

CHROM. 8933

Note

Chromatographie d'affinité de l'anhydrase carbonique végétale

F. CHAMPAGNOL

Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches Viticoles, Centre de Recherches Agronomiques, 34-Montpellier (France)

(Reçu le 19 novembre 1975)

Trois techniques de chromatographie d'affinité de l'anhydrase carbonique ont déjà été proposées¹⁻³. Elles mettent en jeu la liaison par covalence d'un inhibiteur de cet enzyme: *p*-aminobenzène sulfonamide (sulfanilamide)¹ ou *p*-aminométhyl benzène sulfonamide (sulfamylon)² ou encore *p*-(2,4-diaminophényl)azo benzène sulfonamide (Prontosil)³, avec un support macromoléculaire. Cependant les inhibiteurs cités sont sans effet sur l'anhydrase carbonique d'origine végétale. Le présent texte rend compte de la possibilité d'isolement de cet enzyme en utilisant un dérivé d'une sulfonamide hétérocyclique: 2-acétyl-amino-1,3,4-thiadazole-5-sulfonamide ou Diamox, inhibiteur de l'anhydrase carbonique animale⁴ et végétale⁵.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention de l'inhibiteur

Le 2-amino-1,3,4-thiadiazole-5-sulfonamide est obtenu à partir du 2-acétyl-amino-1,3,4-thiadiazole-5-sulfonamide connu sous le nom commercial de "Diamox". L'hydrolyse de la liaison amide peut être obtenue par l'éthanol chlorhydrique⁶ ou, avec un meilleur rendement, par un volume minimum d'acide chlorhydrique-eau (1:4) à chaud, jusqu'à dissolution⁷. La neutralisation par une lessive de soude amène la cristallisation du nouveau produit. Plus récemment celui-ci nous a été offert gracieusement par les laboratoires Théraplix.

Couplage avec polymère support

Le polymère (agarose) est "activé" par CNBr⁷. On peut aussi avoir recours à un produit commercial déjà activé.

Trois types de couplages ont été réalisés (Fig. 1):

(A), L'inhibiteur est fixé directement au polymère⁸.

(B), L'acide 6-amino-hexanoïque est fixé sur le polymère. L'inhibiteur est ensuite lié à la fonction acide en utilisant un carbodiimide soluble: le 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl) carbodiimide⁹.

(C), Élaboré comme le précédent mais avec l'acide 11-amino-undécanoïque.

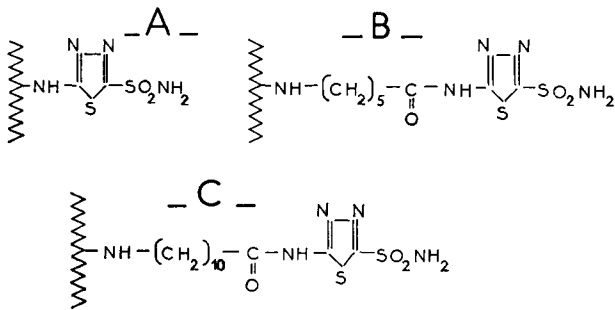


Fig. 1. Différents adsorbants réalisés avec l'agarose et l'inhibiteur de l'anhydrase carbonique.

Préparation de l'échantillon végétal

Un lot de 30 g de poudre végétale sèche obtenue par broyage après lyophilisation est extrait 3 fois par un tampon Tris 0.01 M (pH 9.2) additionné de SO_3Na_2 0.01 M au moment de l'emploi pour limiter l'activité de la polyphénoloxydase. Cet extrait subit d'abord un tamisage moléculaire grâce à un passage au travers d'une colonne de polydextrane (Sephadex G-75).

Fixation et élution de l'anhydrase carbonique

L'extrait partiellement purifié, ajusté à pH 7.5 est percolé au travers d'une colonne contenant 5 g de "Sephacrose-Diamox". L'anhydrase carbonique est retenue par le produit C. Elle n'est pas retenue par les produits A et B. Ce résultat ressemble à celui obtenu par Cuatrecasas¹⁰ avec la β -galactosidase.

L'enzyme est éluee par l'iodure de sodium 0.1 M dans du Tris 0.1 M (pH 7.5)¹. L'iodure peut être séparé de l'enzyme par chromatographie d'exclusion diffusion sur gel ou par ultrafiltration. Après rinçage avec du Tris (pH 7.5) la colonne est prête pour une nouvelle séparation.

REMERCIEMENT

Nous remercions chaleureusement M. Cieпка, Directeur Scientifique des laboratoires Theraplix pour le dérivé de Diamox qu'il a bien voulu nous faire parvenir.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 S. O. Falbring, P. O. Göthe, P. O. Nyman, L. Sundberg et J. Porath, *FEBS Lett.*, 24 (1972) 229.
- 2 P. L. Whitney, *Anal. Biochem.*, 57 (1974) 467.
- 3 W. R. A. Osborne et R. E. Tashian, *Anal. Biochem.*, 64 (1975) 297.
- 4 W. M. Miller, A. M. Dessert et R. O. Roblin, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4893.
- 5 R. G. Everson, *Phytochemistry*, 9 (1970) 25.
- 6 R. O. Roblin et J. W. Clapp, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4890.
- 7 H. J. Backer et J. A. Keveling Buisman, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 63 (1944) 228.
- 8 R. Axen, J. Porath et S. Ernback, *Nature (London)*, 214 (1967) 1302.
- 9 P. Cuatrecasas, M. Wilchek et C. B. Afinsen, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 61 (1968) 636.
- 10 P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 3059.