

CHROM. 9706

## Note

### Purification d'une galactokinase végétale

#### Avantages de la chromatographie d'affinité

M. J. FOGLIETTI

Laboratoire de Chimie Biologique et E.R.A. No. 99 du C.N.R.S., U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale, Université René Descartes, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris (France)

(Reçu le 31 mars 1976)

Les techniques traditionnelles de purification des protéines sont, pour la plupart, longues et laborieuses et, lorsqu'elles permettent d'obtenir une enzyme purifiée, ce n'est le plus souvent qu'avec un rendement modeste. De plus, au cours des différentes étapes, le risque de dénaturation de la protéine devient important lorsqu'il s'agit d'enzymes instables, ce qui est le cas de la galactokinase de Fenugrec (*Trigonella foenum-graecum* L., Légumineuses).

La mise en oeuvre des procédés classiques de purification des protéines (précipitation par le sulfate d'ammonium, chromatographie sur colonnes de Sephadex G-100 puis de DEAE-Sephadex A-50) permet d'obtenir cette galactokinase avec un facteur d'enrichissement modeste et un faible rendement. Nous ne pouvions donc pas préparer l'enzyme par cette voie, l'étude de son mécanisme d'action en nécessitant une quantité relativement importante.

La chromatographie d'affinité, technique simple et rapide, a permis l'obtention en une seule étape, d'une enzyme purifiée 400 fois, ceci avec un rendement de 80%.

Pour la purification des kinases, l'ATP semble actuellement le ligand le plus souvent employé. En effet, pendant que nous mettions au point notre technique, nous avons eu connaissance de la purification de la glucokinase microsomique de foie de rat<sup>1</sup> et des galactokinase et arabinokinase de *Phaseolus aureus*<sup>2</sup> par chromatographie d'affinité sur ATP-Sepharose. Toutefois, ces techniques ne sont pas spécifiques puisque toutes les kinases seront retenues sur un tel support.

La galactosamine s'étant révélée être un substrat pour la galactokinase de Fenugrec, nous avons mis au point une technique de chromatographie d'affinité sur galactosamine-CH-Sepharose, l'avantage de cette technique résidant dans la facilité de sa préparation et dans sa spécificité vis-à-vis de la galactokinase.

Dans cette note, nous exposerons et comparerons deux techniques possibles de purification de la galactokinase.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

##### *Purification par les techniques traditionnelles*

L'extrait enzymatique brut est préparé selon la technique décrite précédemment<sup>3</sup>.

*Précipitation par le sulfate d'ammonium.* L'activité galactokinase est retrouvée dans la fraction précipitant entre 40 et 80% de saturation en sulfate d'ammonium.

*Chromatographie sur colonne de Sephadex G-100.* Le précipité obtenu précédemment est redissous dans le tampon d'extraction (Tampon Phosphate mono-, dipotassique 0.01 M, pH 7.6,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0.01 M, EDTA 0.001 M); puis la solution est adsorbée sur une colonne de Sephadex G-100 (2.5  $\times$  50 cm), équilibrée avec le même tampon. Les fractions actives sont rassemblées puis concentrées sur membrane "Minicon".

*Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-50.* L'éluat de la colonne de Sephadex G-100 est passé sur une colonne de DEAE-Sephadex A-50 (1.6  $\times$  30 cm) équilibrée avec le tampon d'extraction. La colonne est ensuite éluee par le tampon d'extraction additionné de NaCl 0.1 M. Une fraction des protéines non retenues dans ces conditions est ainsi éliminée. Puis un gradient exponentiel 0.1 à 0.5 M en NaCl est installé (200 ml de tampon 0.1 M en NaCl + 50 ml de tampon 0.5 M en NaCl).

L'enzyme est éluee pour une molarité en NaCl voisine de 0.12 M. Les fractions actives sont réunies et dialysées contre le tampon d'extraction. Elles constituent la fraction galactokinase la plus purifiée.

Les données quantitatives de la purification sont rassemblées dans le Tableau I.

TABLEAU I

PRINCIPALES ÉTAPES DE LA PURIFICATION DE LA GALACTOKINASE DE FENUGREC

	<i>Protéines totales</i> (mg)	<i>Activité spécifique</i> ( $\mu\text{mole} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ )	<i>Facteur de</i> <i>purification</i>	<i>Rendement</i>
Extrait brut	390	0.10	1	100
Relargage par le sulfate d'ammonium (40-80% saturation)	136	0.135	1.35	47
Sephadex G-100	12.8	1	10	38.6
DEAE-Sephadex A-50	0.0486	7.35	73.5	0.9

#### *Purification par chromatographie d'affinité*

*Préparation du support.* La galactosamine est fixée par une liaison amide entre son groupe aminé et l'extrémité carboxylique du bras du CH-Sepharose.

Après gonflement dans une solution de chlorure de sodium 0.5 M, le CH-Sepharose (20 ml) est lavé avec 100 ml de cette même solution puis avec de l'eau amenée à pH 4.5 avec de l'acide acétique (250 ml).

Des solutions aqueuses contenant respectivement 1000  $\mu\text{moles}$  de chlorhydrate de galactosamine et 400  $\mu\text{moles}$  de *p*-toluène sulfonate de N-cyclohexyl-N'-[ $\beta$ -N-méthylmorpholinoéthyl] carbodiimide sont ajoutées à la suspension de gel. Le pH est ajusté à 4.5.

Le mélange est agité pendant une nuit à la température du laboratoire. Les produits de réaction, l'excès de ligand et de carbodiimide sont ensuite éliminés par lavage du gel avec de l'eau distillée. Puis ce dernier est équilibré avec le tampon d'extraction de l'enzyme.

La quantité de galactosamine fixée par le gel est estimée après hydrolyse chlorhydrique (HCl 6 N, 4 h à 100°) par la technique d'Elson-Morgan, modifiée par Belcher *et al.*<sup>4</sup>. 10  $\mu$ moles de galactosamine sont fixées par millilitre de gel.

**Chromatographie.** 2 ml d'extrait enzymatique brut (55 mg de protéines) sont adsorbés sur une colonne de galactosamine-CH-Sepharose (0.8  $\times$  25 cm), préalablement équilibrée avec le tampon d'extraction de l'enzyme. L'ensemble des protéines non retenues par le gel est élué par ce même tampon. Celles-ci ne présentent aucune activité galactokinase.

L'enzyme est ensuite éluée, soit par augmentation de la concentration saline du tampon (KCl 1 M), soit par addition de galactose (0.1 M) au tampon d'éluion. Ce dernier type d'éluion montre bien qu'il s'agit d'une fixation spécifique de l'enzyme par affinité (Fig. 1).

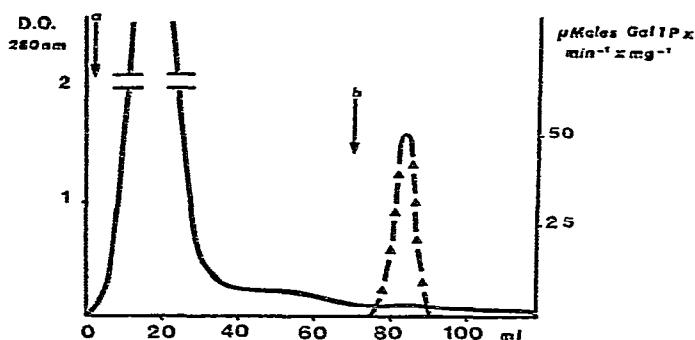


Fig. 1. Chromatographie sur galactosamine-CH-Sepharose. Elution par: (a) Tampon d'extraction de l'enzyme; (b) Tampon d'extraction + KCl 1 M ou galactose 0.1 M. —, D.O. à 280 nm; —▲—▲—, activité galactokinase. Gal 1 P = galactose phosphorylé.

Les fractions actives sont réunies, dialysées contre le tampon d'extraction et concentrées sur membrane "Minicon". L'enzyme ainsi obtenue se révèle homogène à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-agarose.

Avec une activité de 40  $\mu$ moles de galactose phosphorylé par minute par milligramme de protéine, elle se révèle purifiée 400 fois par rapport à l'extrait brut, avec un rendement de 80% environ.

## CONCLUSIONS

L'emploi des techniques classiques de purification des protéines pour isoler une enzyme peu stable telle que la galactokinase de Fenugrec ne permet d'obtenir l'enzyme qu'avec un facteur de purification modeste (75 fois) et un rendement faible (0.9%).

L'activité galactokinase est très labile puisqu'en 48 h à 4°, l'extrait brut perd 60% de son activité. Nous pensons que le facteur de purification fort modeste est lié à cette inactivation progressive de l'enzyme au fur et à mesure de la purification nécessitant plusieurs étapes. Dans un tel cas, un protocole utilisant le minimum de stades sera particulièrement favorable.

Par chromatographie d'affinité de l'enzyme sur galactosamine-CH-Sepharose, support facile à préparer et spécifique quant à la fixation de l'enzyme, il est possible d'obtenir en une seule étape une galactokinase purifiée 400 fois et avec un rendement d'environ 80%.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. Azzar, G. Berthillier et R. Got, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 470.
- 2 Pak Hoo Chan et W. Z. Hassid, *Anal. Biochem.*, 64 (1975) 372.
- 3 M. J. Foglietti et F. Percheron, *Biochimie*, 56 (1974) 473.
- 4 R. Belcher, A. S. Nitten et C. M. Sainbrook, *Analyst (London)*, 79 (1954) 201.