



УДК 612.124.017.1:577.112.088.3:543.544.42

СВЯЗЫВАНИЕ И АКТИВАЦИЯ ПЕРВОГО КОМПОНЕНТА
КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА НА ИСКУССТВЕННЫХ МАТРИЦАХ*Козлов Л. В., Сизой М. Н., Зинченко А. А.,
Иванов А. Е., Zubov В. П.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва*

Синтезированы искусственные сорбенты, представляющие собой макропористое стекло, поверхность которого покрыта сополимером N-винилпирролидона и N-замещенного акриламида. В качестве заместителей в первом сорбенте с остатком акриловой кислоты связан аминоэтанол (АЕ-стекло), а во втором — иммуноглобулин G с ковалентно связанной пространственной группой — гексаметилендиамином — IgG-стекло. Найдена специфическая сорбция компонента C1q на IgG-стекле с $K_{acc} 4,07(\pm 0,32) \cdot 10^7 M^{-1}$. Свободная энергия связывания C1q на сорбенте вдвое превышает свободную энергию связывания C1q с мономерным IgG, что свидетельствует о связывании одной молекулы C1q с двумя молекулами IgG сорбента. Найдена небольшая неспецифическая сорбция C1q на АЕ-стекле. Показано, что специфическая (на IgG-стекле) и неспецифическая (на АЕ-стекле) сорбция первого компонента комплемента на матрице приводят к активации классического пути системы комплемента, что проявляется в потреблении компонентов C4, C2, C3 и C5 при инкубации сорбентов с сывороткой крови человека. IgG-стекло использовали для получения C1q из сыворотки крови человека методом аффинной хроматографии. При этом несвязавшаяся часть сыворотки может быть использована в качестве реагента R1q. Выход высокоочищенного компонента C1q при использовании аффинной хроматографии на IgG-стекле с последующей гель-фильтрацией на сефакриле S-300 составляет 63,6%.

Система комплемента, часть иммунной системы организма, представляет собой совокупность 20 белков: ферментов, регуляторов и белков мембраноатакующего комплекса [1]. Основные этапы каскада реакций в классическом и альтернативном путях активации комплемента — узнавание активатора, амплификация и формирование ионного канала протекают на биологических мембранах — клеточных стенках бактерий, макроорганизмов и на искусственных бислойных мембранах. За узнавание и инициацию активации классического пути ответственен белок C1q — субкомпонент первого компонента комплемента. В состав мультибелкового комплекса C1 кроме C1q входят также по две молекулы зимогенов протеиназ трипсинового типа — C1r и C1s, превращающиеся в ферментативно активные формы C1r и C1s после специфической фиксации C1q на активаторе классического пути. C1r₂—C1s₂ связаны с C1q Ca²⁺-зависимым образом, поэтому хелатирование ионов Ca²⁺ приводит к диссоциации комплекса C1 и препятствует активации классического пути. Белок C1q с молекулярной массой 459 300 [2] представляет собой 6-субъединичную структуру. Каждая структурная единица состоит из глобулярной «головки» и коллагенового «хвоста». Коллагеновые части сплетены таким образом, что внешний вид молекулы C1q представляет собой «букет из 6 тюльпанов». Функционально «головки тюльпанов» — узнающие части молекулы, а коллагеновые «стебли» — место связывания C1r₂—C1s₂ [3].

Сама молекула C1q не обладает ферментативной активностью, однако ее связывание на активирующей поверхности приводит к активации C1r и C1s. Механизм трансляции информации о связывании C1q на молекулу C1r неясен. Однако имеются данные, свидетельствующие в пользу того, что к активации C1r, а затем и C1s приводят конформационные изменения молекулы C1q, происходящие в результате ее связывания с активатором [4].

Активаторами классического пути комплемента являются агрегированные комплексы антиген—антитело, образованные иммуноглобулинами классов IgG и IgM, и антитела, связанные на антигенах клеток или крупных частиц [1]. C1 активируется также рядом агентов различной химической природы, например липополисахаридами, полисахаридами, митохондриальными мембранами, кристаллами урата натрия, РНК опухолевых вирусов, двунической ДНК, полиинозиновой кислотой и т. п. [1, 5, 6]. Первым требованием для активации C1 является связывание молекулы C1q, вторым — полимерная структура активатора, позволяющая осуществлять многоточечное связывание молекулы C1q, обусловленное поливалентной природой этой молекулы — наличием шести рецептирующих глобул. Многоточечность связывания приводит к его усилению, т. е. к снижению константы диссоциации комплекса C1q с активатором [6]. Однако взаимодействие C1 не является достаточным условием для его активации. Так, мономеры IgG способны связываться с C1q [7], найдена также активация C1 мономерами IgG [8], однако в крови, как известно, нет постоянной жидкофазной активации классического пути комплемента. Ряд неиммунных активаторов, осуществляющих многоточечное связывание с C1q, в определенных экспериментальных условиях не обладают способностью активировать C1 [6]. В обзоре [6] высказываются три предположения о причинах возможного отсутствия активации при связывании C1: 1) необходимость связывания активатора не только с C1q, но и с C1r и C1s; 2) необходимость определенной свободы C1 для проявления внутримолекулярной подвижности и конформационных изменений; 3) критическое значение размеров активатора, необходимых для связывания определенного числа «головок» молекулы C1q.

Специфичности и количественной характеристике связывания C1, необходимого для активации классического пути комплемента, посвящена данная работа. Для решения этих вопросов были синтезированы искусственные матрицы, одна из которых имела на своей поверхности естественные лигандные группы — молекулы IgG, а вторая представляла собой синтетический полимер с регулярной структурой. Первая матрица благодаря ее способности специфически взаимодействовать с компонентом C1q была использована для аффинной хроматографии при выделении C1q из сыворотки крови человека, а также для получения реагента R1q, представляющего собой препарат сыворотки крови человека, имеющий в своем составе все компоненты комплемента, кроме C1q [5, 9].

Для специфического связывания C1q в аффинной хроматографии при получении C1q [5, 10, 11] или для методов определения циркулирующих иммунных комплексов [12] используются искусственные матрицы. Описаны сорбенты на основе сефарозы с иммобилизованными иммуноглобулинами [5, 10, 11], а также гранулированный полиакриламид, модифицированный тринитрофенильными группами [12]. При этом использовались сильно набухающие носители: сефароза, биогель Р-100. Упомянутые исследования носили чисто практический характер — не давалась количественная характеристика связывания C1q на сорбентах и не изучалась возможность активации комплемента.

В качестве носителя мы решили использовать жесткий несжимаемый материал, который создавал бы определенные преимущества в работе (возможность быстрого удаления сорбента из реакционной смеси, удобства при взятии влажных навесок сорбента, несжимаемость сорбента в колонке и возможности создания более высоких скоростей и давлений при работе с колонками). Таким требованиям отвечает макропористое стекло (с размерами пор 200—210 нм). Химическая прививка сополимера N-винилпирролидона и N-замещенного акриламида на поверхность макропористого стекла позволяет значительно снизить неспецифическую адсорбцию белков на этой поверхности, а также ввести в состав сорбента функциональные группы для иммобилизации белка путем образования ковалентных связей.

Макропористое стекло аминосиланизировали с помощью γ -аминопропилтриэтоксисилана, затем обрабатывали сополимером N-винилпирролидона и акрилоилхлорида с последующей реакцией остающихся хлорангид-

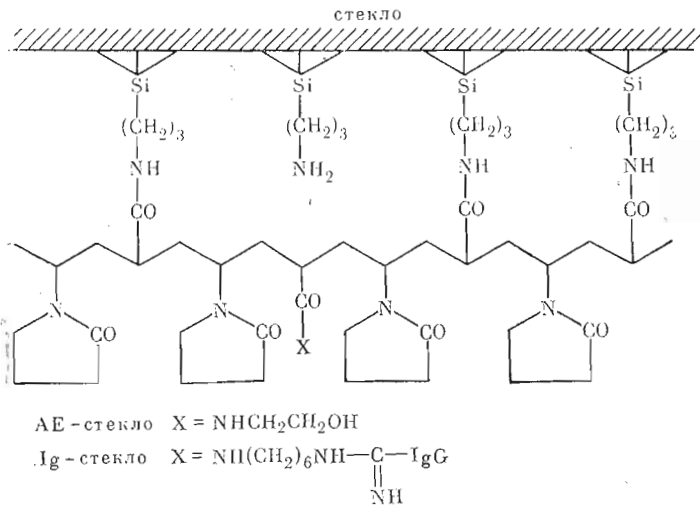


Рис. 1. Структура синтезированных сорбентов

ридных групп с аминогруппами аминоэтанола при получении аминоэтанол-стекла (АЕ-стекла) или гексаметилендиамин-стекла (НМД-стекла). НМД-стекло далее использовали для приготовления специфического сорбента для С1q — с помощью бромциана на этом сорбенте иммобилизовали иммуноглобулин IgG (IgG-стекло). Неспецифическая сорбция белков на матрицах за счет остающихся свободных аминогрупп (~40 мкмоль/г) была проверена на примере АЕ-стекла для альбумина и химотрипсина. Было найдено, что при нанесении 1 мг белка на 1 г сорбента белки элюируются при рН 7 и ионной силе 0,1 с выходом не менее 90%, т. е. сорбция их весьма низка. Химическая структура сорбентов схематически представлена на рис. 1.

Сорбцию компонента С1q на синтезированных сорбентах изучали с использованием сыворотки крови человека, имевшей нормальное содержание этого субкомпонента, которое принималось равным 70 мг/л [13], или $1,524 \cdot 10^{-7}$ М. На рис. 2 показано изменение гемолитической активности С1q в системах, содержащих различные количества сыворотки, при добавлении к ним сорбентов. Видно, что АЕ-стекло относительно мало связывает С1q, в то время как на

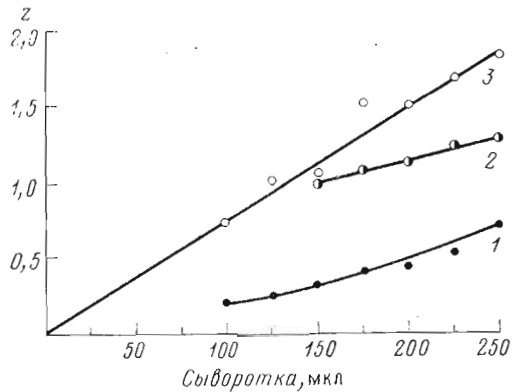


Рис. 2. Связывание С1q на АЕ-стекле (1) и IgG-стекле (2); по оси ординат отложена гемолитическая активность С1q — величины z [9], по оси абсцисс — количество добавленной в систему сыворотки, 3 — контрольный опыт без сорбента

на IgG-стекле связывание этого компонента существенно. Зависимость количества связанного С1q от количества добавленной сыворотки (рис. 3) обнаруживает для IgG-стекла выраженную кривую с насыщением, в то время как кривая неспецифического связывания С1q на АЕ-стекле свидетельствует о возрастании степени связывания при повышении концентрации сыворотки. Такой характер связывания во втором случае может быть обусловлен возрастанием при повышении концентрации сыворотки неспецифической сорбции иммуноглобулинов на АЕ-стекле и сорбцией С1q на сорбированных иммуноглобулинах.

Данные, полученные для связывания С1q на IgG-стекле, позволяют построить график Скэтчарда (рис. 4) и определить максимальное связывание

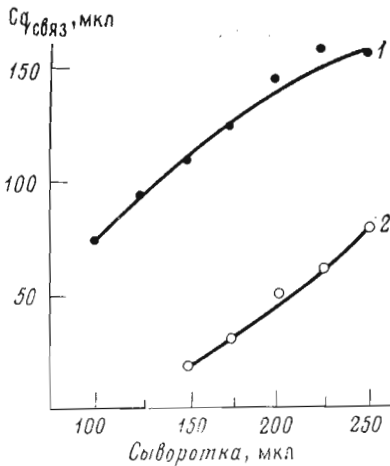


Рис. 3

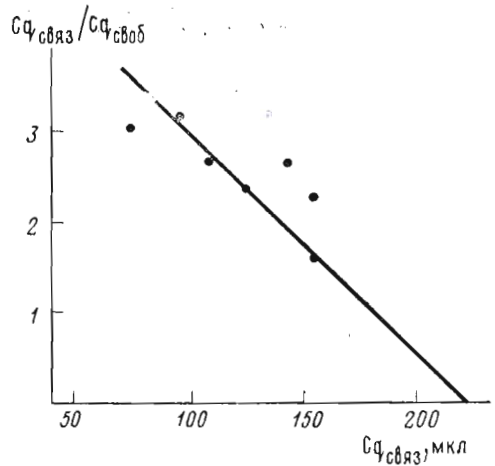


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость количества $C1q$, связанного на IgG-стекле (1) и AE-стекле (2), от количества добавленного в систему суммарного (связанный+свободный) $C1q$. Количество $C1q$ выражено в виде объемов содержащей его сыворотки

Рис. 4. График Скэтчарда для связывания $C1q$ на IgG-стекле (см. подпись к рис. 3)

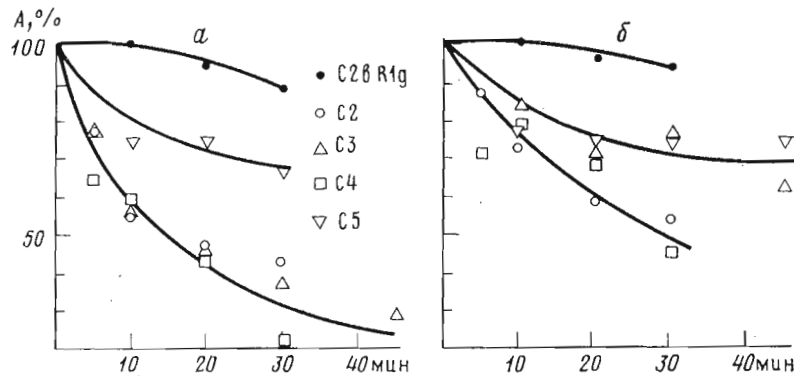


Рис. 5. Потребление компонентов C2, C3, C4 и C5 в сыворотке, а также C2 в R1g (контроль) при инкубации сыворотки с IgG-стеклом (а) и AE-стеклом (б)

вание $C1q$ на сорбенте и константу ассоциации для $C1q$ на иммуноглобулине, иммобилизованном на носителе. Оказалось, что предельно на 1 г сорбента связывается столько $C1q$, сколько его содержится в 22 мл сыворотки, т. е. около 1,5 мг. Константа ассоциации $C1q$ с сорбентом равна $4,07(\pm 0,32) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, что соответствует величине свободной энергии 10,2 ккал/моль. Это примерно в 2 раза выше свободной энергии диссоциации $C1q$ с мономерного IgG (5,9 и 5,0–6,1 ккал/моль для различных подклассов IgG [7]). Эти данные свидетельствуют в пользу связывания одной молекулы $C1q$ на двух молекулах IgG, расположенных близко друг от друга на поверхности носителя. Несложный расчет показывает, что 1 г сорбента содержит 1 мг эффективных для связывания молекул IgG.

Известно, что мономерные молекулы иммуноглобулина, хотя и связываются с $C1q$, весьма мало эффективны в отношении активации C1 [8], в то время как димерные молекулы IgG активируют C1 даже в отсутствие антигена [8]. Это побудило нас изучить динамику активации комплемента в сыворотке крови под действием IgG-стекла, следя за потреблением компонентов C4, C2, C3 и C5, что позволило бы оценить глубину протекающего процесса активации (рис. 5).

Исследование потребления компонентов C4, C2, C3 и C5 в сыворотке при ее инкубации с IgG-стеклом показало, что компоненты C4, C2 и C3

расходуются примерно в одинаковой степени, в то время как потребление С5 отстает. При инкубации сыворотки с АЕ-стеклом комплемент активируется в меньшей степени. Кроме того, если степень расхода компонентов С4 и С2 примерно одинакова, то в одинаковой же степени отстает потребление компонентов С3 и С5. В обоих случаях падение активности компонентов происходит в результате активации комплемента по классическому пути, о чем свидетельствует отсутствие падения активности компонента С2 при инкубации с сорбентами сыворотки, лишенной С1q, — R1q.

Полученные данные показывают, что при активации специфическим сорбентом происходит не только расщепление компонентов С4 и С2 субкомпонентом С1s активированного компонента С1, но также их иммобилизация на сорбенте с образованием С3-конвертазы — С4bС2a, дальнейшая же иммобилизация активированного компонента С3 с образованием С5-конвертазы — С4bС2aС3b протекает в существенно меньшей степени, по-видимому, из-за отсутствия достаточного места для благоприятного связывания компонента С3b. При активации же неспецифическим сорбентом — АЕ-стеклом — образование С3-конвертазы протекает в меньшей степени и столь же мало образование С5-конвертазы. Это может объясняться отсутствием на этом сорбенте иммуноглобулина, на Fab-участках молекулы которого могут иммобилизоваться фрагменты С4b и С3b.

Результаты этих исследований свидетельствуют в пользу имеющихся представлений, что активация классического пути комплемента может протекать не только антигенезависимым образом [8], как в случае IgG-стекла, но и антигенезависимо [14], как в случае АЕ-стекла. Это в свою очередь означает, что активация С1г происходит под влиянием каких-то конформационных изменений молекулы С1q при многоточечном связывании последней [4]. Как показывают опыты по активации комплемента IgG-стеклом, для активации (следовательно, для конформационных изменений, достаточных для активации) это связывание может быть двухточечным, поскольку величина энергии связывания С1q со специфическим сорбентом характеризует связывание с двумя молекулами иммуноглобулина.

Специфический сорбент IgG-стекло был использован также для получения реагента R1q — сыворотки крови, содержащей все компоненты комплемента, кроме С1q. Такой реагент удобен для определения С1q по гемолизу сенсibilизированных кроличьими антителами эритроцитов барана [5, 9, 10]. Его получение с помощью аффинного сорбента было впервые предложено в работе [10]. Использование сорбентов на основе сефарозы [5] создает при получении реагента R1q некоторые трудности, связанные часто с наличием высокого фонового содержания С1q в реагенте, что заставляет либо повторно пропускать реагент через аффинный сорбент, либо подбирать более низкие количества вводимого в пробу реагента в ущерб чувствительности метода [1]. Преимущество IgG-стекла состоит в том, что при пропускании сыворотки через него сразу получается реагент с низким фоновым содержанием С1q — фон реагента практически не зависит от количества взятого в пробу реагента. Определение С1q гемолитически — самый чувствительный из методов [13]: нам удается определять количества С1q менее 1 нг.

Относительно содержания С1q в сыворотке крови человека в литературе имеются противоречивые сведения. Так, в работе Шмидта и соавт.

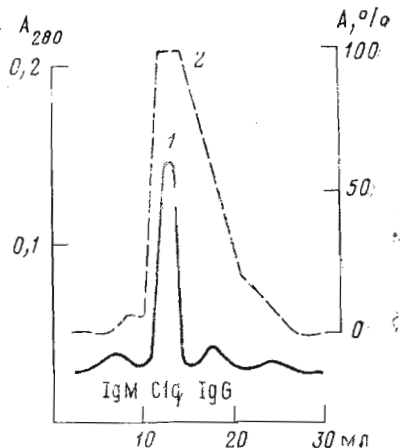


Рис. 6. Гель-фильтрация на сефариле S-300 препарата С1q, элюированного с аффинной колонки. 1 — A_{280} , 2 — гемолитическая активность С1q в % от максимальной в пике

Характеристика очищенного препарата С1q

Препарат	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Активность, ед.	Уд. активность, ед./мг	Выход. %
Сыворотка	10	660	835 000	1265	100,0
Препарат С1q	0,425	1,19	530 800	446 000	63,6

[12] указывается величина 100—200 мг/л. Это согласуется с мнением Рейда [13] — от 60 до 190 мг/л со средней величиной 70 мг/л. Однако метод электроиммунодиффузии [15] дает значения 190—430 мг/л со средней величиной в норме 276 ± 7 мг/л. Нам представляется, что данные Рейда наиболее правильны.

Для получения С1q мы использовали сыворотку крови донора с повышенным содержанием этого компонента — около 190 мг/л. В литературе известны два приема, используемые для элюирования С1q с аффинного сорбента: элюирование линейным градиентом соли [10] и ступенчатое элюирование 1,4-диаминобутаном [11]. В нашем случае белок весьма прочно сорбировался на IgG-стекле и его не удавалось эффективно десорбировать солью, поэтому для элюирования использовали раствор, содержащий 0,2 М гексаметилендиамин и 0,5 М NaCl, pH 7,2. Полученный на первой стадии препарат С1q содержал, по данным иммуноэлектрофореза, кроме С1q иммуноглобулины IgG и IgM. Для удаления этих примесей проводили вторую стадию очистки — гель-фильтрацию на колонке с сефакрилом S-300 в присутствии 5 мМ гексаметилендиамина для лучшей диссоциации комплексов иммуноглобулинов с С1q (рис. 6). Наличие иммуноглобулинов и С1q во фракциях определяли иммуноэлектрофорезом и радиальной иммунодиффузией. Вторая фракция белка, обладающая гемолитической активностью С1q, не содержала примесных белков (отрицательная реакция с анти-IgG, анти-IgM, анти-IgA, анти-СЗ и антисывороткой против всех сывороточных белков человека, в последнем случае — одна зона преципитации на иммуноэлектрофореграмме, соответствующая С1q). В таблице представлена характеристика полученного препарата С1q в сравнении с исходной сывороткой. Количество белка оценивали, используя коэффициент экстинкции $E_{230}^{1\%}$ 6,82 [16].

При проведении операций по выделению С1q следует иметь в виду, что растворы, содержащие С1q, перемешивать можно крайне осторожно во избежание необратимой денатурации [13]. Кроме того, С1q в разбавленных растворах также быстро теряет активность. Мы нашли, что раствор С1q в концентрациях 2,8 мг белка/мл в 5 мМ трис-буфере, pH 7,4, содержащем 10 мМ EDTA, 0,5 М NaCl, хранится при 4°С без потери активности в течение по крайней мере 1 месяца. Некоторые особенности данной методики выделения С1q: быстрое элюирование гексаметилендиамином, осаждение сульфатом аммония с последующим растворением в минимальных объемах — позволяют избежать разбавления растворов С1q и, по-видимому, объясняют высокий выход, достигаемый этим методом. Лучшие методы позволяли получать 50 мг белка из 1 л сыворотки [13]. Наш метод дает вдвое больший выход.

Экспериментальная часть

В работе использовали 5,5-диэтилбарбитуровую кислоту (веронал) и ее натриевую соль (мединал), бромциан (Serva, ФРГ), трис (Sigma, США), реактивы для иммуноэлектрофореза и иммунодиффузии: трис-барбиталовый буфер, pH 8,6, агарозы Н и М (LKB, Швеция), сефакрил S-300 (Pharmacia, Швеция), DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия), кумасси Р и сывороточный альбумин человека (Reanal, Венгрия). Моноспецифические антисыворотки анти-IgG, анти-IgM, анти-IgA — овечьи, производства Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РСФСР; козьи антисыворотки: анти-СЗ и антисыворотки против всех сывороточных белков человека — того же производства; кроличья антисыворотка против

С1q любезно предоставлена В. А. Алешкиным (МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского МЗ РСФСР). γ -Глобулин человека — препарат СПК ЦНИИГПК МЗ РСФСР. Гемолитическая сыворотка — производства МНИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова МЗ СССР. В работе использованы также макропористое стекло МПС-2000 В-ГХ (уд. поверхность 24–36 м²/г, размер пор 200–210 нм, объем пор 1,2–1,8 см³/г [17]), γ -аминопропилтриэтоксисилан марки АГМ-3, N-винилпирролидон технический (перегоняли под вакуумом при 119° С, 2 мм рт. ст., в присутствии *m*-фенилендиизоцианата), 1,4-диоксан, ч.д.а. (выдерживали 2–3 сут над КОН и перегоняли, т. кип. 101–102° С) и остальные реактивы (квалификации не ниже ч.д.а., дополнительной очистке не подвергали) — все отечественного производства. Акрилоилхлорид получали из акриловой кислоты и бензоилхлорида — т. кип. 72–74° С.

Изотонический вероналовый буфер с Ca²⁺ и Mg²⁺ (VBS²⁺) готовили так, как описано в работе [9]. VBS²⁺/HSA содержал 1 мг сывороточного альбумина человека на 1 мл VBS²⁺.

Изотонический трис-буфер с EDTA (TBSE) содержал 5 мМ трис, 0,15 М NaCl, 10 мМ EDTA·Na₂, pH 7,2 (доводили 0,01 М NaOH).

Изотонический трис-буфер с Ca²⁺ и Mg²⁺, pH 7,4 (TBS²⁺) содержал 0,5 мМ трис-HCl, 0,15 М NaCl, 0,5 мМ MgCl₂ и 0,15 мМ CaCl₂.

Приготовление реагентов R2, R3, R4 и R5 описано в работе [9].

Приготовление сенсibilизированных эритроцитов (EA). К 10 мл взвеси эритроцитов барана (1·10⁹ клеток/мл) [9] прибавляли 10 мл гемолитической сыворотки, разбавленной VBS²⁺ (1:400) и инкубировали 30 мин при 37° С, периодически перемешивая. Взвесь эритроцитов трижды промывали VBS²⁺/HSA и стандартизовали до концентрации 1,5·10⁸ клеток/мл в VBS²⁺/HSA. 0,2 мл суспензии EA в смеси с 2,8 мл воды должны иметь A₄₁₂, равную 1.

Приготовление комплекса EAC14. 10 мл EA с концентрацией 1·10⁹ клеток/мл инкубировали 15 мин с 1 мл реагента R2 при 30° С, периодически перемешивая. Комплекс промывали многократно VBS²⁺/HSA и готовили стандартную концентрацию EAC14 — 1,5·10⁸ клеток/мл (A₄₁₂ 1).

Очистка IgG человека. 45 мл 10% раствора препарата γ -глобулина человека разбавляли в 2 раза 12,5 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,2, и диализовали против 2 л того же буфера в течение 20 ч со сменой буфера через 10 ч. Раствор центрифугировали 20 мин при 3200g и супернатант наносили на уравновешенную тем же буфером колонку (3,5×40 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 и элюировали тем же буфером. Раствор белка, прошедший через колонку, центрифугировали 20 мин при 3200g. Концентрация IgG в растворе составляла 25 мг/мл. Раствор замораживали и хранили при -70° С.

Аминосиланизация макропористого стекла. 25 г макропористого стекла МПС-2000 В-ГХ промывали 6 М HCl до обесцвечивания промывного раствора, затем дистиллированной водой до нейтрального pH, ацетоном и высушивали на воздухе и под вакуумом 6–8 ч при 150° С. Подготовленное таким образом стекло обрабатывали 9 ч 2% раствором γ -аминопропилтриэтоксисиланом в толуоле при кипении. Непрореагировавший силан отмывали 6–8 ч толуолом в аппарате Сокслета, затем стекло высушивали на воздухе и под вакуумом 6 ч при 100° С. Аминосиланизированное стекло содержало 170 мкмоль NH₂-групп на 1 г, что соответствует 2,8–4,2 NH₂-групп на 1 нм². Количество свободных аминогрупп определяли по методике [18], предварительно растворяя навеску стекла в плавиковой кислоте и далее нейтрализуя полученный раствор щелочью.

Сополимер N-винилпирролидона и акрилоилхлорида получали радикальной сополимеризацией мономеров в диоксане в атмосфере азота при 60° С (инициатор — азобисдизобутиронитрил, 60–80 мин, концентрации мономеров 1 М). Акрилоилхлорид отгоняли на роторном испарителе с диоксаном.

Получение AE-стекла и HMD-стекла. 25 г сухого аминосиланизированного стекла обрабатывали 150 мл 2–3% раствора сополимера N-винилпирролидона и акрилоилхлорида в диоксане при 20° С и перемешивали 2–3 ч,

затем промывали сухим диоксаном (4×100 мл) и прибавляли 100 мл 10% раствора соответствующего амина (аминоэтанола или гексаметилендиамин) в диоксане. После взаимодействия с полимерным хлорангидридом содержание свободных аминогрупп снизилось со 170 до 40 мкмоль/г. Количество свободных NH₂-групп в АЕ- и НМД-стекле соответствует 40 и 80 мкмоль/г.

Иммобилизованный иммуноглобулин (IgG-стекло) получали по стандартным методам иммобилизации с помощью бромциана [19], используя 12 г НМД-стекла, 3 г бромциана и раствор иммуноглобулина (25 мг/мл).

Активность С2, С3, С4, С5, а также С1q определяли как описано в работе [9].

Определение связывания С1q на сорбентах в равновесии. Пробы сыворотки крови человека от 100 до 250 мкл, доведенные до общего объема 250 мкл буфером TBS²⁺, инкубировали 30 мин с 10 мг АЕ- или IgG-стекла (избыток жидкости при взятии навески сорбента удаляли фильтровальной бумагой) и без сорбента при 4° С, осторожно перемешивая на магнитной мешалке. После инкубации пробы сыворотки объемом 0,25 мкл вносили в смесь, содержащую 100 мкл TBS²⁺ и 200 мкл ЕА в VBS²⁺/HSA. Смесь инкубировали 15 мин при 30° С, центрифугировали при 1500g, супернатант аккуратно сливали, к остающемуся комплексу ЕАС1q в каждую пробу добавляли по 40 мкл R1q с 450 мкл VBS²⁺/HSA и инкубировали 60 мин при 37° С. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали при 1500g и измеряли A₄₁₂ супернатанта. Количество С1q, не связавшегося с сорбентом, оценивали по калибровочному графику, полученному в опытах с сывороткой без сорбента, и выражали в виде объемов содержащей его сыворотки.

Получение реагента R1q с помощью IgG-стекла. К 10 мл сыворотки крови человека добавляли 37,2 мг EDTA·Na₂ и осторожно перемешивали на магнитной мешалке до растворения соли (конечная концентрация 10 мМ) и доводили 0,15 М NaOH до рН 7,2. Подготовленную таким образом сыворотку наносили на колонку с IgG-стеклом (9,5×2 см), уравновешенную TBSE, со скоростью 15 мл/ч. Колонку промывали 50 мл TBSE со скоростью 35 мл/ч. Фракции не связавшегося на колонке белка (~50 мл) не проявляли активности С1q. Далее проводили элюирование С1q (см. ниже). Фракции несвязавшегося белка с максимальным поглощением при 280 нм объединяли (~18 мл), добавляли раствор, содержащий 0,3 М CaCl₂, 1 М MgCl₂, рН 7,4, из расчета 15 мкл раствора на 1 мл фракции, доводили до рН 7,4, диализовали в течение ночи против VBS²⁺, разливали небольшими аликвотами по пробиркам, замораживали и хранили при -70° С. Использовали в качестве реагента R1q, после размораживания, непосредственно перед титрованием С1q.

Оптимальное для титрования количество реагента R1q определяли в следующем эксперименте: 200 мкл ЕА в VBS²⁺/HSA, от 30 до 100 мкл R1q, 0,25 мкл сыворотки крови человека (в контроле при определении фона реагента сыворотка отсутствовала) и VBS²⁺/HSA до полного объема смеси 500 мкл инкубировали 60 мин при 37° С. Реакцию останавливали добавлением 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугировали при 4° С 10 мин при 1500g и измеряли A₄₁₂ супернатанта. В типичном эксперименте фон реагента варьировал от A₄₁₂ 0,05 для 30 мкл реагента до 0,08 для 100 мкл, а полный лизис с 0,25 мкл сыворотки наблюдался, начиная от 40 мкл реагента.

Выделение и очистка компонента С1q. После получения реагента R1q на колонке с IgG-стеклом оставался сорбированный компонент С1q, который элюировали 0,2 М гексаметилендиамин в растворе 5 мМ триса, 10 мМ EDTA и 0,5 М NaCl, доведенном 0,01 М HCl до рН 7,2. Фракции, проявляющие активность С1q, объединяли (~60 мл) и белок осаждали сульфатом аммония при 33% насыщения, достигаемого добавлением 1/2 объема насыщенного при 20° С раствора сульфата при осторожном перемешивании. Через 17 ч осадок белка отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 4° С при 3500g и растворяли в 0,5 мл раствора, содержащего 5 мМ трис, 10 мМ EDTA, 0,5 М NaCl и 5 мМ гексаметилендиамин,

pH 7,3. Раствор белка центрифугировали и наносили на колонку с сефагрилом S-300 (120×1,4 см), предварительно промытую тем же буферным раствором, в котором растворяли белок. Гель-фильтрацию проводили в том же буфере со скоростью 35 мл/ч. Из фракций отбирали по 0,5 мкл для определения активности C1q (рис. 6). Фракции второго белкового пика (A_{280}), содержащие наибольшую гемолитическую активность C1q, объединяли и белок осаждали сульфатом аммония при 33% насыщения. Осадок белка отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 3500g и при 4° С, промывали 0,015 М NaCl, растворяли в 425 мкл раствора, содержащего 5 мМ трис, 10 мМ EDTA, 0,5 М NaCl, pH 7,4, и хранили при 4° С. Выход C1q по активности — 63,6%. Раствор белка хранился в течение месяца без потери гемолитической активности.

Иммунохимическую чистоту препарата C1q определяли иммуноэлектрофорезом по Грабару и Вильямсу, а также радиальной иммунодиффузией по Ухтерлони, как это описано в руководстве [20].

Активация комплемента с помощью IgG-стекла и АЕ-стекла. В 100 мкл сыворотки крови человека, разбавленной в 2 раза VBS²⁺/HSA, вносили 10 мг сорбента и инкубировали 45 мин при 37° С, периодически перемешивая. Контрольная проба не содержала сорбента. Через определенные промежутки времени инкубации (0, 5, 10, 20, 30 и 45 мин) отбирали пробы по 0,3 мкл — для определения активности компонента C4, 4 мкл — C2, 1 мкл — C3, и 5 мкл — C5 (рис. 5).

ЛИТЕРАТУРА

1. Reid K. B. M., Porter R. R. *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, v. 50, p. 433–464.
2. Reid K. B. M. *Biochem. Soc. Trans.*, 1983, v. 11, № 1, p. 1–12.
3. Strang C. J., Siegel R. C., Phillips M. L., Poon P. H., Schumaker V. N. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, v. 79, № 2, p. 586–590.
4. Golan M. D., Burger R., Loos M. J. *Immunol.*, 1982, v. 129, № 2, p. 445–447.
5. Козлов Л. В., Зинченко А. А., Соляков Л. С., Сизой М. Н., Ищенко А. М., Мартюшин С. В., Андреев С. В. *Биоорганическая химия*, 1983, т. 9, № 8, с. 1047–1055.
6. Cooper N. R. *Fed. Proc.*, 1983, v. 42, № 1, p. 134–138.
7. Schumaker V. N., Calcott M. A., Spiegelberg H. L., Müller-Eberhard H. J. *Biochemistry*, 1976, v. 15, № 23, p. 5175–5181.
8. Tschop J., Schullhess T., Engel J., Jaton J.-C. *FEBS Lett.*, 1980, v. 112, № 2, p. 152–154.
9. Козлов Л. В., Крылова Ю. И., Чух В. П., Молчанова Н. Н. *Биоорганическая химия*, 1982, т. 8, № 5, с. 652–659.
10. Kolb W. P., Kolb L. M., Podack E. R. J. *Immunol.*, 1979, v. 122, № 5, p. 2103–2111.
11. Assimeli S. N., Bing D. H., Painter R. H. J. *Immunol.*, 1974, v. 113, № 1, p. 225–234.
12. Schmidt R., Walther S., Sodomann C.-P. *Immunobiol.*, 1932, v. 162, № 2, p. 153–164.
13. Reid K. B. M. In: *Methods in Enzymology*/Eds Colowick S. P., Kaplan N. O. N. Y.: Acad. Press, 1982, v. 82, p. 319–324.
14. Loos M. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 1982, v. 133 C, № 2, p. 165–179.
15. Schuller E., Helary M. J. *Immunol. Meth.*, 1983, v. 56, № 2, p. 159–165.
16. Reid K. B. M., Lowe D. M., Porter R. R. *Biochem. J.*, 1972, v. 130, № 3, p. 749–763.
17. Борисова В. Н., Назаретян Л. А. В кн.: *Введение в прикладную энзимологию*/Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 26–61.
18. Svedas V.-J. K., Galaev I. J., Borisov I. L., Berezin I. V. *Anal. Biochem.*, 1980, v. 101, № 1, p. 188–195.
19. Бессмертная Л. И., Антонов В. К. В кн.: *Введение в прикладную энзимологию*/Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 101–133.
20. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием и иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983, с. 124–127, 134–139.

Поступила в редакцию
19.IV.1984

BINDING AND ACTIVATION OF THE FIRST COMPONENT
OF HUMAN COMPLEMENT ON ARTIFICIAL MATRICES

KOZLOV L. V., SIZOJ M. N., ZINCHENKO A. A., IVANOV A. E., ZUBOV V. P.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Artificial sorbents that comprise macroporous glass covered by the copolymer of N-vinylpyrrolidone and N-substituted acrylamide have been synthesized. Aminoethanol is bound to acrylic acid residue in one sorbent (AE-glass), whereas the other sorbent involves immunoglobulin G with the hexamethylenediamine spacer (IgG-glass). C1q binds specifically to IgG-glass with K_a $4.07(\pm 0.32) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Free energy of the C1q binding to IgG-glass is twice higher than that of its binding to monomeric IgG. This evidences that one C1q molecule associates with two IgG molecules of the sorbent. A weak nonspecific sorption of C1q to AE-glass was found. Both specific (on IgG-glass) and nonspecific (on AE-glass) sorption of the first component of complement activate the classical pathway in human serum as manifested in the consumption of the C4, C2, C3 and C5 components. IgG-glass was employed for C1q isolation from human serum by affinity chromatography, whereas unbound part of serum may be used as a reagent R1q. The yield of highly purified C1q after IgG-glass affinity chromatography and gel filtration on Sephacryl S-300 is 63,6%.