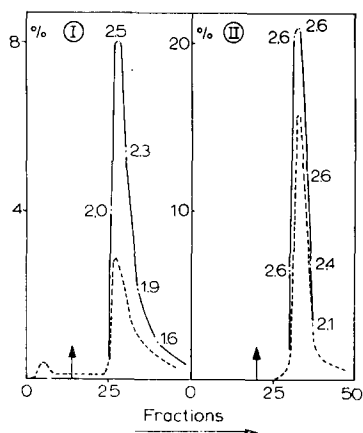


Fig. 1. Chromatographie du chymotrypsinogène-B sur carboxyméthylcellulose. Le tampon d'équilibration (citrate 0.05 *M* pH 4.2) est remplacé par du citrate 0.05 *M* pH 4.6 au moment indiqué par la flèche. En trait plein: courbe de l'activité potentielle chymotrypsique en %. En pointillé, courbe des protéines 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.

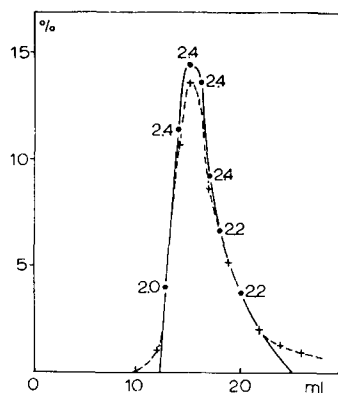


Fig. 2. Chromatographie d'équilibre du chymotrypsinogène-B sur DEAE-cellulose. Colonne (0.9 × 15 cm) de DEAE-cellulose équilibrée avec du phosphate 0.05 *M* pH 8.0, 0.7 10<sup>-4</sup> *M* en diisopropylfluorophosphate. Solution (1.3 ml) de ChTg-B (20 mg). Activité spécifique initiale, 2.5–2.6; après une dialyse de 24 h à pH 8.0, 2.2. Elution avec le tampon d'équilibration. 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-A<sup>12</sup>, 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

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

Reçu le 11 juillet 1960