БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 15 * №11 * 1989

УДК 577.112.088.3:543.544

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БИОПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
IX.* ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ АФФИННЫХ АДСОРБЕНТОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ПОЛИПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ КОЛЛАГЕНА

Митина В. Х., Французова Н. А., Клящицкий Б. А., Краснопольский Ю. М.*, Сенников Г. А.*, Швец В. И.**, Орехович В. Н.

Институт биологической и медицинской химии Академии медицинских наук СССР, Москва;

* *Харьковское предприятие по производству бактерийных препаратов Минмедпрома СССР;*

** *Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова*

Осуществлен синтез и изучены свойства новых аффинных адсорбентов с иммобилизованными полипептидными фрагментами молекулы коллагена (α-цепи, β-компоненты, пептиды бромцианового расщепления). Адсорбенты с α-цепями и α1CB7-пептидом обладали в 1,5–2,0 раза большей емкостью по связыванию фибронектина (мг/мг иммобилизованного лиганда), чем коммерческая желатин-сефароза. Организовано промышленное производство высокоочищенного препарата фибронектина из плазмы крови человека с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованных индивидуальных α-цепях коллагена.

Биоспецифическое взаимодействие фибронектина и коллагена, играющее важную роль в процессах жизнедеятельности [2], нашло прикладное применение для быстрого и удобного выделения фибронектина из различных источников аффинной хроматографией на иммобилизованном денатурированном коллагене (желатине) [3]. Указанное биоспецифическое выделение фибронектина — хорошо апробированный процесс, а сорбент «желатин-сефароза» (I) производится рядом зарубежных фирм. К недостаткам этой методики относится необходимость дополнительных стадий очистки для получения электрофоретически гомогенного препарата фибронектина [4], ограниченность срока эксплуатации аффинных адсорбентов на агарозной основе и относительно малая их емкость.

Недавно мы провели синтез и сравнительное изучение биоспецифических адсорбентов на основе сефарозы и сферона с целью оптимизации процесса выделения фибронектина с помощью аффинной хроматографии [1]. В настоящей работе для получения новых эффективных аффинных адсорбентов, прежде всего для хроматографии фибронектина, мы применили методический прием, заключающийся в использовании в качестве лиганда фрагментов молекулы коллагена, содержащих участок связывания с выделяемым биополимером.

Участок связывания с фибронектином локализован как в отдельных цепях коллагена, так и в соответствующих бромциановых пептидах (α1CB7, α2CB5) [5]. Количественные аспекты взаимодействия фибронектина с фрагментами молекулы коллагена практически не изучались. Лишь недавно появилось сообщение [6], в котором представлено значение константы диссоциации комплекса фибронектина и α-цепей коллагена, составляющее $1{,}3 \cdot 10^{-8}$ М, и показано, что связывание фибронектина с α1CB7-пептидом оказалось таким же, как и с α1-цепью. Мы синтезиро-

* Сообщение VIII см. [1].

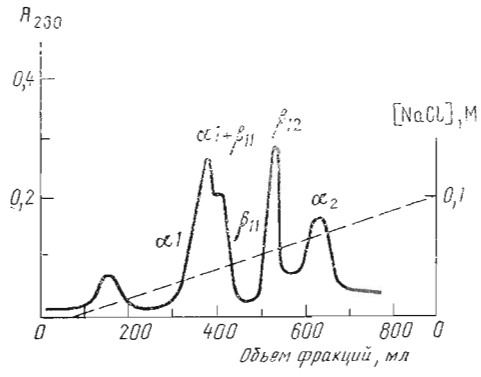

Рис. 1

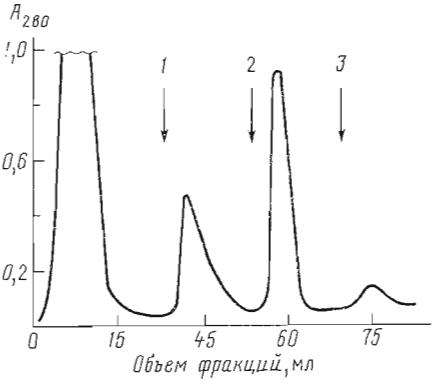

Рис. 2

Рис. 1. Разделение коллагена на α-цепи и β-компоненты ионообменной хроматографией на целлюлозе СМ-52. Условия хроматографии см. в «Экспер. части». Идентификация продуктов пиков проведена в соответствии с данными работы [5]

Рис. 2. Аффинная хроматография белков плазмы крови человека на адсорбенте (VI). Стрелками указаны моменты добавления 1 (*1*), 4 (*2*) и 8 М (*3*) мочевины в уравновешивающем буфере В. Условия см. в «Экспер. части»

вали адсорбенты с иммобилизованными полипептидными фрагментами молекулы коллагена типа I, содержащими участок связывания с фибронектином, а именно: α1-цепь-сефароза (II), α2-цепь-сефароза (III), β_{11}-фрагмент-сефароза (IV), β_{12}-фрагмент-сефароза (V), α1CB7-пептид-сефароза (VI), а также α1CB8-пептид-сефароза (VII). Изучение свойств такого рода адсорбентов представляет интерес как для повышения эффективности аффинной хроматографии фибронектина, и прежде всего емкости сорбентов и чистоты выделяемого препарата, так и для исследования механизмов биоспецифического взаимодействия коллагена с фибронектином и другими биополимерами, имеющими сродство к коллагену, например коллагеназами. В этой связи можно отметить, что, в то время как сорбент «желатин-сефароза» (I) был малоэффективен для очистки животной коллагеназы [7], сорбент (VI) с иммобилизованным α1CB7-пептидом коллагена применялся [8] для очистки этого фермента.

Коллаген типа I, выделенный из кожи крыс [9], после предварительной денатурации разделяли на α-цепи и β-компоненты ионообменной хроматографией на целлюлозе СМ-52 (рис. 1), как это предложено в работе [5]. Чистоту полученных препаратов α-цепей и β-компонентов подтверждали данными электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Выход по белку полученных фрагментов молекулы коллагена составил ~80%.

Для получения α1CB7- и α1CB8-бромциановых пептидов коллагена использовали, как правило, фрагментацию промежуточной фракции ($\alpha 1 + \beta_{11}$; рис. 1) посредством бромистого цианa в 70% муравьиной кислоте в атмосфере азота [10]. Смесь бромциановых пептидов разделяли ионообменной хроматографией на целлюлозе СМ-52 в условиях, предложенных в работе [5]. Фракции, содержащие α1CB7- и α1CB8-пептиды, обессоливали и лиофилизовали. В ряде случаев для получения электрофоретически гомогенного препарата α1CB7-пептида применяли повторную хроматографию на СМ-целлюлозе или биогеле A-1,5m. Альтернативный биоспецифический подход к получению α1CB7-пептида описан в сообщении [11].

Полипептидные фрагменты молекулы коллагена были использованы для синтеза аффинных адсорбентов (II)—(VII) (см. таблицу). Активацию сефарозы бромистым цианом и иммобилизацию лигандов проводили по методике [12]. Количество иммобилизованных пептидов в полученных адсорбентах определяли по содержанию оксипролина [13] в гидролизованных 6 н. HCl аликвотах сорбентов.

Емкость синтезированных сорбентов (II)—(VII) по связыванию фиб-

Сравнительная характеристика адсорбентов, содержащих иммобилизованные фрагменты молекулы коллагена

Адсорбент	Лиганд	Содержание лиганда, мг/мл геля	Емкость по фибронектину		
			мг/мл геля	мг/мг лиганда	моль/моль лиганда
(II)	α1-Цепь	0,61	1,7	2,8	0,64
(III)	α2-Цепь	1,45	2,58	1,78	0,40
(IV)	β_{11}-Компонент	1,68	2,16	1,29	0,59
(V)	β_{12}-Компонент	1,37	1,5	1,1	0,50
(VI)	α1CB7-пептид	0,61	1,5	2,46	0,14
(VII)	α1CB8-пептид	0,86	0,12	0,14	0,0075
(I)	Желатин	0,59	0,77	1,3	–

ронектина (мг/мл геля или мг/мг иммобилизованного фрагмента) определяли методом аффинной хроматографии на небольших колонках в стандартных условиях [1] при насыщении адсорбента фибронектином (рис. 2). Как видно из таблицы, сорбенты с α-цепями и α1CB7-пептидом обладают более высокой емкостью в расчете на 1 мг иммобилизованного лиганда по сравнению с остальными адсорбентами. Сорбенты с β_{11}- и β_{12}-компонентами по эффективности были сравнимы с «желатин-сефарозой» (I), а сорбент с α1CB8-пептидом (VII), не содержащим участка связывания с фибронектином, оказался малоэффективным для выделения фибронектина.

Действительную эффективность того или иного лиганда отражает расчет мольного соотношения связавшегося фибронектина и иммобилизованного лиганда: на каждый моль иммобилизованных α-цепи или β-компонента приходится 0,4—0,6 моль связавшегося фибронектина (таблица). Известно, что β_{11}-компонент представляет собой две ковалентно связанные α1-цепи, а β_{12}-компонент — ковалентно связанные α1- и α2-цепи [14], т. е. молекулярная масса β_{11}- и β_{12}-фрагментов вдвое больше молекулярной массы индивидуальных α1-цепей, и, следовательно, в весовом отношении α-цепи — в 2 раза более эффективные лиганды для фибронектина, чем β-компоненты. Можно полагать, что при аффинной хроматографии фибронектина на иммобилизованных β-компонентах лишь один участок сильного связывания (из двух [6]) β-компонента участвует в биоспецифической адсорбции фибронектина. Что касается α1CB7-пептида, то на каждый моль этого лиганда приходится 0,14 моль связавшегося фибронектина. Снижение «молярной» емкости иммобилизованного α1CB7-пептида в 4—5 раз по сравнению с α-цепями может отражать бóльшую вероятность конформационных изменений пептида и экранирования в нем участков связывания с фибронектином, поэтому лишь каждая седьмая молекула иммобилизованного α1CB7-пептида связывает молекулу фибронектина при аффинной хроматографии. Тем не менее, если учесть, что молекулярная масса α1CB7-пептида с 4 раза меньше таковой α-цепей и, следовательно, на сорбенте (VI) содержится значительно больше молей иммобилизованного лиганда, чем на сорбентах (II)—(V) (таблица), становится понятным, почему сорбент (VI) — один из наиболее эффективных по «весовой» емкости (мг/мг иммобилизованного лиганда). И наконец, «молярная» емкость «α1CB8-сефарозы» (VII) была наименьшей: 1 моль лиганда связывал лишь 7,5 ммоль фибронектина или, другими словами, на ~130 моль иммобилизованного пептида приходится лишь 1 моль связавшегося фибронектина.

Последний факт представляет определенный интерес, поскольку в литературе имеются противоречивые данные о сродстве α 1CB8-пептида к фибронектину. Было показано, например, что как α1CB7-, так и α1CB8-пептиды ингибировали связывание ^{125}I-меченого коллагена с иммунопреципитатом фибронектин-антифибронектин при 4°C [15]. Ранее [16] отмечалось, что α1CB8-пептид так же, как и α1CB7-пептид, обратимо связывается с фибронектином, причем константа диссоциации обоих комп-

лексов была $\sim 2 \cdot 10^{-9}$ М. С другой стороны, показано [17], что α1CB8-, α1CB3- и α1CB6-пептиды не взаимодействуют с желатинсвязывающим доменом фибронектина, в то время как α1CB7-пептид биоспецифически связывался с этим доменом. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что сродство иммобилизованного α1CB8-пептида к фибронектину весьма незначительно. По-видимому, вопрос о механизме и степени биоспецифического сродства этого пептида к фибронектину требует дополнительного изучения.

Уникальные биологические свойства фибронектина [18—20] вызывают необходимость его тщательного биохимического и медицинского изучения, что, в свою очередь, требует наличия в достаточных количествах высокоочищенного препарата фибронектина. С точки зрения значимости полученных нами результатов для препаративного выделения фибронектина следует отметить перспективность использования адсорбентов с иммобилизованными фрагментами коллагена. Среди изученных адсорбентов оптимальными представляются сорбенты (II), (III) с индивидуальными α-цепями ввиду их большой емкости, относительной простоты получения по сравнению, например, с «α1CB7-сефарозой» (VI) и возможности выделения фибронектина в высокоочищенном состоянии (степень чистоты выделенного из плазмы крови человека фибронектина превышала 95%, т. е. была выше, чем для «желатин-сефарозы» (I) [1]).

Промышленная апробация и внедрение разработанного нами способа выделения фибронектина из плазмы крови человека аффинной хроматографией на иммобилизованных α-цепях коллагена проведены на базе Харьковского предприятия по производству бактерийных препаратов. С 1987 г. на этом предприятии начато производство высокоочищенного препарата фибронектина по разработанной нами технологической схеме.

Экспериментальная часть

В работе использовали сефарозу 4B, сефадекс G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). Фенилметилсульфонилфторид (PMSF), бромциан, додецилсульфат натрия, кумасси бриллиантовый голубой G-250 и целлюлоза CM-52 (Servacel) получены от фирмы Serva (ФРГ), а желатин — от фирмы Sigma (США).

Поглощение фракций в УФ-области определяли на спектрофотометре СФ-26. Концентрацию фибронектина во фракциях рассчитывали по поглощению при 280 нм ($A^{1\%}_{280} = 12{,}8$ [21]).

Анализ фракций при хроматографии осуществляли с помощью УФ-детектора Uvicord S11 при длине волны 230 нм (для коллагена и его фрагментов) и 280 нм (для фибронектина) и самописца 2210 (LKB, Швеция).

Электрофорез проводили на пластинках в 5% (для фибронектина) и 10% (для полипептидных фрагментов коллагена) полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [22]. Образцы предварительно нагревали 3 мин при 100° С в 0,06 М трис-HCl-буфере (pH 6,8), содержащем 2% додецилсульфата натрия, 3% меркаптоэтанола, 0,01% бромфенолового голубого и 6% глицерина. Гели окрашивали 0,25% кумасси бриллиантовым голубым G-250 в смеси метанол — уксусная кислота — вода (5 : 1 : 5) при 37° С в течение 1,5—2,0 ч. После окрашивания гели обесцвечивали в растворе метанол — уксусная кислота — вода (5 : 1 : : 5) при 37° С.

В работе использовали следующие буферные растворы: 0,06 М натрий-ацетатный буфер, pH 4,8 (А), 0,02 М натрий-цитратный буфер, pH 3,6 (Б), 0,05 М трис, 0,15 М хлорид натрия, 0,5 мМ PMSF, 0,02% азид натрия, pH 7,4 (В).

Коллаген типа I выделяли из кожи крыс по методике [9]. Количественное определение коллагена и его фрагментов осуществляли по содержанию оксипролина в образце препарата по методу [13].

Разделение коллагена на α-цепи и β-компоненты. Растворяли 140 мг лиофилизованного коллагена в 70 мл 0,5 М уксусной кислоты в течение

16 ч при 4° С. Раствор диализовали против буфера А в течение 16 ч при 4° С и затем нагревали 30 мин при 45° С. Полученный слегка мутный раствор фильтровали и вводили на колонку (2,5×25 см) с целлюлозой СМ-52, уравновешенной буфером А. Затем проводили элюирование градиентом NaCl (0→0,1 М, общий объем 800 мл) в буфере А при 42° С со скоростью потока 200 мл/ч. Кривая элюирования приведена на рис. 1. Соответствующие фракции диализовали против 0,1 М уксусной кислоты и лиофилизовали. Выход компонентов (мг): α1-цепь — 18,92, α2-цепь — 28,8, β_{11}-компонент — 16,16, β_{12}-компонент — 33,9, смесь α1-цепи и β_{11}-компонента — 14,5. Суммарный выход по белку 80,2%. Целлюлозу СМ-52 регенерировали промыванием 300 мл 0,5 М NaCl, содержащего 0,01 М NaOH, в течение 30 мин при 20° С, уравновешивали буфером А и использовали повторно.

Получение α1CB7- и α1CB8-бромциановых пептидов α1-цепи коллагена. Лиофилизованные α1-цепь, β_{11}-компонент или фракцию α1+β_{11} (рис. 1) (по 200 мг) растворяли в 40 мл 70% муравьиной кислоты и в атмосфере азота добавляли 0,5 г бромциана. Смесь инкубировали 4 ч при 37° С и затем вводили на колонку (1,8×60 см) с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 М уксусной кислотой. Скорость потока при обессоливании 10—12 мл/ч. Фракцию, выходящую с исключающимся объемом, лиофилизовали в 40 мл буфера Б и вводили на колонку (2,5×25 см) с целлюлозой СМ-52, уравновешенной буфером Б. Хроматографию проводили при 40° С со скоростью потока 180 мл/ч. Элюирование осуществляли линейным градиентом NaCl (0,04→0,14 М, общий объем 1600 мл) в буфере Б. Фракции, содержащие α1CB7- и α1CB8-пептиды [5], обессоливали на сефадексе G-25, как описано выше, и лиофилизовали. Выход указанных пептидов составил 9,3 и 11,4 мг соответственно. Фракции, содержащие другие бромциановые пептиды, далее не исследовались. Суммарный выход по белку 40%. Чистота α1CB7- и α1CB8-пептидов подтверждалась данными электрофореза.

Получение адсорбента «α1CB7-пептид-сефароза» (VI). Сефарозу 4B (5 мл упакованного объема) промывали 50 мл воды и затем 20 мл 5 М калий-фосфатного буфера, pH 12,0. Гель переносили в стакан, содержащий 5 мл того же буфера, и к полученной суспензии при перемешивании при 4° С добавляли раствор бромциана (из 1,5 г бромистого циана и 0,75 мл ацетонитрила с последующим разбавлением водой до 2,5 мл). Смесь энергично перемешивали 2—3 мин при 4° С и затем быстро промывали на пористом стеклянном фильтре 50 мл холодной воды и 50 мл холодного 0,1 М натрий-бикарбонатного буфера, pH 8,5, содержащего 0,15 М NaCl. Активированную сефарозу немедленно смешивали с раствором 9,3 мг α1CB7-пептида в 5 мл 0,1 М натрий-бикарбонатного буфера, pH 8,5, с 0,15 М NaCl. Суспензию перемешивали 16 ч при 4° С и затем промывали тем же буферным раствором. В заключение сорбент перемешивали 2 ч при 20° С с 5 мл 1 М этаноламина (pH 9, с помощью 6 н.HCl), промывали водой (50 мл) и по 10 мл попеременно 0,1 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,0, содержащего 0,5 М NaCl, и 0,1 М натрий-бикарбонатного буфера, pH 8,5, с 0,5 М NaCl (операцию повторяли 3 раза). Сорбент хранили в воде при 4° С в присутствии 0,02% азида натрия. Количество иммобилизованного α1CB7-пептида определяли по содержанию оксипролина в аликвоте гидролизованного 6 н. HCl сорбента [1].

Аналогично получали аффинные адсорбенты с α1, α2, β_{11}, β_{12} и α1CB8-фрагментами молекулы коллагена, а также с желатином, свойства которых приведены в таблице. При получении больших количеств аффинных адсорбентов для препаративного выделения фибронектина из плазмы крови человека использовали, как правило, метод активации сефарозы с переносом цианогруппы [23].

Аффинная хроматография фибронектина на адсорбенте «α1CB7-сефароза» (VI). Смесь 30 мл раствора плазмы крови человека (лиофилизованную плазму из 60 мл крови растворяли в 30 мл буфера В) и 5 мл (упакованный объем) адсорбента (VI) инкубировали 1 ч при 20° С. Затем адсорбент упаковывали в колонку (1,2×3 см), которую промывали буфером

В при скорости потока 30 мл/ч и 20° С до отсутствия поглощения при 280 нм в элюате (~20 мл), затем 15 мл буфера В, содержащего 1 М мочевину. Фибронектин элюировали 4 М мочевиной в буфере В в объеме 7–10 мл. В заключение колонку промывали буфером В с 8 М мочевиной (10 мл). Кривая элюирования представлена на рис. 2. Выход фибронектина составил 7,5 мг.

В аналогичных условиях проводили хроматографию фибронектина на других адсорбентах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Митина В. Х., Французова Н. А., Куценко Н. Г., Золотов Н. Н., Клящицкий Б. А.* // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 173–179.
2. *D'Ardenne A. J., McGee J. O'D.* // J. Pathol. 1984. V. 142. № 4. P. 235–251.
3. *Engvall E., Ruoslahti E.* // Int. J. Cancer. 1977. V. 20. № 1. P. 1–5.
4. *Зыкова Т. А., Златопольский А. Д., Мазуров В. И.* // Вопр. мед. химии. 1983. Т. 29. № 5. С. 114–118.
5. *Butler W. T., Piez K. A., Bornstein P.* // Biochemistry. 1967. V. 6. № 12. P. 3771–3780.
6. *Ingham K. C., Brew S. A., Isaacs B. S.* // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 10. P. 4624–4628.
7. *Werb Z., Reynolds J. J.* // Biochem. J. 1975. V. 151. № 1. P. 1–9.
8. *McCroskery P. A., Richards J. F., Harris E. D., Jr.* // Biochem. J. 1975. V. 152. № 1. P. 131–142.
9. *Piez K. A., Eigner E. A., Lewis M. S.* // Biochemistry. 1963. V. 2. № 1. P. 58–66.
10. *Black C., Douglas D. M., Tanzer M. L.* // J. Chromatogr. 1980. V. 190. № 2. P. 393–399.
11. *Митина В. Х., Французова Н. А., Клящицкий Б. А.* // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1474–1479.
12. *Клящицкий Б. А., Митина В. Х.* // Журн. общей химии. 1978. Т. 48. № 4. С. 913–919.
13. *Bergman J., Loxley A.* // Anal. Chem. 1963. V. 35. № 12. P. 1961–1965.
14. *Мазуров В. И.* Биохимия коллагеновых пептидов. М.: Медицина, 1974. С. 46–54.
15. *Mosher D. F.* // Progress in Hemostasis and Thrombosis. V. 5/Ed. Spaet T. H. N. Y.: Grune & Stratton, 1980. P. 111–151.
16. *Mosher D. F.* // Mol. Cell. Biochem. 1984. V. 58. № 1. P. 63–68.
17. *Bell M. L., Engvall E.* // Anal. Biochem. 1982. V. 123. № 2. P. 329–335.
18. *Vartio T.* // Med. Biol. 1983. V. 61. № 6. P. 283–295.
19. *Романенко А. М., Дранник Г. Н., Иена Ю. М.* // Эксп. онкология. 1987. Т. 9. № 4. С. 8–14.
20. *Schena F. P., Pertosa G.* // Nephron. 1988. V. 48. № 3. P. 177–182.
21. *Mossesson M. W., Chen A. B., Huseby R. M.* // Biochem. et biophys. acta. 1975. V. 386. № 2. P. 509–524.
22. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
23. *Kohn J., Wilchek M.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 1984. V. 9. № 3. P. 285–305.

Поступила в редакцию
19.IV.1989

ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOPOLYMERS BY THE BIOSPECIFIC AFFINITY CHROMATOGRAPHY. IX. PREPARATION, PROPERTIES AND APPLICATION OF AFFINITY ADSORBENTS WITH IMMOBILIZED POLYPEPTIDE FRAGMENTS OF COLLAGEN

MITINA V. Kh., FRANTSUZOVA N. A., KLYASHCHITSKY B. A., KRASNOPOLSKY Yu. M.*, SENNIKOV G. A.*, SHVETS V. I.**, ORECHOVICH V. N.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;

** Factory for Production of Bacterial Preparations, Kharkov;*

*** M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

Synthesis and properties of new affinity adsorbents with immobilized polypeptide fragments of collagen molecule (α-chains, β-components, cyanogen bromide peptides) were described. Adsorbents with α-chains and α1CB7-peptide had fibronectin binding capacity 1,5–2,0 times higher than commercial gelatin-Sepharose. Commercial production of highly purified fibronectin from human plasma using affinity chromatography on immobilized individual α-chains of collagen was developed.