



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 16 • № 6 • 1990

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.112.088.3 : 543.544

© 1990 г.

С. А. Лопатин, В. П. Варламов, В. А. Даванков

ЛИГАНДООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ И ФЕРМЕНТОВ

*Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова АН СССР,
Москва*

Обзор посвящен методу лигандообменной (металлоаффинной) хроматографии белков и ферментов. Метод основан на взаимодействии белков с хелатированными ионами металлов, т. е. на координационном взаимодействии, поэтому достигаемая в этом виде хроматографии специфичность принципиально отличается от специфичности в других видах аффинной хроматографии. Рассмотрены типы стационарных лигандов и исходных носителей, а также влияние различных параметров (ионов металлов, pH, концентрации соли, органических растворителей и дегтергентов) на хроматографическое поведение ферментов. Приведены сводные данные по выделению белков и ферментов методом лигандообменной хроматографии.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение
2. Сорбенты для лигандообменной хроматографии белков
 - 2.1. Типы стационарных лигандов
 - 2.2. Исходные носители
3. Хроматографическое поведение аминокислот, пептидов и белков
 - 3.1. Исследование центров взаимодействия белков с хелатными сорбентами
 - 3.2. Выбор иона металла
 - 3.3. Условия сорбции и десорбции в ЛОХ белков
 - 3.4. Влияние солей, органических растворителей, дегтергентов на процесс ЛОХ белков
 - 3.5. Практическое применение метода лигандообменной хроматографии
4. Другие области применения хелатных сорбентов
 - 4.1. Координационно-ионная иммобилизация ферментов
 - 4.2. Высокоэффективная лигандообменная хроматография белков
 - 4.3. Сэндвич-аффинная хроматография
 - 4.4. «Отрицательная сорбция»
 - 4.5. Изучение поверхностной топографии белковой глобулы
 - 4.6. Влияние ионов металлов в других видах хроматографии
5. Заключение

1. Введение

В связи с развитием молекулярной биологии, биотехнологии и биоорганической химии существенно возросла потребность в разнообразных высокочищенных ферментах. Это вызвало появление ряда принципиально новых методов очистки ферментов. К ним следует отнести аффинную (биоспецифическую) хроматографию, основанную на сродстве между иммобилизованным (стационарным) лигандом и комплементарным ему сорбатом, гидрофобную хроматографию, основанную на взаимодействии гидрофобных фрагментов сорбента с гидрофобными участками белков, хемоспецифическую хроматографию, использующую селективную ковалентную мо-

Сокращения: ЛОХ — лигандообменная хроматография, IDA — иминодиуксусная кислота, TED — три(карбоксиметил)этилендиамин.

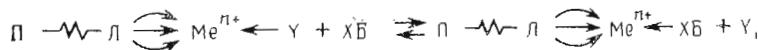
дификацию функциональных групп сорбата полимерным реагентом. Сравнительно новым хроматографическим методом, с развитием которого в значительной степени связаны успехи в выделении ряда высокоочищенных ферментов, является лигандообменная хроматография (ЛОХ), основанная преимущественно на координационных взаимодействиях.

Лигандом принято называть группу атомов, способных предоставлять на вакантные орбитали катиона металла пару электронов, в результате чего образуется координационная связь. Еще в 1954 г. была обнаружена способность ионов Cu(II) и Ag(I), находящихся в фазе катионообменника, координировать лиганды, в частности аммиак, с образованием аммиачных комплексов [1]. В 1961 г. Гельферихом [2] было изучено замещение молекул аммиака в таких сорбированных комплексах молекулами диаминов и впервые этот процесс был назван «лигандным обменом», впоследствии получившим развитие в методе ЛОХ [3—6]. В настоящее время предложено много разнообразных вариантов ЛОХ, в том числе и таких, когда процессы комплексообразования протекают исключительно в подвижной фазе хроматографической системы. Однако во всех вариантах мы непременно имеем в системе комплексообразующий катион металла. Поэтому в современной, более широкой интерпретации под ЛОХ понимают «такие хроматографические процессы разделения склонных к комплексообразованию органических соединений, в которых ответственным за разделение является координация этих соединений с присутствующими в системе катионами металла» [6].

Впервые метод ЛОХ для разделения белков применил Порат с сотр. [7]. Ими были синтезированы хелатные сорбенты на основе агарозы с хелатными группировками иминодиуксусной кислоты, заряженные ионами Cu(II) и Zn(II).

Метод ЛОХ белков иллюстрируется схемой 1.

Схема 1



где П — полимерный носитель, Л — хелатообразующий стационарный лиганд, Me^{n+} — ион металла, Y — обмениваемый подвижный лиганд, XB — белок с электронодонорной координирующей группировкой X.

2. Сорбенты для лигандообменной хроматографии белков

2.1. Типы стационарных лигандов

В качестве стационарного хелатообразующего лиганда могут выступать любые группировки сорбента, прочно удерживающие ионы переходных металлов, но оставляющие у них свободными часть вакансий в их координационной сфере: аминокислоты, амины и т. п. К числу наиболее распространенных лигандов относится иминодиуксусная кислота (IDA), образующая с ионами металлов прочные хелатные комплексы в соотношении 1 : 1, причем энергия связывания катионов в данном случае составляет 15—25 вместо 2—3 ккал/моль, характерных для электростатических связей в фазе обычных катионитов [8]. В комплексе иона металла с остатком IDA образуются два пятичленных хелатных кольца, что обуславливает особую прочность такого бис-хелата. В то же время у иммобилизованного иона металла с координационным числом 6 остаются три свободные вакансии в координационной сфере, доступные для взаимодействия с подвижными лигандами, в том числе с объемными белковыми молекулами (рис. 1а, б).

Способ получения IDA-сорбентов (III) для ЛОХ белков предложен Поратом с сотр. [7] и заключается в присоединении IDA (II) через иминогруппу к эпоксиактивированной агарозе (I) в водной среде при щелочных pH (схема 2).

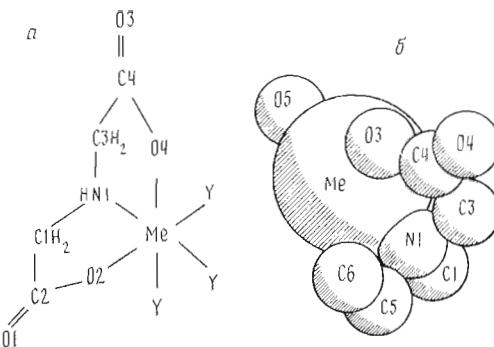
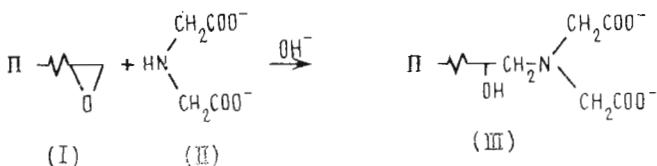
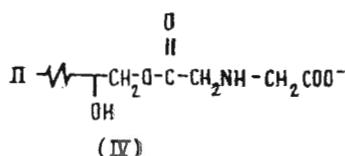


Рис. 1. Комплекс Me-IDA: *а* — схематическое изображение, *у* — обмениваемый лиганд; *б* — модель комплекса [9]

Схема 2

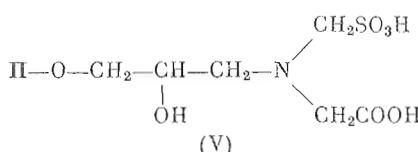


Однако при этом протекает побочная реакция присоединения IDA через карбоксильную группу, приводящая к образованию более слабого хелата (IV).



Количество таких слабых хелатов составляет 15—20% от общего числа присоединенных молекул IDA [10]; они слабо удерживают ионы металлов в буферных растворах, применяемых в ЛОХ белков, в результате чего на сорбенте остаются свободные заряженные группы.

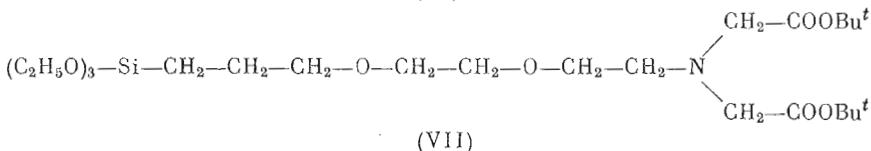
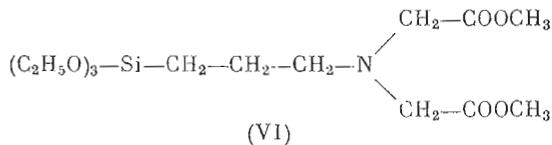
В работе [11] описан синтез IDA-сифадекса, который проводили следующим образом: сифадекс, активированный эпихлоргидрином, обрабатывали водным аммиаком и полученные аминогруппы далее алкилировали бромуксусной кислотой. Как было показано ранее [12], при таком непрямом способе синтеза на сорбенте также остаются свободные ионогенные группы, реакция идет неполно и координационная емкость сорбента по ионам меди снижается на 35—40%. Кроме того, показано, что при обработке бромуксусной кислотой модифицируются и гидроксильные группы исходной матрицы, что приводит к увеличению неспецифической сорбции ионов металлов примерно еще на 10%. Авторы работы [11] делают вывод о предпочтительности одностайдиного синтеза IDA-сорбентов. В этом сообщении описан также синтез смешанного карбоксил-сульфо-хелатного геля (V).



Эпоксисифадекс обрабатывается аминометансульфокислотой и затем алкилируется бромуксусной кислотой. По сравнению с IDA-сифадексом типа (III) сорбент (V) имеет вдвое меньшую емкость по ионам меди и слаб-

бее их удерживает. Непосредственно для ЛОХ белков такой сорбент не использовался.

Для синтеза IDA-силикагелей со стационарным лигандом, присоединенным одностадийным методом, используется следующий подход: исходный носитель модифицируется триэтоксисилильными производными метилового (VI) [13] или *трет*-бутилового (VII) [14] эфиров IDA с разной удаленностью группировок IDA от атома кремния.



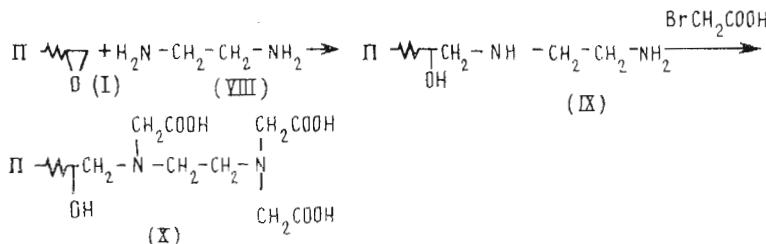
Недостатками такого подхода являются сложность синтеза этих производных (3–4 стадии) и то обстоятельство, что последующий кислотный гидролиз метиловых эфиров (1 M HCl, 100° С, 60 ч) приводит также к отщеплению до 35% привитых группировок IDA.

Более общий и простой способ получения монофункциональных IDA-сорбентов описан в работах [15, 16]. Присоединение диэтилового или диметилового эфира IDA к эпоксиактивированным носителям проводилось в безводной среде в присутствии соответствующего алкоголята натрия с последующим омылением сложноэфирных групп водными растворами солей меди. По этому методу можно получать сорбенты на основе носителей различной природы (кремнеземы, синтетические полимеры, природные полисахариды).

Сорбент с группировками IDA впервые был использован для фракционирования белков сыворотки крови человека в tandemном варианте: сначала сыворотку наносили на колонку с IDA-агарозой, заряженную ионами Zn(II), а затем на аналогичную колонку в Cu(II)-форме [7]. Было показано, что на Zn(II)-колонке сорбируются трансферрин, α_1 -антитрипсин, кислый гликопротеин, церулоцитин, α_2 -макроглобулин и γ -глобулины, а на Cu(II)-колонке — альбумин, преальбумин, трансферрин, β -липо-протеин и γ -глобулины. Хотя полного разделения компонентов достичь не удалось, тем не менее сложная смесь подверглась селективному фракционированию. В ходе хроматографии ни один из компонентов не денатурировал. Ионы металлов не детектировались в элюатах до тех пор, пока в качестве элюента не применили раствор EDTA. Хелатный гель сохранял свою способность связывать белки даже в 1 M NaCl, что исключало возможность обычной ионной сорбции.

Позднее Порат с сотр. применили в качестве стационарного хелата трис(карбоксиметил)этилендиаминные группировки (TED) [17]. Сорбент получают по схеме 3.

Схема 3



Сорбент (X) с такими группировками должен более прочно связывать ионы металлов и обладать большей селективностью, чем IDA-гель. Иммобилизованный шестикоординационный ион металла имеет здесь единст-

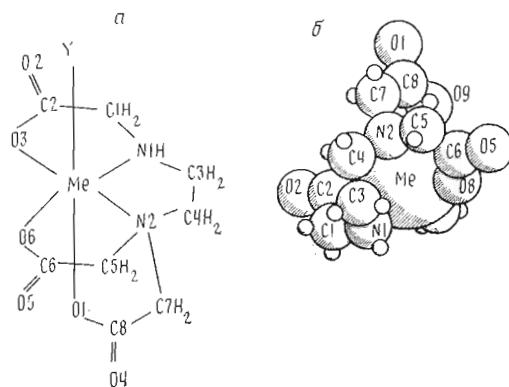
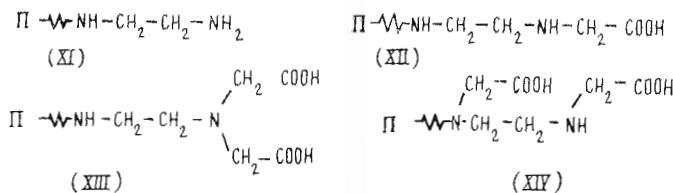


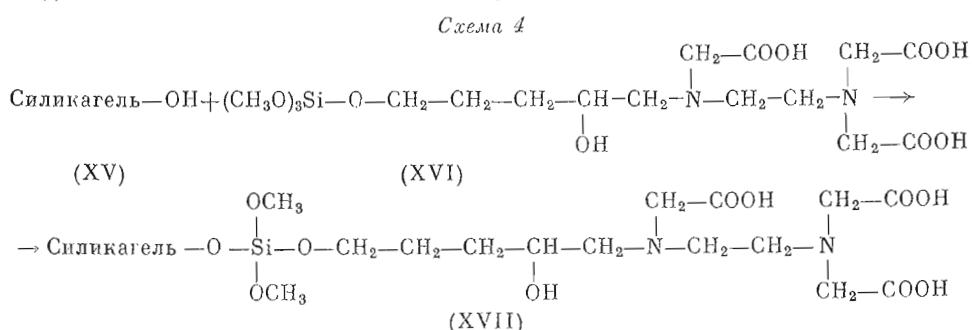
Рис. 2. Комплекс Me-TED: *a* — схематическое изображение, *y* — обмениваемый лиганд; *б* — модель комплекса [9]

венную свободную вакансию в своей координационной сфере [17, 18], однако, как видно из рис. 2 a , *б*, должен предъявлять более жесткие стерические требования к сорбируемым объемным белковым молекулам. Кроме того, при таком двухстадийном синтезе стационарного лиганда на сорбенте должен получаться набор различных хелатирующих группировок (XI—XIV), включая остатки этилендиамина,mono- и ди(карбоксиметил)- этилендиаминов, что не может не снижать селективность сорбента.



Гетерофункциональность такого сорбента подтверждается тем фактом, что TED-гель в Ni(II)-форме после промывки 1 М глицином теряет 35% ионов никеля [17]. В другой работе Порат и Хемдан [11] показали, что при алкилировании бромуксусной кислотой частично модифицируется и агарозная матрица, что также приводит к увеличению неспецифической сорбции.

Способ получения монофункционального сорбента со стационарным лигандом TED описывается схемой 4 [9].



Недостатком этого метода является сложность получения исходного модификатора (XVI). Кроме того, этот способ пригоден только для носителей на основе кремнеземов.

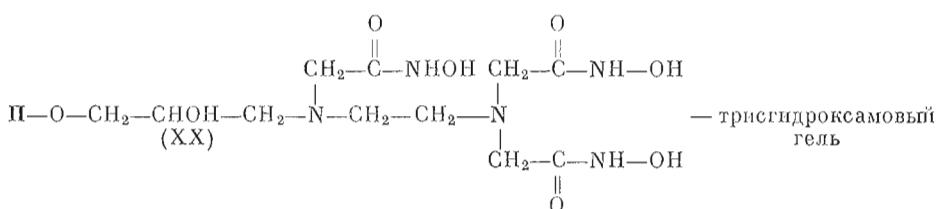
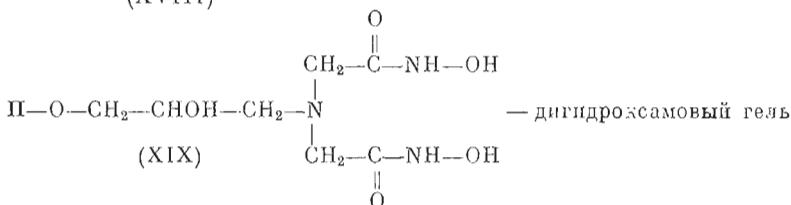
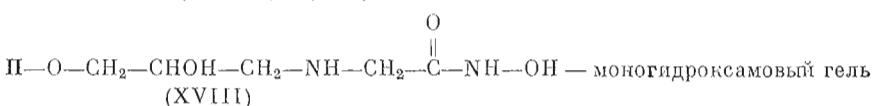
EDTA-сорбенты на основе носителей различной природы можно получать и без использования конденсирующих агентов, присоединяя диангидрид EDTA к аминосодержащим носителям [19]. В этой работе исследована возможность использования образующихся сорбентов, а также

TED-агарозы типа (X), полученной по методу Пората [17], для ЛОХ белков. Сорбенты были заряжены ионами Cu(II), Ni(II), Ti(III).

Для получения монофункциональных EDTA-сорбентов используется способность EDTA образовывать с Co(III) пятикоординационный комплекс, в котором одна карбоксильная группа остается свободной [20]. С помощью конденсирующих агентов такой Co(III)-EDTA-комплекс был присоединен к аминосодержащим носителям [21].

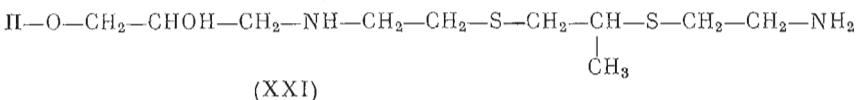
Известен способ получения хелатного сорбента путем присоединения EDTA к аминосодержащему носителю с использованием N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина в качестве конденсирующего агента [22]. Однако при таком способе синтеза не исключается присоединение молекул EDTA на несколько карбоксильных групп.

В качестве сорбентов, прочно удерживающих ионы металлов, Рамадан и Порат [23] предложили сорбенты с группировками аминоацилгидроксамовых кислот (XVIII)–(XX).



Для работы с белками авторы [24, 25] использовали моногидроксамовый гель (XVIII) в Fe(III)-форме. В отличие от Cu(II)- и Ni(II)-IDA-сорбентов Fe(III)-гидроксамовый гель связывает белки лишь при низкой ионной силе, поэтому элюцию проводят обычно в градиенте концентрации NaCl (0–0,5 M). Наоборот, при изменении pH белки не элюировались. Такой характер сорбции–десорбции присущ ионообменной хроматографии. Авторы провели сравнение удерживания цитохрома моногидроксамовым гелем в Fe(III)-форме и без иона металла при различных значениях pH. При pH 9,0 белок сильнее удерживается сорбентом без ионов металла, а при pH 5,8 картина изменяется на обратную. Таким образом, роль ионов металла очевидна, но механизм сорбции белков окончательно не выяснен. Возможно, что в сорбенте с ионами Fe(III) изменяются свойства геля как катионообменника за счет перераспределения электронной плотности на стационарном лиганде. Такой эффект, например, показан для TED-геля в случае зарядки его ионами Fe(III) [26].

Еще один сорбент для разделения белков описан в работе [27]. Очистку трипсиноподобного фермента из протеолитического комплекса *Acremonium specium* авторы проводили на сепароне с группировками 1,8-диамино-4-метил-3,6-дитиооктана (XXI)



При низкой ионной силе фермент имеет сродство к сорбенту (XXI) как в свободном виде, так и в случае зарядки его ионами Zn(II), Ni(II) или Cu(II); белок элюируется при добавлении NaCl (0–0,25 M). Степень очист-

ки фермента зависит от типа ионов металлов и лучший результат (увеличение удельной активности в 10,6 раз) достигается на сорбенте в Cu(II)-форме. При использовании незаряженного сорбента, а также сорбентов в Zn(II)- и Ni(II)-формах степень очистки не превышала 3. Исходя из поведения трипсиноподобного фермента и строения стационарного лиганда, можно предположить значительный вклад электростатических взаимодействий между сорбентом и выделяемым ферментом. В этой же работе были также опробованы сорбенты на основе сепарона с остатками иминодиуксусной и аспарагиновой кислот. Фермент не проявлял сродства к таким сорбентам ни до, ни после зарядки их ионами металлов.

2.2. Исходные носители

Требования, предъявляемые к исходным носителям, используемым в ЛОХ ферментов, аналогичны требованиям к сорбентам, используемым в аффинной хроматографии:

- 1) нерастворимость,
- 2) достаточная проницаемость и развитая поверхность,
- 3) минимальная неспецифическая сорбция белков и ионов металлов,
- 4) химическая и микробиологическая устойчивость,
- 5) гидрофильтность.

В качестве полимерного носителя преимущественно применяется гель на основе агарозы, хотя в последнее время начали использоваться кремнеземные сорбенты и органические полимеры сепарон и ТСК-гель Тоуорейл.

3. Хроматографическое поведение аминокислот, пептидов и белков

3.1. Исследование центров взаимодействия белков с хелатными сорбентами

Для успешного развития ЛОХ белков необходимо изучение механизма сорбции, т. е. установление тех аминокислотных остатков, которые координируются с хелатированными ионами металлов. В случае низкомолекулярных соединений комплексообразующий ион металла способен связывать вполне определенное число доноров, поэтому лигандный обмен — процесс стехиометрический. Закономерности процесса образования комплексов, когда в качестве одного из лигандов выступают объемные и сложные белковые молекулы, еще недостаточно исследованы. Ионы металлов, вероятно, образуют координационные связи в первую очередь с имидазольной группой гистидина и сульфидильной группой цистеина. Это взаимодействие происходит в области нейтральных pH (6—8), а при понижении pH существенно ослабляется. В процессе комплексообразования могут также участвовать индолиновая группа триптофана, гидроксильная группа серина, карбоксильная группа, аминогруппа [7].

Удерживание 19 аминокислот при низкой ионной силе исследовано в работе [28]. На Cu(II)-IDA-силикахеле при pH 5 только гистидин имеет значительное сродство к сорбенту ($V_e/V_t^* = 42$), а при pH 6 — также и цистеин ($V_e/V_t = 39$), причем гистидин при pH 6 прочно сорбируется и уже не элюируется. В случае зарядки сорбента ионами Ni(II), Zn(II), Fe(II) или Fe(III) при той же ионной силе и тех же значениях pH значительного удерживания ни одной из аминокислот не наблюдается ($V_e/V_t < < 5$).

Однако при pH 7 и низкой ионной силе на Ni(II)-IDA-агарозе уже значительно удерживаются гистидин, цистеин и цистин ($V_e/V_t > 20$), а при добавлении в буфер 4 М NaCl — также фенилаланин, триптофан и тирозин [29]. Сорбция ароматических аминокислот в этих условиях объясняется увеличением гидрофобных взаимодействий. При повышении pH до 8 и 9 возрастает удерживание всех аминокислот.

* V_e — объем колонки, V_t — объем элюции.

Из приведенных данных следует, что наибольшим сродством к хелатным сорбентам обладают гистидин и цистеин, однако эти результаты не могут быть непосредственно перенесены на механизм сорбции белков, так как свободные амино- и карбоксильная группы аминокислот вносят свой вклад в процесс образования координационных соединений.

Исследование удерживания на хелатных сорбентах различных пептидов позволяет лучше понять механизм сорбции белков. Так, в работе [30] приведены данные о взаимодействии ряда ди- и олигопептидов с Ni(II)-IDA-агарозой. В буфере с низкой ионной силой наибольшее сродство к сорбенту имели Asp-His ($V_e/V_t = 13$) и Trp-Trp ($V_e/V_t = 11,8$). Удерживание дипептида Asp-His слабее, чем свободного гистидина, что подтверждает участие аминогруппы гистидина в процессе комплексообразования. В том же буфере с 4 М NaCl резко возрастает удерживание данных дипептидов ($V_e/V_t > 50$), а также Тир-Тир ($V_e/V_t = 30$). Удерживание пептидов, не содержащих гистидин и ароматические аминокислоты, не зависит от ионной силы буфера. Хроматография пептидов при различных значениях pH (7,0; 7,5; 8,0), но при одинаковой ионной силе буферов показывает увеличение удерживания всех пептидов с повышением pH ((V_e/V_t) pH 7,0/ (V_e/V_t) pH 8,0 ≤ 3). Из исследованных пептидов ни один не сорбировался на Ni(II)-IDA-агарозе.

В работе [31] изучено хроматографическое поведение 21 гистидинсодержащего дипептида, 20 лизинсодержащих ди- и олигопептидов и 7 аспарагинсодержащих дипептидов на IDA-севадексе, заряженном ионами Fe(III), Co(II), Zn(II), Ni(II) и Cu(II). По мнению авторов, пептиды с высоким сродством к иммобилизованным ионам металлов могут быть химически или ферментативно присоединены к N-концевым аминокислотным остаткам белков для последующего выделения этих белков методом ЛОХ. Из исследованных пептидов прочная сорбция наблюдалась только на Cu(II)-IDA-севадексе у гистидинсодержащих дипептидов. На Ni(II)-IDA-севадексе сорбировались только те пептиды, в которых гистидин является N-концевым остатком. Аналогичный сорбент на основе агарозы был успешно применен для очистки рекомбинантного проинсулина от рекомбинантного белка, содержащего в N-концевой части дополнительно дипептид His-Trp [32]. Принцип разделения сначала был продемонстрирован на примере рилизинг-фактора лютенизирующего гормона (LHRH), представляющего собой декапептид следующего строения: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂. Природный декапептид, который содержит на N-конце остаток пироглутаминовой кислоты, не связывается с хелатированным Ni(II). Отщепление концевого пироглутаминового остатка резко повышает сродство пептида, несущего теперь на N-конце последовательность His-Trp, к хелатированным ионам Ni(II); десорбция ионапептида осуществляется при понижении pH до 4,5. Отщепление дипептида His-Trp приводит к тому, что гептапептид не удерживается на хелатной колонке и выходит при элюции в свободном объеме. В случае же октапептида с N-концевым остатком триптофана наблюдается только слабое удерживание. Таким образом, введение в состав рекомбинантных белков дипептида His-Trp позволяет в дальнейшем селективно выделять такие белки на Ni-IDA-агарозе (рис. 3).

Базовая роль остатков гистидина в образовании прочных координационных связей с иммобилизованными ионами металлов показана при изучении сорбции панкреатической РНКазы А быка [33]. Этот фермент состоит из 124 остатков аминокислот и имеет 4 остатка гистидина (12, 48, 105 и 119). Известно, что His-42 и His-119 сближены и находятся в активном центре фермента. На поверхности белковой глобулы находится также His-105. РНКаза сорбируется на Ni(II)-IDA- и Cu(II)-IDA-гелях при pH 7,0 и может быть элюирована при pH 6,0 и 4,3 соответственно. Фермент не сорбируется на Zn(II)- и Co(II)-IDA-колонках. При обработке РНКазы субтилизином происходит разрыв белковой цепи между 20-м и 21-м аминокислотными остатками. Такой фермент называется РНКазой S. При удалении короткого пептида (S-пептид) остается S-белок, причем в этом белке His-48 оказывается поверхностным и также способен образо-

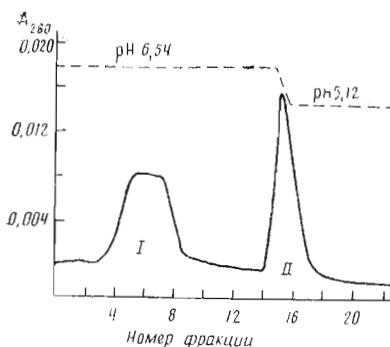


Рис. 3

Рис. 3. Хроматографическое разделение 200 мкг His-Trp-протеинсулина (пик II) и протеинсулина (пик I) на Ni(II)-IDA-агарозе. Колонка (1 × 10 см) уравновешена 0,1 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,1 М NaCl и 7 М мочевину, pH 7,5. Элюция ступенчатым градиентом 0,1 М натрий-acetатного буфера, содержащего 0,1 М NaCl и 7 М мочевину. Объем фракций 2 мл [32]

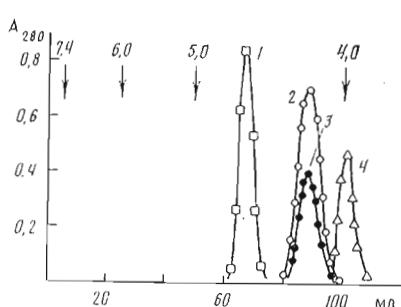


Рис. 4

Рис. 4. Хроматография РНКазы A (2) и продуктов ее протеолиза — РНКазы S (3), S-белка (4) и S-пептида (1) на Cu(II)-IDA-агарозе. Цифры над стрелками указывают значение pH элюирующих буферных растворов [33]

вывать координационную связь с ионом металла. Сродство РНКазы A и продуктов ее протеолиза к Cu(II)-IDA-агарозе показано на рис. 4. Поскольку S-пептид содержит один остаток His-12 и не содержит остатков цистеина, можно сделать вывод, что для сорбции на Cu(II)-IDA-геле достаточно уже одного поверхностного остатка гистидина в молекуле белка S-пептида. Многоточечное взаимодействие с Cu(II)-IDA-гелем соответствующих белковых препаратов (два и более остатков гистидина) приводит к усилению удерживания. Остается невыясненным, однако, вопрос: с одним или несколькими ионами металла образуют координационные связи остатки гистидина при многоточечном связывании?

Исследованию хроматографического поведения этих же объектов посвящена работа [34], где описаны результаты разделения смеси РНКазы A и продуктов ее протеолиза методом высокоеффективной ЛОХ на хелатном TSK-геле 5PW, заряженном ионами Zn(II), Ni(II) и Cu(II). Сорбцию белков авторы проводили в буфере, содержащем 1 mM имидазол. В целом характер взаимодействия с TSK-хелатом был аналогичен описанному для Cu(II)-IDA-агарозы. Тем не менее оказалось, что добавка имидазола препятствует сорбции S-пептида на Cu(II)-IDA-сорбенте и РНКазы A на Ni(II)-IDA-сорбенте, однако S-белок, в этих условиях удерживается даже сорбентом в Zn(II)-форме (рис. 5). Поскольку наличие имидазола не препятствует связыванию РНКазы A и S-белка с хелатированными ионами меди, можно предположить, что в этом случае сорбция обеспечивается двумя (или более) остатками гистидина.

Интересные результаты получены при ЛОХ карбоксипептидазы A [35]. Этот металлофермент содержит в активном центре один ион цинка, который образует координационные связи с двумя остатками гистидина (69 и 196). Четыре остатка гистидина (13, 29, 120 и 303) находятся на поверхности молекулы белка, а еще два (166, 186), так же как два остатка цистеина, образующих дисульфидный мостик (остатки 138—161), находятся внутри белковой глобулы. Обработкой фенантролином в мягких условиях из карбоксипептидазы A можно удалить ион Zn(II) и получить апокарбоксипептидазу A, имеющую 3—4% исходной активности, причем этот процесс обратим и активность восстанавливается при добавлении ионов цинка или других двухвалентных катионов металлов, например никеля или кобальта.

Обе формы фермента не имеют сродства к TED-сорбенту в Cu(II)-, Ni(II)- и Co(II)-формах, а также к TED-сорбенту, не заряженному ионами металлов. Карбоксипептидаза A не имеет сродства к IDA-сорбенту в Zn(II)-, Ni(II)- и Co(II)-формах, а также к IDA-сорбенту, не заряженному

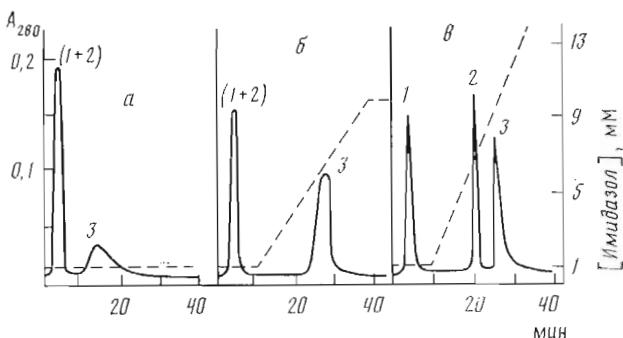


Рис. 5. Хроматография S-пептида (1), РНКазы А (2) и S-белка (3) на IDA-TSK-геле 5PW, заряженном ионами Zn (а), Ni (б) и Cu (в). Колонка ($7,5 \times 75$ мм) уравновешена 0,02 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl и 1 мМ хлоргидрат имидазола, pH 7,0. Пунктиром показана концентрация имидазола при элюции в том же буфере. На колонку нанесено 150 мкл (1,5 мг) смеси белков в стартовом буфере. Скорость элюции 1 мл/мин [34]

ионами металлов, но обе формы фермента сорбируются на Cu(II)-IDA-геле, причем элюируются с сохранением исходных активностей. При нанесении апокарбоксипептидазы А на Zn(II)- и Co(II)-IDA-гели, а также на Zn(II)-TED-гель она захватывает ионы металлов и поэтому выходит, не сорбируясь. Апокарбоксипептидаза А сорбируется на IDA-геле в Ni(II)-форме, однако при элюции также захватывает ионы металла. При захвате ионов цинка активность фермента восстанавливается полностью, а в случае ионов никеля и кобальта достигает соответственно 47 и 43% от активности карбоксипептидазы А. При нанесении карбоксипептидазы А на TED-сорбент, не заряженный ионами металлов, фермент инактивируется из-за потери ионов цинка. По мнению авторов, это наиболее удобный способ получения апокарбоксипептидазы А.

Подтверждение доминирующей роли остатков гистидина в образовании сорбционных комплексов было получено при изучении хроматографического поведения РНКазы *Bacillus intermedius* 7Р на IDA-сорбенте [36]. Этот фермент ($M \sim 12,2$ кДа) представляет собой компактную белковую глобуллу с единственным остатком His-101, расположенным на поверхности; к тому же белок не содержит остатков цистеина и метионина [37]. Оказалось, что данный фермент сорбируется только на иммобилизованных ионах меди, а удерживание на Ni(II)- и Zn(II)-IDA-сорбентах незначительно.

Бактериальная эндонуклеаза *Serratia marcescens* также проявляет сродство только к хелатированным ионам меди [38], хотя этот фермент с $M \sim 30$ кДа и содержит шесть остатков гистидина и три остатка цистеина [39]. Можно предположить, что в данном случае отсутствие сродства к Zn(II)- и Ni(II)-хелатам объясняется отсутствием на поверхности белковой глобулы сближенных остатков гистидина.

В этом плане характерно иное хроматографическое поведение гуанилспецифичной РНКазы C₂ *Aspergillus clavatus* [36]. Этот фермент ($M \sim 11,2$ кДа) имеет три остатка гистидина (9, 40, 92), два из которых (40 и 92) сближены на поверхности белковой глобулы [40]. Четыре остатка цистеина, имеющиеся в составе РНКазы C₂, образуют два дисульфидных мостика и не участвуют в процессе комплексообразования. Этот фермент сорбируется не только на Cu(II)-, но и на Zn(II)- и Ni(II)-формах IDA-геля. В двух последних случаях десорбция происходит при pH 5,0, тогда как для Cu(II)-IDA-сорбента требуются более низкие значения pH (4,0—4,2). Отсюда можно предположить, что сближенные остатки гистидина обеспечивают сродство к Zn(II)- и Ni(II)-хелатам и что сорбция на хелатированных ионах меди осуществляется в данном случае также за счет двухточечного контакта, так как фермент с одним остатком гистидина, например РНКаза *B. intermedius*, элюируется с того же сорбента уже при pH 5,0 [36].

Из приведенных данных следует, что взаимодействие белка с Zn(II)-, Ni(II)- и Co(II)-IDA-гелями требует одновременно координации двух сближенных остатков гистидина с одним иммобилизованным ионом металла. В случае Cu(II)-IDA-геля сорбция осуществляется за счет любых поверхностных остатков гистидина.

Очевидно, что два сближенных остатка гистидина (His-413, His-116) обеспечивают сорбцию миоглобина и гемоглобина $\alpha_2\beta_2$, имеющего в β -субъединице His-143 и His-146, на Zn(II)-IDA-геле [33]. Еще более благоприятное расположение двух остатков гистидина (из пяти) у фибробластного интерферона человека (HuIFN- β) [33, 41]: остатки His-93 и His-97 разделены одним шагом α -спирали, и оба имидазольных остатка ориентированы одинаково. Вследствие этого HuIFN- β сорбируется на Cu(II)-, Zn(II)-, Ni(II)- и Co(II)-гелях. В отличие от фибробластного лейкоцитарный интерферон человека (HuIFN- α) содержит только три остатка гистидина (7, 34, 58), которые удалены друг от друга, и, следовательно, он сорбируется только на Cu(II)-IDA-геле [41, 42].

В работе [43] показано, что иммунный интерферон человека (HuIFN- γ) имеет сродство только к иммобилизованным ионам меди и никеля (аналогично панкреатической РНКазе А [33]). Хотя положение остатков гистидина в HuIFN- γ не указано, можно предположить, что двухточечный контакт осуществляется с одним ионом металла, так как сорбция на Cu(II)-IDA-геле, как и в случае HuIFN- β [41], столь сильна, что провести элюцию с сохранением активности интерферона не удается.

Еще одним примером сорбции через двухточечный контакт с одним ионом металла служит поведение микрококковой нуклеазы, которая имеет два сближенных остатка гистидина (121, 124) и сорбируется на Ni(II)-IDA-геле [41].

Против возможности сорбции за счет одновременной координации с несколькими ионами металла говорит тот факт, что сывороточный альбумин человека, содержащий 16 остатков гистидина, которые все удалены друг от друга, не имеет сродства к Zn(II)- и Co(II)-IDA-гелям [33].

Нейтральная α -D-маннозидаза мозга сорбируется IDA-гелем, заряженным ионами Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Cd(II) и Fe(II), причем в случае ионов меди, никеля и цинка сродство столь велико, что элюцию удается провести только добавлением EDTA в элюирующий буфер [44]. К сожалению, неизвестно, за счет каких аминокислотных остатков происходит такое сильное связывание, так как в работе отсутствуют данные о структуре этого фермента.

Относительно роли остатков триптофана в процессе ЛОХ белков имеются только косвенные данные. Так, у яичного куриного лизоцима единственный остаток гистидина (15), однако обладает сильным сродством к Cu(II)-IDA-гелю. Некоторое сродство к такому сорбенту проявляет и утиный лизоцим, который не содержит остатков гистидина. По мнению автора [33], в обоих случаях проявляется эффект взаимодействия остатка(ов) триптофана с иммобилизованными ионами меди. Другой пример, приведенный в этой работе, — авидин. Каждая его субъединица содержит единственный остаток гистидина (50) и четыре остатка триптофана (10, 70, 97, 110). Авидин имеет сродство к Cu(II)-IDA-гелю даже большее, чем куриный лизоцим, что, по мнению автора, объясняется вкладом остатков триптофана. Правда, авидин состоит из четырех субъединиц, и его прочное удерживание на хелатном сорбенте можно также объяснить за счет роли только четырех гистидиновых остатков.

Роль остатков цистеина в ЛОХ белков пока не показана, так как в большинстве случаев эти остатки образуют дисульфидные мостики и находятся внутри белковых глобул. Значение этих остатков может быть исследовано на подходящих моделях, например, металлотионинах [33].

Недавно было показано, что белки могут сорбироваться на хелатных гелях за счет фосфорилированных остатков гидроксилсодержащих аминокислот [45]. Оказалось, что фосфосерин, фосфотиозин и фосфотреонин значительно удерживаются на Fe(III)-IDA-сорбенте при pH 3,1 ($V_e/V_t = 30$) и 5,0 ($V_e/V_t = 15$), но не сорбируются при pH 7,2 и 8,5. Нефосфо-

рилированные гидроксиламинокислоты не имеют сродства к такому сорбенту. Для подтверждения координационного характера взаимодействия фосфоаминокислот с хелатным сорбентом использовались буферные растворы с высокой солевой концентрацией (1 M NaCl или $0,5\text{ M K}_2\text{SO}_4$) и изучалась возможность проведения элюции пепсина добавлением в буфер фосфатных ионов. Пепсин состоит из 304 остатков аминокислот, один из которых (Ser-30) является фосфорилированным. Препарат был нанесен на Fe(III)-IDA-сорбент при pH 5,0, и после промывки колонки, пепсин был элюирован тем же буфером, содержащим 20 mM фосфат. Выход по активности составил более 95 %.

Возможность фракционирования фосфорилированных белков показана также на примере яичного альбумина. Этот белок, содержащий два остатка фосфосерина, был обработан щелочной фосфатазой. Полученная смесь состояла из белков, содержащих одну или две фосфогруппы, а также полностью дефосфорилированный белок. Сорбцию на IDA-агарозе, заряженной ионами Fe(III), проводили при pH 5,0. Дефосфорилированный овальбумин при этом не сорбировался, а оставшиеся два компонента были разделены в градиенте pH от 5,7 до 7,2. Кроме ионов Fe(III) в работе были проверены ионы Co(II), Ni(II), Zn(II), Ce(III), Cr(III), La(III), Lu(III), Sc(III), Tl(III), Yb(III), Th(IV) и $\text{UO}_2^{(II)}$. Из них только лютейций, скандий и торий значительно удерживают фосфосерин (но не серин), а следовательно, и яичный альбумин. Следует отметить, что фосфоаминокислоты Fe(III)-TED-сорбентом не удерживаются.

Фракционированию фосфорилированных белков посвящена также работа [46]. В фосфовитине яичного желтка более половины аминокислотных остатков приходится на фосфосерин, поэтому такой объект очень удобен для демонстрации возможностей метода лигандообменной хроматографии на Fe(III)-IDA-сорбенте. После обработки фосфовитина щелочной фосфатазой он был нанесен на колонку с хелатным сорбентом. Элюцию проводили ступенчатым градиентом pH. Полученные фракции анализировали на содержание фосфогрупп в белке. При pH 8,9 элюировался фосфовитин, содержащий 33 остатка фосфосерина, а при pH 8,0 и 6,0 элюировались белки, содержащие соответственно 8 и 5 фосфорилированных остатков.

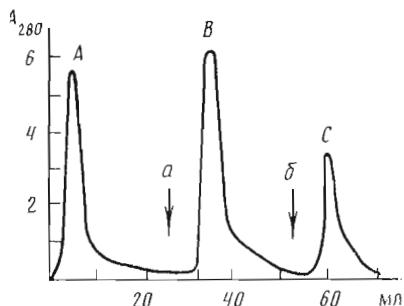
3.2. Выбор иона металла

Основным условием любого из видов лигандообменной хроматографии является обратимость процесса комплексообразования и высокая скорость обмена лигандами. Координационные связи между разделяемыми лигандами и комплексообразующим ионом металла должны легко образовываться и разрушаться вновь, т. е. комплексы должны быть кинетически лабильными. Этому требованию удовлетворяют в первую очередь комплексы ионов переходных металлов, причем по прочности образуемых комплексов с IDA двухвалентные ионы располагаются в ряде: $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Co} > \text{Hg} > \text{Cd} > \text{Fe} > \text{Mn}$ [47].

Эта закономерность сохраняется и для иммобилизованных ионов металлов в ЛОХ белков. Прочность комплексов меди столь велика, что белок может удерживаться единственным остатком гистидина. Средством же к другим ионам металлов обладают белки, имеющие в своей структуре сближенные остатки гистидина. Наиболее благоприятным, по-видимому, является вариант, когда остатки гистидина в первичной структуре следуют друг за другом через шаг α -спиралей. Белки с такими участками одинаково хорошо сорбируются на IDA-гелях в Ni(II)- и Zn(II)-формах, а также имеют сродство к Co(II)-, Fe(II)- и Cd(II)-IDA-сорбентам.

Хорошой иллюстрацией сказанному служит хроматографическое поведение α_2 -макроглобулина из сыворотки крови человека. В случае Cu(II), Ni(II) и Zn(II) сорбционная емкость IDA-гелей одинакова, в случае Co(II) она составляет 77 % от максимальной, в случае Fe(II) — 20 %, а при использовании Cd(II)-IDA-геля сорбция происходит только при пониженной температуре (4°C) [48, 49].

Рис. 6. Хроматография сыворотки крови человека на колонке с Tl(III)-TED-агарозой. Колонка (1×13 см) уравновешена 0,1 М трис-HCl-буфером, содержащим 0,5 М K_2SO_4 , pH 7,5. Нанесено 3 мл сыворотки в стартовом буфере. Элюция исходным буфером, содержащим (вместо K_2SO_4) 0,5 М $(NH_4)_2SO_4$ (а) и 1,3 М глицин (б). А — несорбированный материал, В — альбумин, трансферрин, гаптоглобулин, С — иммуноглобулин G, α_2 -макроглобулин, гемопексин [18]



В большинстве случаев можно полагать, что если белок сорбируется на IDA-геле, заряженном ионами какого-либо металла, то он будет сорбироваться и на иммобилизованных ионах металлов, стоящих левее в ряду прочности образуемых комплексов. В случае, когда белок проявляет сродство к ионам нескольких различных металлов, следует для работы выбирать тот из них, который стоит правее в ряду прочности образуемых комплексов. Такой сорбент будет обладать наибольшей селективностью по отношению к целевому белку (минимальной емкостью по иным компонентам) и позволит проводить элюцию в наиболее мягких условиях.

ЛОХ белков на TED-сорбентах имеет свои отличия. Ионы меди в случае образования комплекса с TED-группировками в соотношении 1 : 1 не имеют свободных вакансий в координационной сфере металла, и такой сорбент для работы мало пригоден. Ионы же других переходных металлов на TED-сорбенте сохраняют только одну свободную координационную вакансию и поэтому не могут сорбировать белки с образованием двухточечного контакта. Тем не менее экспериментальные данные говорят о возможности фракционирования белков на Me-TED-гелях. Авторы [17] объясняют это образованием смешанных комплексов на сорбенте, в которых у иммобилизованных ионов металлов остается более чем одна координационная вакансия (рис. 2). К тому же результату должна приводить и гетерофункциональность сорбента. В работе [17] исследовалось фракционирование белков сыворотки крови на Ni(II)- и Fe(III)-TED-агарозе. Показано, что гель в Ni(II)-форме при pH 8,1 сорбирует иммуноглобулин, гемопексин и α_2 -макроглобулин. Наличие высокой солевой концентрации (до 4 М NaCl) не препятствует сорбции этих белков. Показательно, что α_2 -макроглобулин, имеющий участок с двумя сближенными остатками гистидина, обладает сродством к сорбенту, а альбумин нет. Это говорит о возможности двухточечного взаимодействия молекулы белка с одним иммобилизованным на TED-агарозе ионом никеля.

Fe(III)-TED-гель сорбировал белки только при pH 5,5 в буфере с низкой ионной силой. Добавление 1 М NaCl практически полностью предотвращало сорбцию, что говорит о преимущественно ионных взаимодействиях на таком сорбенте.

Для фракционирования тех же белков в работе [49] TED-агароза использовалась в Zn(II)- и Cd(II)-формах. Сорбция проводилась при pH 8,0 в присутствии 0,5 М Na_2SO_4 . В случае цинка гель удерживает белки незначительно, причем сорбция неселективна. Zn(II)-TED-агароза прочно удерживает α_2 -макроглобулин, который элюируется 0,05 М имидазолом [26, 50]. Гель же, заряженный ионами кадмия, практически не сорбирует белки.

Для фракционирования белков сыворотки крови на TED-агарозе были использованы также ионы металлов IIIA-группы: Al(III), Ga(III), In(III) и Tl(III) [18]. Сорбенты, заряженные ионами первых трех металлов, удерживают белки незначительно и только в буферах с низкой ионной силой. Даже в присутствии 0,1 М NaCl сорбция практически полностью прекращалась. В противоположность этому Tl(III)-TED-гель имел значительную сорбционную емкость (см. рис. 6).

В присутствии 0,5 М $(NH_4)_2SO_4$ были десорбированы (пик В) альбумин, трансферрин и гаптоглобулин (рис. 6). Глицин десорбирует иммуноглобулин G, гемопексин и α_2 -макроглобулин (пик С). Следует отметить,

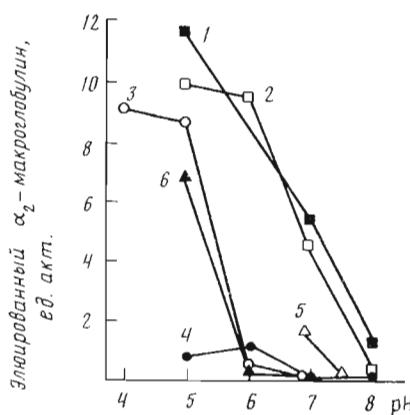


Рис. 7. Влияние pH на связывание α_2 -макроглобулина с Zn(II)-IDA-агарозой. Буферные растворы: трис-HCl (1), натрий-цитрат (2), натрий-ацетат (3), натрий-фосфат (4), НЕРСЕС (5), триэтаноламин (6). 2 мл Zn(II)-IDA-агарозы, содержащей 60 ед. акт. α_2 -макроглобулина, промывали 10 мл каждого буфера [48]

что последние три белка имеют также сродство к Ni(II)-TED-сорбенту и элюируются при тех же условиях. В то же время удерживание альбумина, не имеющего сближенных остатков гистидина, говорит о возможности сорбции белков на Tl(III)-TED-геле способом, похожим на сорбцию белков на Cu(II)-IDA-геле. Авторы обращают внимание на то, что из использованных в работе четырех металлов таллий наиболее токсичен и возможна корреляция между токсичностью металла, его комплексообразующими свойствами и пригодностью для ЛОХ белков.

3.3. Условия сорбции и десорбции в ЛОХ белков

Сорбция белков в ЛОХ осуществляется путем образования координационных связей. Очевидно, что наличие в буфере ионов, способных к координации с иммобилизованными ионами металлов, будет препятствовать сорбции белков. Это подтверждается влиянием различных буферных растворов на прочность связывания α_2 -макроглобулина Zn(II)-IDA-агарозой (рис. 7) [48].

При нейтральных pH (6—8), используемых при сорбции белков, наиболее подходящими являются ацетатный, фосфатный и триэтаноламинный буферы. Степень влияния буфера также зависит от его концентрации. Например, фосфатный буфер при pH 6,0 при концентрации 0,3 М и выше уже значительно снижает удерживание α_2 -макроглобулина. С другой стороны, трис-HCl-буфер в низкой концентрации (0,02—0,1 М) является одним из наиболее часто применяемых в ЛОХ, хотя, по мнению некоторых авторов, он вообще не пригоден для этого [34]. В последнее время все чаще стали использоваться бифункциональные буферы (например, натриевая соль морфолиноэтансульфокислоты), позволяющие работать в широком диапазоне pH [45, 46, 51].

Элюцию белков с хелатных сорбентов часто проводят понижением pH до значения, при котором разрушается комплекс белка с иммобилизованным ионом металла (pH декомплексации). Это наиболее простой способ, однако он не всегда может быть применен, например когда выделяемый белок не выдерживает воздействия кислой среды. В таких случаях элюцию проводят добавлением в исходный буфер соединения, способного эффективно координироваться с ионами металла и конкурировать с адсорбированными белками. Чаще всего для этих целей используются имидазол [52, 53], глицин [17, 18] и гистидин [54—56]. Преимуществом такой элюции является возможность создания линейного градиента комплексона, что позволяет получать более чистые белки. В некоторых случаях для десорбции белков применяют столь сильный хелатирующий агент, как EDTA. Например, нуклеозиддиfosфатаза печени крысы не элюируется с Cu(II)-IDA-агарозы при добавлении в буфер 10 mM GTP, 1% дезоксихолата или 1 mM цистеина. Десорбция происходит только в градиенте гистидина вместе с удалением металла из фазы сорбента. Здесь эффективна элюция 10 mM EDTA [56]. С другой стороны, нейтральную α -D-маннозидазу мозга, панесенную на Co(II)-IDA-агарозу в 20 mM натрий-фосфат-

ном буфере (рН 7,5), удается легко элюировать 20 мМ трис-ацетатным буфером с тем же значением рН [44].

Альбумин, трансферрин и гаптоглобулин, сорбирующиеся на Tl(III)-TED-агарозе в 0,1 М трис-HCl-буфере, содержащем 0,5 М K₂SO₄, элюируются при замене сульфата калия на 0,5 М сульфат аммония [18].

Возможен также вариант совмещения этих двух видов элюции. В работе [57] описана очистка супероксиддисмутазы, которую наносили на Cu(II)-IDA-гель при нейтральном значении рН. Фермент не десорбируется 10 мМ натрий-ацетатным буфером (рН 5,0), однако при использовании 20 мМ натрий-цитратного буфера элюция происходит при том же значении рН.

3.4. Влияние солей, органических растворителей, детергентов на процесс ЛОХ белков

К преимуществам метода ЛОХ белков относится возможность проведения процесса в присутствии детергентов, органических растворителей, высоких концентраций солей. Это позволяет нейтрализовать ионообменные свойства хелатных сорбентов и выделять ферменты непосредственно из культуральной жидкости без ее предварительного диализа.

Наиболее полно влияние всех этих добавок рассмотрено на примере сорбции белков сыворотки крови на Ni(II)-TED-агарозе [17]. Все хроматографические процедуры проводили на колонках одинакового размера (1 × 7 см). Наносили по 4 мл сыворотки, диализованной против 0,1 М трис-HCl-буфера (рН 8,1) с соответствующими добавками. Добавление 0,1; 1 и 5 М NaCl не увеличивало число сорбируемых белков при некотором повышении сорбционной емкости геля с увеличением ионной силы. Напротив, в буфере с 0,5 или 1 М Na₂SO₄, относящимся к водоструктурирующим солям, происходила неселективная сорбция большинства компонентов сыворотки. Некоторые предварительные эксперименты были выполнены при добавлении в уравновешивающий буфер 3 М LiCl и 2 М Na₃PO₄. Результаты показывают, что сорбция белков сыворотки (растворимых в этих системах) значительно возрастает в присутствии фосфата натрия, но уменьшается в присутствии хаотрофной соли хлорида лития.

При выделении ферментов часто используют такие нетехнологичные стадии, как высаливание и диализ. Использование же метода ЛОХ позволяет производить выделение непосредственно из культуральной жидкости. В частности, РНКаза *B. intermedius* 7Р была очищена в 15 раз из культуральной жидкости с выходом 90% на IDA-силохроме в Cu(II)-форме [36]. Успешно было проведено и выделение бактериальной эндонуклеазы *S. marcescens* [38]. Достигалась 30—50-кратная очистка при выходе не менее 80%. Как отмечалось выше, сорбция ферментов, имеющих сродство к Ni(II)- и Zn(II)-сорбентам, будет более селективной, чем в случае сорбента в Cu(II)-форме, который поглощает существенно больше белластных белков. Так, в частности, в 300 и более раз удалось очистить из культуральной жидкости РНКазу *Asp. pallidus* Ap₁ в одну стадию с количественным выходом [19, 36] (см. рис. 8).

Ионогенный детергент додецилсульфат натрия в концентрации, 0,01% практически не оказывает влияния на емкость и селективность сорбента, однако в концентрации 0,1% уменьшает количество сорбируемых белков в 3,5 раза. Добавление неионогенного детергента Твин-80 в концентрации 0,01; 0,1; 1; 2 и 4% не оказывает заметного влияния на сорбционный процесс. Присутствие 10 и 20% диметилсульфоксида и 40% этиленгликоля вызывает заметное повышение сорбции белков при одновременном ухудшении селективности. Очевидно, это связано с усилением ионообменных свойств сорбента, так как в буфере с 40% этиленгликolem и 1,7 М NaCl сорбция неспецифически связываемых белков не наблюдалась. Кроме очистки белков сыворотки крови, детергенты использовались при очистке активатора плазминогена (Твин-80, 0,1%) [52, 53] и коллагеназы свиньи (Бридж-35, 0,05%) [58]. В последнем случае все буфера содержали также

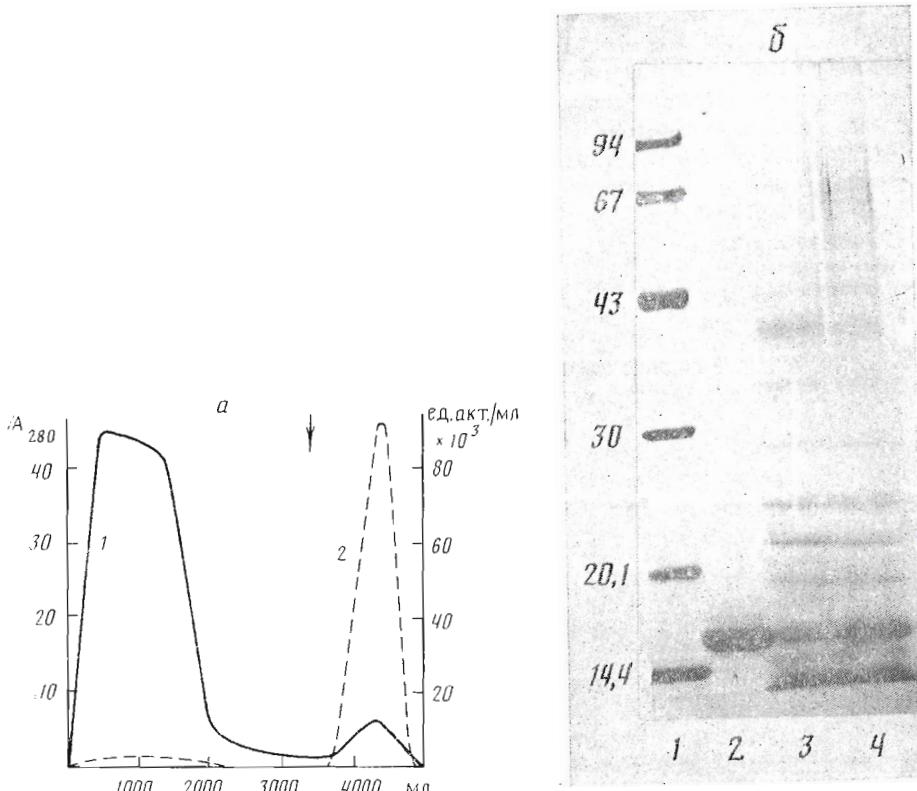


Рис. 8. Очистка РНКазы Arp₁ *Asp. pallidus* на Zn(II)-IDA-агарозе: а — хроматография РНКазы Arp₁ на колонке (4 × 8 см) с Zn(II)-IDA-агарозой. Нанесен 1 л культуральной жидкости. Колонка уравновешена 0,1 М натрий-ацетатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, pH 7,0. Начало элюции 0,1 М натрий-ацетатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, pH 5,0, показано стрелкой. 1 — A_{280} , 2 — активность РНКазы; б — электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях: 1 — белки-маркеры (приведена мол. масса в кДа), 2 — элюированная РНКаза Arp₁, 3 — несорбированный материал, 4 — исходная культуральная жидкость [36]

0,03% толуол и 1 mM CaCl₂, необходимый для сохранения активности фермента.

Возможность добавления катионов двухвалентных металлов в ходе ЛОХ представляет особый интерес. При очистке фибриногена на Zn(II)-IDA-геле добавление в исходный буфер 0,1 M CaCl₂ или 0,15% ZnCl₂ не препятствует сорбции фибриногена, стабилизируя его [59]. В другом случае на аналогичном сорбенте, заряженном ионами Cu(II), проводили выделение лактоферрина [60]. Этот белок содержит две молекулы железа, которые могут быть удалены и заменены на медь (аполактоферрин присоединяет две молекулы меди на молекулу белка во время диализа против избытка ионов меди). Профили элюций для Fe-лактоферрина, Cu-лактоферрина и аполактоферрина оказались идентичными, а количество ионов металлов в белке не изменилось после хроматографии. Эти данные говорят о том, что со свободными ионами металлов (находящимися в растворе) и с иммобилизованными на носителе хелатами металлов координируются разные аминокислотные остатки данного белка.

Таким образом, при ЛОХ можно работать как в присутствии высоких концентраций неорганических солей, дегергентов, органических растворителей, так и без них. Поэтому ЛОХ может быть включена в процесс так называемой «on-line»-хроматографии, т. е. проведение последовательно нескольких стадий хроматографической очистки без промежуточного диализа [61].

Очистка белков методом лигандообменной хроматографии

№	Выделяемый белок	Источник	Сорбент	Условия сорбции	Условия элюции	Литература
1	Лактоферрин	Гранулоциты свиной Сыворотка крови человека <i>Dolichos biflorus</i>	Cu(II)-IDA-агароза	0,02 М Na-Фосфатный буфер, pH 7,7, с 0,5 М NaCl	Градиент pH от исходного буфера до 0,1 М CH ₃ COOH с 0,5 М NaCl	[10]
2	Ингибитор α -трипептида Лектин	Сыворотка крови человека <i>Dolichos biflorus</i>	Zn(II)-IDA-агароза	0,05 М трис-HCl-буфер, pH 8, с 0,15 М NaCl	0,1 М Na/K-фосфатный буфер, pH 6,0, с 0,8 М NaCl	[62]
3	Фибриноген	Сыворотка крови человека	Ca(II)-IDA-агароза	0,05 М трис-аминогидразин-буфер, pH 8,2, с 0,5 М NaCl	Исходный буфер + 10 мМ EDTA	[63]
4	Тромбофактор XII	»	Zn(II)-IDA-агароза	0,025 М Na-Фосфатный буфер, pH 8,0, с 0,8 М NaCl	Градиент от исходного буфера до 5 мМ Na-аланятного, pH 4,0	[59]
5	Металлопротеиназа	Кости кролика	»	0,15 М трис-HCl-буфер, pH 8,0, с 0,15 М NaCl	0,1 М Na-ацетатный буфер, pH 4,5, с 0,8 М NaCl	[64]
6	Коллагеназа	Кости кролика	»	0,025 М Na-боратный буфер, pH 8,0, с 0,15 М NaCl, CaCl ₂ , 0,05%	0,05 М Na-ацетатный буфер, pH 4,7, с 0,8 М NaCl, CaCl ₂ , 0,05% Бридж-35, 0,03% тодуолом	[65]
7	Награтреуктаза	Хрящи свиньи	»	0,025 М Na-боратный буфер, pH 8,0, с 0,15 М NaCl, CaCl ₂ , 0,05% Бридж-35	0,05 М Na-ацетатный буфер, pH 4,7, с 0,8 М NaCl, CaCl ₂ , 0,05% Бридж-35, 0,03% тодуолом	[58]
8	Протосубтилиза	<i>Cucurbita maxima</i>	<i>B. subtilis</i>	Zn(II)-DADT*-сепарон	Исходный буфер + 50 мМ EDTA	[66]
9	Нейтральная α -маннозилаза	Мозг обезьяны	Co(II)-IDA-агароза	0,01 М трис-HCl-буфер, pH 8,5, с 20 мМ CaCl ₂	0,02 М Na-ацетатный буфер, pH 4,2, с 20 мМ CaCl ₂	[67]
10	α_e -Макроглобулин	Сыворотка крови быка	Zn(II)-IDA-агароза	0,02 М Na-Фосфатный буфер, pH 7,5	0,02 М три-ацетатный буфер, pH 7,5	[44]
11	Серинкарбоксипептидаза-лактоферрин	<i>Asp. niger</i>	»	0,1 М Na-Фосфатный буфер, pH 6,5, с 0,8 М NaCl	0,02 М Na-Фосфатный буфер, pH 7,4, с 0,15 М NaCl, EDTA	[68]
12	Желическое молоко	Желическое молоко	Cu(II)-IDA-агароза	0,05 М Na-ацетатный буфер, pH 5,5	Исходный буфер + 75 мМ EDTA	[69, 70]
13	Активатор плазминогена	Фибробласты человека	»	0,05 М трис-аминогидразин-буфер, pH 8,2, с 0,5 М NaCl	Исходный буфер, pH 4,0	[60]
14		Zn(II)-IDA-агароза		0,05 М трис-HCl-буфер, pH 7,4, с 1 М NaCl, 0,1% Тинн-80	Исходный буфер + 50 мМ имидазол	[53]

Продолжение

№	Выделенный белок	Источник	Сорбент	Условия сорбции	Условия элюции	Литера-тура
15	Активатор плазминогена	Меланома человека	»	0,02 М три- HCl -буфер, pH 7,5, с 1 М NaCl, 0,1% Твиг-80	Градиент имидазола (0–0,05 М) в исходном буфере	[52]
16	»	Эпителий человека	»	0,02 М три- HCl -буфер, pH 7,5,	»	[71]
17	»	Культура клеток человека	»	с 0,15 М NaCl, 0,01% Твиг-80,	»	[72]
18	»	Маточная ткань	»	5 mM три- HCl -буфер, pH 7,5,	»	[73]
19	$\alpha_2\text{-SFI-тимопротеин}$	Сыворотка крови человека	»	с 0,05 М NaCl	0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 6,5, с 0,8 М NaCl	[74]
20	$\alpha_2\text{-Макротрубulin}$	»	»	с 0,45 М NaCl	Исходный буфер, pH 6,5	[54]
21	Ингибитор α_1 -протеина-азы	»	»	0,02 М Na-фосфатный буфер, pH 6,0, с 0,15 М NaCl	0,02 М Na-хлоридовый буфер, pH 5,0, с 0,15 М NaCl	[54]
22	Нуклеоцидифосфатаза	Печень крысы	Cu(II)-IDA-агароза	0,02 М три- HCl -буфер, pH 7,2	Градиент гистидина (0–0,015 М) в 0,01 М малеинатном буфере, pH 6,6	[56]
23	Триаденопотобный фермент	<i>Act. specim.</i>	Cu(II)-DADT *-селарон	0,01 М три- HCl -буфер, pH 8,2	0,01 М Na-асетатный буфер, pH 5,9, с 0,25 М NaCl	[27]
24	Супероксиддисмутаза	Эритроциты человека	Cu(II)-IDA-агароза	0,01 М Na-асетатный буфер, pH 6,4, с 0,1 М NaCl	0,02 М Na-цитратный буфер, pH 5,0	[57]
25	Моноклереназа	Мозг быка	Zn(II)-IDA-агароза	0,02 М TEC **-буфер, pH 7,0, с 0,5 М NaCl	Градиент имидазола (0–0,04 М) в исходном буфере	[51]
26	Фосфотирозинфосфатаза	Почка кролика	Cu(II)-IDA-агароза	0,01 М НЕРС-буфер, pH 7,5, с 0,05 М NaCl, 0,01% Бридж-35	Исходный буфер+50 ММ EDTA	[75, 76]
27	Интерферон	Хомяк	Zn(II)-IDA-агароза	0,02 М Na-фосфатный буфер, pH 7,4, с 1 М NaCl	Градиент pH (6–4) 0,1 М Na-асетатного буфера с 1 М NaCl	[77]
28	»	Фибробласты чёлопека	Cu(II)-IDA-агароза	»	0,1 М Na-асетатный буфер, pH 4,2, с 1 М NaCl	[78]
29	»	Лейкоциты человека	Cu(II)-IDA-агароза	0,02 М Na-фосфатный буфер, pH 7,2, с 0,5 М NaCl	0,1 М Na-асетатный буфер, pH 4,5, с 0,5 М NaCl	[79]
30	»	Лимфобласты человека	»	0,02 М Na-фосфатный буфер, pH 7,4, с 0,2 М NaCl, 20% глицерином	Градиент pH от исходного буфера до 0,02 М Na-цитратного буфера, pH 2,0, с 0,2 М NaCl, 20% глицерином	[80]

N _o	Выделляемый белок	Источник	Сорбент	Условия сорбции	Условия элюции	Литера-тура
31	Интерферон	Лимфоциты человека	Ni(II)-IDA-агароза	0,02 M Трис-HCl-буфер, pH 7,5, с 0,45 M NaCl	0,1 M Na-асетатный буфер, pH 4,5, с 1 M NaCl	[43]
32	Рекомбинантный интерферон	—	Cu(II)-IDA-агароза	0,05 M Na-фосфатный буфер, pH 7,0, с 0,2 M NaCl, 0,1% Твин-2G	0,05 M Na-асетатный буфер, pH 5,6, с 0,2 M NaCl, 0,1% Твин-20	[81]
33	Интерферон	Фибробlastы человека	Zn(II)-IDA-агароза	0,02 M Na-фосфатный буфер, pH 7,2, с 0,1 M NaCl	Градиент pH (6–4) 0,05 M Na-цитрат/Na-фосфатного буфера, с 1 M NaCl	[82]
34	»	Лейкоциты человека	Cu(II)-IDA-силохром	0,02 M Na-фосфатный буфер, pH 7,4, с 1 M NaCl, 25% этиленгликолем	0,1 M Na-асетатный буфер, pH 4,5, с 1 M NaCl, 25% этиленгликолем	[42]
35	»	Фибробlastы человека	Cu(II)-IDA-агароза	0,02 M Na-фосфатный буфер, pH 7,0, с 1 M NaCl	0,05 M Na-асетатный буфер, pH 4,5, с 1 M NaCl	[83]
36	Рекомбинантный интерферон	Эпидермальная базальная мембрана A5	Ni(II)-IDA-TSK-Gel HW-55	0,005 M Тритон X-100, 0,1% NaCl, 0,1% Трин-20	0,025 M CH ₃ COOH, pH 5; 0,12 M NaCl, 0,1% Трин-20	[84]
37	Эпидермальная базальная мембрана A5	—	Cu(II)-IDA-TSK-Gel HW-55	0,005 M Трис-HCl с 1 M NaCl, pH 6,8	0,005 M NH ₄ -амидат с 1 M NaCl, pH 4,2	[85]
38	Эпидермальная базальная мембрана C ₂	<i>Actinomyces coeteler</i>	Zn(II)-IDA-агароза	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 6,5	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 5,0	[38, 86]
39	РНКаза C ₂	<i>S. marcescens</i>	<i>A. sp. clavatus</i>	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 7,0	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 5,0	[19, 36, 87]
40	РНКаза АР ₁	<i>A. sp. pallidus</i>	<i>Cu(II)-IDA-органосилюксидом</i>	»	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 7,0	[19, 36]
41	РНКаза 7Р	<i>B. intermedius</i>	<i>Cu(II)-IDA-TSK-Gel HW-55</i>	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 7,0	0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 4,5	[19]
42	Щелочная фосфатаза	Кишечник гренландского тюленя			0,1 M Na-асетатный буфер с 0,5 M NaCl, pH 4,0	

* DADT = 1,8 ютамино-4-метил-3-б-дигидрооктан.

** TPG — трис(тирогексаметил)метил-2-аминотансульфонилслюта.

3.5. Практическое применение метода лигандообменной хроматографии

Успешное применение метода ЛОХ для выделения различных белков и ферментов подтверждается многочисленными примерами, представленными в таблице. В некоторых приведенных примерах метод ЛОХ используется наряду с другими хроматографическими процедурами.

4. Другие области применения хелатных сорбентов

4.1. Координационно-ионная иммобилизация ферментов

Способность белков сорбироваться прочно на хелатных гелях может быть использована для их иммобилизации. Такой метод называется координационно-ионной иммобилизацией. Преимуществами этого метода являются легкость проведения процесса иммобилизации, его селективность, простота десорбции ферментов с последующим многократным использованием носителя, сохранение высокой активности иммобилизованных ферментов.

Изучение связывания пенициллинамидогидролазы с хелатными сорбентами в Cu(II)-форме проведено в работе [88]. В качестве стационарных лигандов использовались остатки этилендиамина, диэтilentриамина и триэтilentетраамина, в качестве носителей — силохромы, полистиролы различной структуры, гели на основе поливинилового спирта. Показано, что, несмотря на резкое различие свойств носителей, иммобилизация фермента протекает однотипно и равновесная концентрация белка достигается достаточно быстро. Известно, что анионообменные свойства хелатного геля с группировками этилендиамина значительно возрастают при зарядке его ионами Cu(II) [26]. Однако в растворе 1 M NaCl десорбции иммобилизованного ферmenta не наблюдалось. Напротив, в случае сорбентов, не содержащих ионы меди, переход фермента в раствор в аналогичных условиях происходит быстро и практически количественно. Кроме того, сорбированный без ионов Cu(II) фермент почти не проявлял гидролазной активности.

Следует отметить, что метод координационно-ионной иммобилизации позволяет селективно сорбировать фермент из препарата, содержащего до 60 % балластных белков. Наилучшие результаты были получены при использовании силохрома и гетеропористого полистирола с группировками этилендиамина. Позднее на этих двух носителях была проведена иммобилизация пенициллинамидогидролазы через комплексы, содержащие ионы Co(II), Ni(II) и Fe(III) [89]. Наибольшую емкость при сохранении 73% активности фермента имел сорбент на основе гетеропористого полистирола с группировками этилендиамина в Co(II)-форме. Последующее окисление ионов Co(II) и Co(III) в комплексе с ферментом увеличивает прочность фиксации молекул фермента на носителе до уровня, сравниваемого с прочностью ковалентного связывания [90].

4.2. Высокоэффективная лигандообменная хроматография белков

Закономерным итогом развития ЛОХ белков стало использование этого метода в режиме высокоэффективной ЛОХ. Возможности этого метода показаны в работе японских авторов [91]. Сорбент был получен присоединением IDA к TSK-гель G5000 PW с размером частиц 10 мкм и использован в Zn(II)-форме. Предварительно было показано, что при проведении хроматографии на этом сорбенте, не заряженном ионами цинка, все белки выходили в свободном объеме, т. е. сорбент не обладал неспецифической сорбцией. На рис. 9 показано разделение трех модельных белков на таком сорбенте в Zn(II)-форме. В тех же условиях были проведены эксперименты с коммерческими препаратами липоксидазы и малатдегид-

Рис. 9. Хроматография смеси модельных белков — РНКазы А (1), трансферрина (2) и карбонгидразы (3) на Zn(II)-IDA-TSK-геле G50000 PW. Нанесена смесь белков по 50 мкг каждого. Колонка ($7,5 \times 75$ мм) уравновешена 0,02 М три- HCl -буфером, содержащим 0,5 М NaCl, pH 8,0. Элюция линейным градиентом (0—0,2 М) глицина в стартовом буфере. Скорость элюции 0,5 мл/мин при 25°С [91]

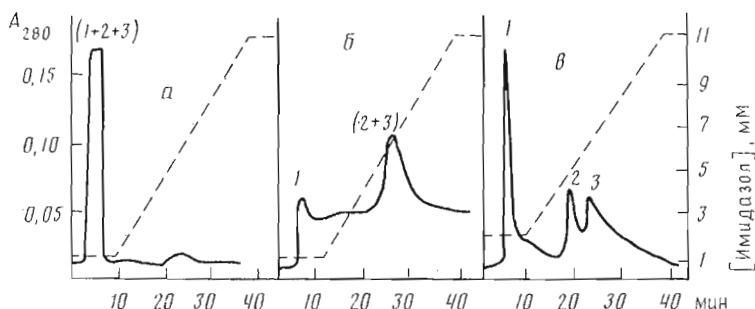
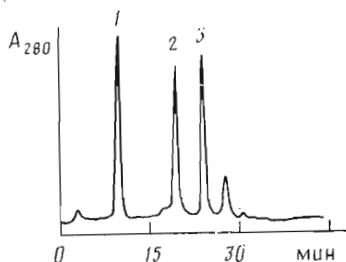


Рис. 10. Хроматография сывороточных альбуминов быка (1), кролика (2) и свиньи (3) на IDA-TSK-геле 5 PW при использовании Zn (а), Ni (б) и Cu (в). Нанесено 50 мкг (0,5 мг) белка. Колонка ($7,5 \times 75$ мм) уравновешена 0,02 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 0,5 М NaCl и 1 мМ имидазол в случае Zn и Ni и 2 мМ имидазол в случае Cu. Элюция линейным градиентом имидазола в том же буфере [34]

рогеназы и было показано, что результаты очистки на хелатном сорбенте сопоставимы с очисткой на ионообменном и обращенно-фазовом сорбентах в режиме высокоэффективной хроматографии. В ходе экспериментов не происходило денатурации ни одного из ферментов.

Позднее подобный эксперимент был выполнен другими авторами в несколько иных условиях [34]. Поскольку три- HCl -буфер способен координироваться с ионами металлов на IDA-сорбенте, вместо три- HCl -буфера в работе использовался 0,02 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0), содержащий 0,5 М NaCl. Хроматография проводилась на колонке с коммерческим сорбентом IDA-TSK-гель 5PW (Toyo Soda Co, Япония), заряженным ионами Zn(II), Ni(II) и Cu(II). Порядок выхода ферментов сохранялся вне зависимости от используемого иона металла. При снижении pH буфера РНКаза А уже не удерживается на сорбенте в Zn(II)- и Ni(II)-формах. В этой работе также описаны хроматографические свойства сывороточных альбуминов быка, кролика и свиньи. Сорбция проводилась в том же фосфатном буфере, pH 7,0, но содержащем 1 мМ имидазол. На Zn(II)-хелатной колонке все три белка выходили в свободном объеме, на колонке в Ni(II)-форме два последних компонента сорбировались, однако при элюции линейным градиентом имидазола (1—11 мМ) выходили единым пиком. При проведении хроматографии на Cu(II)-сорбенте также сорбировались только альбумины кролика и свиньи, но при элюции в тех же условиях их удалось разделить (рис. 10).

Очистка карбоксипептидазы G методом высокоэффективной ЛОХ на Zn(II)-IDA-геле описана в работе [92]. Сорбцию проводили в 0,01 М НЕPES-буфере (pH 8,0). Добавление в буфер 0,5 М KCl не препятствовало сорбции. Фермент элюировали добавлением 10 мМ EDTA. Очистка в 25 раз достигалась за 10 мин.

В работе [93] сорбенты для высокоэффективной ЛОХ были получены присоединением группировок IDA, TED и аспарагиновой кислоты к Сферосилу. Были использованы ионы переходных и редкоземельных металлов. На Cu(II)-IDA-сорбенте показана возможность выделения лактоферрина, а на Tb(III)-Asp-силикагеле были разделены два кальций зависимых фермента — трипсин и фосфолипаза. TED-сорбент применялся в Sm(III)-

и La(III)-формах в tandemном варианте для фракционирования белков сыворотки крови.

Способность сульфата натрия в высокой концентрации повышать сродство белков к хелатным сорбентам использована при проведении высокоэффективной ЛОХ в работе [14]. Лизоцим, РНКаза А и миоглобин были разделены на Cu(II)-IDA-силикагеле: смесь белков наносили на колонку в буфере, содержащем 1,2 М Na_2SO_4 , а элюцию проводили в линейном градиенте такого же буфера, но содержащего 0,5 М ацетат аммония.

Разделение вирусных мембранных белков методом высокоэффективной ЛОХ на IDA-силикагеле в Zn(II)-форме описано в работе [94]. Элюцию проводили в линейном градиенте от 0,5 М NaCl до 0,5 М NH_4Cl в 0,2 М натрий-ацетатном буфере (рН 7,0), содержащем 0,1% децилполиэтиленгликоля. Присутствие детергента не мешало проведению хроматографического процесса.

4.3. Сэндвич-аффинная хроматография

Белок, иммобилизованный на хелатном сорбенте, может служить аффинным лигандом для выделения других белков. Такой подход был использован для выделения эндопротеиназ на связанным с Zn(II)-IDA-агарозой α_2 -макроглобулине и назван «сэндвич-аффинной хроматографией» [48]. Преимущества этого метода аналогичны преимуществам координационно-ионной иммобилизации ферментов. При низких солевых концентрациях (0,02 М натрий-фосфатный или 0,025 М трис-НCl-буферы, содержащие 0,15 М NaCl) с α_2 -макроглобулин-Zn-IDA-агарозой эффективно

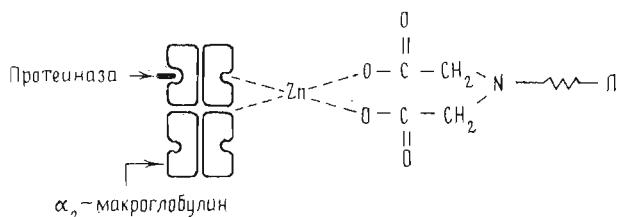


Рис. 11. Схематическое строение «сэндвич»-комплекса [48]

связываются трипсин, химотрипсин, термолизин, эластаза, бромелайн, фицин, папаин и несколько слабее клострипанин, эндопротеиназа Arg-C и карбоксипептидаза Y, которые затем могут быть элюированы в виде соответствующих аддуктов (см. рис. 11) повышением ионной силы буфера с полным сохранением протеиназной активности.

4.4. «Отрицательная сорбция»

Использование метода ЛОХ может оказаться полезным и при очистке белков, не имеющих сродства к хелатным сорбентам. В этом случае очистка происходит за счет сорбции балластных белков, и такой прием называется «отрицательной сорбцией». Металлопротеиназа быка не имеет сродства к Zn-хелатной агарозе, но за счет сорбции части примесей ее удельную активность удалось повысить с 60 до 95 ед. акт./мг белка [64]. В другом случае в схему очистки ингибитора эластазы из хрящей быка была также включена хроматография на Zn(II)-IDA-агарозе. При этом разделялись два компонента ингибитора: высокомолекулярный (M 32 кДа), имеющий сродство к сорбенту, и низкомолекулярный (M 20 кДа), выходящий в свободном объеме [95]. Аналогичным способом были разделены серинкарбоксипептидаза и кислая протеиназа *Asp. niger*. Сульфат-аммонийная фракция культуральной жидкости была нанесена на Cu(II)-IDA-агарозу при рН 5,5. Кислая протеиназа в таких условиях не сорбировалась, а для элюции серинкарбоксипептидазы потребовалось добавление 75 мМ EDTA [69].

Интересный прием был применен для получения интерферона из эмбриональных клеток хомяка [77]. Этот белок удерживается Cu(II)-IDA-гелем, но не сорбируется на аналогичном геле в Zn(II)-форме. Препаратор был вначале очищен на Zn-хелатной агарозе за счет сорбции части балластных белков, а затем несорбированный материал был нанесен на хелатную агарозу в Cu-форме. Преимуществом такого подхода является возможность нанесения белка после первой колонки на вторую без промежуточной стадии диализа.

4.5. Изучение поверхностной топографии белковой глобулы

Способность белков взаимодействовать с иммобилизованными ионами металлов дает информацию о расположении на поверхности белковой глобулы аминокислотных остатков (в первую очередь гистидина), ответственных за такое взаимодействие. Так, например, сорбция белка на Cu(II)-IDA-геле говорит о наличии у него по крайней мере одного экспонированного остатка гистидина, как у кальмодулина [33], а сорбция на Ni(II)- или Zn(II)-IDA-гелях подтверждает наличие двух сближенных остатков гистидина, даже если в первичной структуре белка нет таких сближенных остатков, как, например, панкреатической РНКазы А [41]. Сохранение активности у иммобилизованного фермента говорит о том, что аминокислотные остатки, входящие в активный центр, не участвуют в процессе координации с сорбентом [89]. Изучение сорбции авидина на Cu(II)-IDA-геле может дать информацию о топографии биотинсвязывающего участка [33].

4.6. Влияние ионов металлов в других видах хроматографии

Эффект повышения селективности катионаобменника при зарядке его ионами переходного металла описан в работе [96]. Сульфокатионит Амберлит IR-120 в Hg(II)-форме использовался для выделения протеолитического фермента калотрапаина FI. О роли ионов ртути говорит тот факт, что фермент элюировался не только при увеличении ионной силы раствора, но и при добавлении в буфер 2 mM EDTA.

В работе [97] показано влияние ионов переходных металлов при очистке фермента люциферазы на сорбентах с иммобилизованными красителями. В буфере без ионов металла фермент сорбировался только на агарозе с красителем Procion Green HE 4B. Однако в присутствии ионов Co(II), Ni(II) и Mg(II) связывание происходит и иммобилизованным красителем Cibacron Brilliant Blue BR-11. Для сорбции на агарозе с красителем Procion Blue HB достаточно ввести в буфер ионы магния. Элюция фермента с полным сохранением активности достигается во всех случаях при добавлении в буфер 5 mM ATP, но и при добавлении EDTA в случае последних двух сорбентов удается элюировать 20—22% активной люциферазы. Эффект повышения сродства фермента к сорбентам с красителями в присутствии ионов металлов обусловлен, по мнению авторов, частичным изменением конформации молекулы красителя, на что могут указывать изменения спектров кругового дихроизма.

5. Заключение

Таким образом, из обзора литературы, посвященной ЛОХ белков, видно, что этот метод достаточно универсален и успешно применяется для очистки ферментов различной природы с использованием широкого круга носителей. Важно отметить, что метод ЛОХ более селективен, чем, например, ионообменная и гидрофобная хроматография, и в ряде случаев по избирательности сорбции приближается к аффинной хроматографии. Однако в отличие от последней ЛОХ не является субстратзависимой, что позволяет разделять ферменты одного или родственных классов. Кроме того соединения, используемые в ЛОХ в качестве стационарных лигандов,

дешевы и доступны, а легкость регенерации и перезарядки хелатных сорбентов ионами различных металлов делает этот вид хроматографии гибким и удобным в работе. Важным достоинством метода ЛОХ является также сохранение хелатным гелем сорбционных свойств в растворах с высокой солевой концентрацией, в присутствии дегтергентов и органических растворителей, что позволяет выделять ферменты непосредственно из культуральной жидкости и экстрактов тканей.

В то же время еще недостаточно изучен вопрос о механизме сорбции многих белков, поэтому в большинстве работ пригодность метода ЛОХ для очистки конкретного объекта определялась чисто эмпирически. В случае сорбентов с TED-группировками на координационные взаимодействия разделяемых белков с иммобилизованными ионами металлов часто накладываются эффекты иной природы, что подчас затрудняет трактовку полученных результатов.

Использование ЛОХ пока ограничивалось в основном лабораторными исследованиями, однако достоинства метода позволили успешно применить ЛОХ в крупномасштабных схемах очистки ферментов и белков [84]. В частности, очистка рекомбинантного интерферона α -2a от олигомеров и примесей бактериальных эндотоксинов была успешно осуществлена на IDA-агарозе [84]. Была использована колонка (14 × 24 см), содержащая 4 л геля, на которую было нанесено 38 л раствора. Причем степень очистки получаемого продукта была выше, чем в случае применения иммуноаффинной хроматографии. Содержание меди в элюатах, определенное методом атомно-адсорбционной спектроскопии, не превышало норму. Дальнейшее развитие метода ЛОХ, по всей видимости, будет направлено на поиск стационарных хелатных лигандов, более прочно удерживающих ионы металлов, например сорбентов с нитрилотриацетатными группировками [98], а также на расширение спектра применяемых металлов-комплексообразователей с целью направленного изменения селективности сорбентов с учетом структуры выделяемых объектов. Безусловно перспективно применение ЛОХ в режиме высокоэффективной хроматографии на жестких сорбентах [34, 91–93].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stokes R. H., Walton H. F. // J. Amer. Chem. Soc. 1954. V. 76. № 12. P. 3327–3331.
2. Helfferich F. G. // Nature. 1961. V. 189. № 4769. P. 1001–1002.
3. Davankov V. A., Navratil J. D., Walton H. F. Ligand exchange chromatography. CRC-Press, Boca-Raton, USA, 1988.
4. Davankov V. A., Semechkin A. V. // J. Chromatogr. 1977. V. 141. № 3. P. 313–353.
5. Davankov V. A. // CRC Handbook of HPLC for the separation of amino acids, peptides and protein. V. 1. / Ed. Hancock W. S. CRC-Press, Inc. Boca-Raton, USA, 1984. P. 393–409.
6. Даванков В. А. // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1983. Т. 28. № 1. С. 25–29.
7. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. // Nature. 1975. V. 258. № 5536. P. 598–599.
8. Schmuckler G. // Talanta. 1965. V. 12. № 3. P. 281–290.
9. Gimpel M. G. Hydrolitisch stabile Silicagelfräger mit chemisch gebundenen, metallkomplexierenden Liganden: Synthese, Charakterisierung und Anwendung in der hochdruckflüssig-ligandenaustrausch-Chromatographie: Dis. ... Dokt. Naturwissenschaft. Mainz, 1982. 188 s.
10. Torres A. R., Peterson E. A., Evans W. H., Mage M. G., Wilson S. M. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 576. № 2. P. 382–392.
11. Hemdan E. S., Porath J. // J. Chromatogr. 1985. V. 323. № 2. P. 247–254.
12. Херинг Р. Хелатообразующие ионообменники. М.: Мир, 1971. С. 52.
13. Gimpel M., Unger K. // Chromatographia. 1983. V. 17. № 4. P. 200–204.
14. Figueroa A., Corradini C., Feibush B., Karger B. L. // J. Chromatogr. 1986. V. 371. P. 335–352.
15. Лопатин С. А., Варламов В. П., Рогожин С. В., Аруказэу Х. Э., Хага М. Э. Способ получения сорбента для лигандообменной хроматографии белков: А. с. 1395640 // СССР / Б. И. 1988. № 18. С. 99–100.
16. Varlamov V. P., Lopatin S. A., Bannikova G. E., Andrushina I. A., Rogozhin S. V. // J. Chromatogr. 1986. V. 364. № 1. P. 215–223.
17. Porath J., Olin B. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 7. P. 1621–1630.
18. Porath J., Olin B., Granstrand B. // Arch. Biochem. and Biophys. 1983. V. 225. № 2. P. 543–547.

19. Лопатин С. А. Синтез хелатных сорбентов и их использование в лигандообменной хроматографии ферментов: Дис. ... канд. хим. наук. М.: Ин-т элементоорган. соединений, 1988. 182 с.
20. Haner M., Eidson A. F., Darnal D. W., Birnbaum E. R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 231. № 2. P. 477—486.
21. Haner M., Hezil M. T., Rassouini B., Birnbaum E. R. // Anal. Biochem. 1984. V. 138. № 2. P. 229—234.
22. Moroux Y., Boschetto E., Egly J. M. // Sci. tools. 1985. V. 32. № 1. P. 1—4.
23. Ramadan N., Porath J. // J. Chromatogr. 1985. V. 321. № 1. P. 81—91.
24. Ramadan N., Porath J. // J. Chromatogr. 1985. V. 321. № 1. P. 93—104.
25. Ramadan N., Porath J. // J. Chromatogr. 1985. V. 321. № 1. P. 105—113.
26. Porath J., Belew M. // Affinity chromatography and biological recognition. / Eds. Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I. Orlando: Acad. Press, 1983. P. 173—189.
27. Березин Б. Б., Ялков И. А., Даеванков В. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 621—625.
28. Rassi Z. E., Horvath C. // J. Chromatogr. 1986. V. 359. № 1. P. 241—253.
29. Hemdan E. S., Porath J. // J. Chromatogr. 1985. V. 323. № 2. P. 255—264.
30. Hemdan E. S.: Porath J. // J. Chromatogr. 1985. V. 323. № 2. P. 265—272.
31. Smith M. C., Furman T. C., Pidgeon C. // Inorgan. Chem. 1987. V. 26. № 12. P. 1965—1969.
32. Smith M. C., Furman T. C., Ingolia T. D., Pidgeon C. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 15. P. 7211—7215.
33. Sulkowski E. // Trends Biotechnol. 1985. V. 3. № 1. P. 1—7.
34. Belew M., Tai Tung Yip, Andersson L., Ehrnstrom R. // Analyt. Biochem. 1987. V. 164. № 2. P. 457—465.
35. Muszynska G., Zhao Y.-J., Porath J. // J. Inorgan. Biochem. 1986. V. 26. № 1. P. 127—135.
36. Лопатин С. А., Варламов В. П., Рогожин С. В. // Биотехнология. 1989. Т. 5. № 2. С. 183—188.
37. Pavlovsky A. G., Vagin A. A., Vainstein B. K., Chepurnova N. K., Karpeisky M. Ya. // FEBS Lett. 1983. V. 162. № 1. P. 167—170.
38. Баникова Г. Е., Варламов В. П., Рогожин С. В. Способ выделения и очистки бактериальной эндонуклеазы из культуральной жидкости «*Serratia marcescens*»: А. с. 1392902 СССР.
39. Филимонова М. Н., Баратова Л. А., Воспельникова Н. Д., Желтова А. О., Лещинская И. Б. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 9. С. 1660—1666.
40. Полаков К. М., Стрекопитов В. В., Ваин А. А., Тищенко Г. Н., Безбородова С. И., Вайнштейн Б. Р. // Кристаллография. 1987. Т. 32. № 4. С. 918—926.
41. Sulkowski E., Vastola K., Oliszek D., von Muenchhausen W. // Affinity chromatography and related techniques / Eds Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. Amsterdam: Elsevier, 1982. P. 313—322.
42. Борухов С. И., Изотова Л. С., Костров С. В., Староверов С. М., Мусатова А. А., Стронгин А. Я. // Биохимия. 1985. Т. 50. № 9. С. 1471—1480.
43. Coppernover D. H. // IRCS Med. Sci. 1985. V. 13. P. 811—812.
44. Mathur R., Balasubramanian A. S. // Biochem. J. 1984. V. 222. № 1. P. 261—264.
45. Andersson L., Porath J. // Analyt. Biochem. 1986. V. 154. № 2. P. 250—254.
46. Muszynska G., Andersson L., Porath J. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 22. P. 6850—6853.
47. Дьялова Н. М., Темкина В. Я., Колпакова И. Д. Комплексоны. М.: Химия, 1970. С. 370.
48. Wunderwald P., Schrenk W. J., Port H. // J. Appl. Biochem. 1983. V. 5. № 1. P. 31—42.
49. Anderson L. // J. Chromatogr. 1984. V. 315. № 1. P. 167—174.
50. Porath J. // J. Chromatogr. 1986. V. 376. № 1. P. 331—341.
51. Murthy A. S. N., Mains R. E., Eipper B. A. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 4. P. 1815—1822.
52. Rijken D. S., Collen D. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 13. P. 7035—7041.
53. Cederholm-Williams S. A., Porter N. W. // Brit. J. Dermatol. 1984. V. 110. № 2. P. 423—429.
54. Kurecki T., Kress L. F., Laskowski M. // Analyt. Biochem. 1979. V. 99. № 2. P. 415—420.
55. Muszynska G., Porath J. // 6th Internat. Symp. bioaffinity chromatogr. and related techniques. Prague, 1985. P. 43.
56. Ohkubo I., Kondo T., Taniguchi N. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 616. № 1. P. 89—93.
57. Weselake R. J., Chesney S. L., Petkau A., Friesen A. D. // Analyt. Biochem. 1986. V. 155. № 1. P. 193—197.
58. Cawston T. E., Tyler J. A. // Biochem. J. 1979. V. 183. № 3. P. 647—656.
59. Scully M. F., Kakkar V. V. // Biochem. Soc. Transactions. 1981. V. 9. № 2. P. 335—336.
60. Lönnedal B., Carlsson J., Porath J. // FEBS Lett. 1977. V. 75. № 1. P. 89—92.
61. Neziani A., Krishnhan S., Vijayalakshmi M. A. // 2nd Internat. Symp. on preparative and up scale liquid chromatography. Baden-Baden, 1988. P. 220.
62. Salier J. P., Martin J. P., Lambin P., McPhee H., Hochstrasser K. // Analyt. Biochem. 1980. V. 109. № 2. P. 273—283.

63. Borrebaek C. A. K., Lönnerdal B., Etzler M. E. // FEBS Lett. 1981. V. 130. № 2. P. 194—196.
64. Weerasinghe K., Scully M. F., Kakkar V. V. // Biochem. Soc. Trans. 1981. V. 9. № 2. P. 336—337.
65. Galloway W. A., Murphy G., Sandy J. D., Gavrilovic J., Cawston T. E., Reynolds J. J. // Biochem. J. 1983. V. 209. № 3. P. 741—752.
66. Smarrelli J., Campbell W. H. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 742. № 3. P. 435—445.
67. Berezin B. B., Yamskov I. A., Davankov V. A. // Internat. Symp. «Advances in liquid chromatography». Szeged, Hungary, 1984. P. 11—12.
68. Feldman S. R., Goniast S. L., Ney K. A., Pratt C. W., Pizzo S. V. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 7. P. 4458—4462.
69. Krishnan S., Vijaylakshmi M. A. // J. Chromatogr. 1985. V. 329. № 1. P. 165—170.
70. Krishnan S., Vijaylakshmi M. A. // J. Chromatogr. 1987. V. 397. № 1. P. 339—346.
71. Electricwala A., Atkinson T. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 147. № 3. P. 511—516.
72. Stump D. C., Lijnen H. R., Collen D. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 3. P. 1274—1278.
73. Rijken D. C., Wingaards G., Jong M. Z.-D. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 580. № 1. P. 140—153.
74. Lebreton J. P. // FEBS Lett. 1977. V. 80. № 2. P. 351—354.
75. Shriner C. L., Brautigan D. L. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 18. P. 11383—11390.
76. Shriner C. L., Brautigan D. L. // J. Biochem. Biophys. Methods. 1987. V. 14. № 2. P. 273—278.
77. Bollin E., Sulkowski E. // Arch. Virol. 1978. V. 58. № 1. P. 149—152.
78. Heine K. J. W., Billiau A. // Methods in enzymology. V. 78A / Eds. Pestka S. N. Y.: Acad. Press, 1981. P. 448—456.
79. Berg K., Heron I. // J. Gen. Virol. 1980. V. 50. № 2. P. 441—446.
80. Yonehara S., Yanase Y., Sano T., Imai M., Nakasawa S., Mori H. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 8. P. 3770—3775.
81. Hochuli E. Reinigung von Interferon: Eur. Pat. 118808, C12P21/02. 1984. 13 S.
82. Edy V. G., Billiau A., Somer P. D. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 17. P. 5934—5935.
83. Bollin E. // Methods Enzymol. 1981. V. 78A. P. 178—181.
84. Hochuli E. // J. Chromatogr. 1988. V. 444. № 1. P. 293—302.
85. Варламов В. П., Лопатин С. А., Рогожин С. В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 7. С. 927—934.
86. Баникова Г. Е., Тимофеева Г. Н., Лопатин С. А., Варламов В. П., Рогожин С. В. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 2. С. 231—234.
87. Varlamov V. P., Lopatin S. A., Bannikova G. E. // Structure and chemistry of ribonucleases (First International Meeting)/Eds A. Pavlovsky, A. Polyakov/Moscow. 1989. P. 383—391.
88. Янков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 5. С. 757—767.
89. Янков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 9. С. 1404—1408.
90. Янков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 9. С. 1603—1608.
91. Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T. // J. Chromatogr. 1986. V. 354. № 2. P. 511—517.
92. Small D. A. P., Atkinson T. // Affinity chromatography and biological recognition// Eds Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I. Orlando: Acad. Press, 1983. P. 267—268.
93. Vijaylakshmi M. A. // Affinity chromatography and biological recognition / Eds Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I. Orlando: Acad. Press, 1983. P. 269—273.
94. Welling G. W., Slopsema K., Willing-Wester S. // J. Chromatogr. 1987. V. 397. № 1. P. 165—174.
95. Bunning R. A. D., Murphy G., Kumar S., Phillips P., Reynolds J. J. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 1. P. 75—80.
96. Abraham K. I., Joshi P. N. // J. Chromatogr. 1979. V. 168. № 2. P. 284—289.
97. Rajgopal S., Vijayalakshmi M. A. // Enzyme Microb. Technol. 1984. V. 6. № 3. P. 555—559.
98. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. // J. Chromatogr. 1987. V. 411. № 1. P. 177—184.

Поступила в редакцию
3.III.1989

S. A. LOPATIN, V. P. VARLAMOV, V. A. DAVANKOV

LIGAND-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS AND ENZYMES

A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Current state of the ligand-exchange chromatography (metal chelate affinity chromatography) of proteins and enzymes is reviewed. This technique is based on the ability of proteins to bind metal ions immobilized on chelate gels. The influence of pH, composition of buffer, type of stationary ligand and nature of metal ions on the chromatographic behaviour of proteins is discussed.