



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 18 \* № 4 \* 1992

УДК 547.953.04:[678.01:54]

© 1992 г. А. П. Каплун, Н. Б. Якунина, К. С. Айрапетян,  
В. А. Саенко\*, В. И. Швец

## ОБЩИЙ ПОДХОД К КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРИРОДНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова;  
\* Научно-исследовательский институт медицинской радиологии, Обнинск

Разработан метод ковалентной иммобилизации природных фосфолипидов на арилсодержащих матрицах (фенил-сефарозе, полистироле и т. д.) в условиях реакции алкилирования по Фриделю – Крафтсу. Для яичного фосфатидилхолина показано, что иммобилизация происходит через жирнокислотный остаток во втором положении глицерина, т. е. по двойным связям. Получены иммобилизованные таким образом фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и кардиолипин, содержащие ненасыщенные жирные кислоты. Последний сорбент использован для выделения антикардиолипиновых антител из сыворотки крови больных системной красной волчанкой.

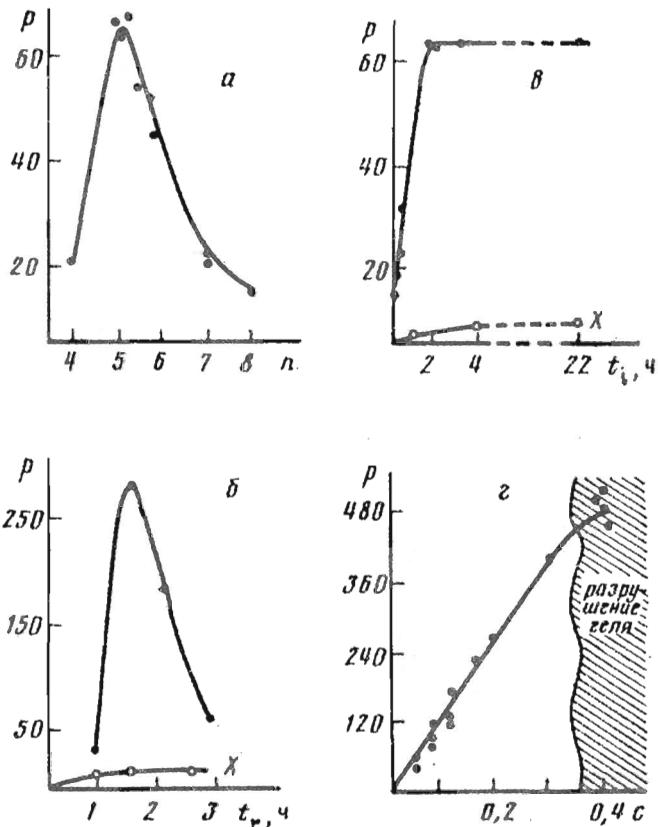
Ковалентная иммобилизация глицерофосфолипидов обычно осуществляется двумя путями: с использованием функциональных групп полярной части молекул или введением их в гидрофобную область [1, 2]. В первом случае полярная часть модифицируется и, кроме того, оказывается экранированной для взаимодействующих с лигандом биомолекул [3, 4]. Введение функциональных групп в гидрофобную область связано с дополнительными химическими превращениями для сохранения реакционноспособных групп полярной части фосфолипидов и осуществляется в несколько стадий. Это является серьезным препятствием для иммобилизации ФЛ, отличных от ФХ.

Нами предложено [5] использовать для иммобилизации природных ФЛ двойные связи их жирнокислотных остатков. Анализ возможных реакций двойных связей, подходящих для иммобилизации и не затрагивающих фосфатных, гидрокси-, карбокси- и аминогрупп ФЛ, показал, что наиболее перспективна реакция алкилирования природными ФЛ арилсодержащих матриц. Такая возможность модификации двойных связей природных ФЛ была показана нами ранее при получении флуоресцентных аналогов ФЛ [6, 7] – в условиях реакции Фриделя – Крафтса образуются С–С-связи с ароматическими соединениями, при этом сохраняется основная структура ФЛ.

В качестве исходных матриц были использованы: полисахаридные носители (фенил-сефароза CL-4B (1) [5], целлюлозы, ацилированные жирноароматическими кислотами (2–4)), полистиролы (поперечно-сшитый полисорб-5 (5) и линейные с различной молекулярной массой (6)–(8)).

Основные условия иммобилизации на примере ФХ (9) были отработаны на фенил-сефарозе как наиболее лабильной матрице. Было пока-

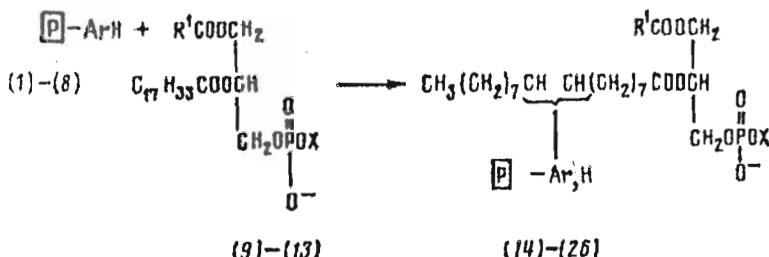
Сокращения: ФЛ – фосфолипиды, КЛ – кардиолипин, ФГ – фосфатидилглицерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ФС – фосфатидилсерин, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ДПФХ – дипальмитоилфосфатидилхолин, DMF – диметилформамид.



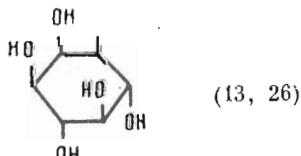
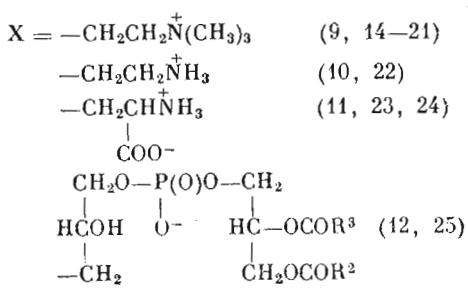
Зависимость степени иммобилизации ФХ на фенил-сепарозе-CL-4В от условий реакции: *a* – от количества молей  $\text{AlCl}_3$  ( $n$ ) на моль ФХ при времени инкубации ( $t_1$ ) 1,5 ч и времени реакции ( $t_r$ ) 1,5 ч; загрузка ФХ ( $c$ ) 0,06 ммоль/мл геля; *b* – от времени реакции ( $t_r$ , ч) при  $n=5$ ,  $t_1=0$ ,  $c=0,06$ ; *c* – от времени инкубации до прибавления  $\text{AlCl}_3$  ( $t_1$ , ч) при  $n=5$ ,  $t_r=1,5$ ,  $c=0,06$ ; *d* – от загрузки ФХ ( $c$ , ммоль/мл геля) при  $n=5$ ,  $t_1=1,5$ ,  $t_r=1,5$ . Кривая  $X$  отмечает уровень остаточной неспецифической сорбции ФХ; *b* – на высушеннем сорбенте, *c* – на геле.  $P$  – степень иммобилизации, мкмоль ФХ/г сухого геля

зано: 1) использование хлористого алюминия приводит к лучшим выходам по сравнению с хлористым оловом; более активный бромистый алюминий разрушает гелевую структуру матрицы; 2) лучшие результаты наблюдаются при 5-кратном мольном избытке катализатора по отношению к ФЛ (рисунок, *a*); степень иммобилизации на предварительно высушеннной фенил-сепарозе в 4–5 раз выше, чем на геле, переводимом в дихлорэтан последовательными промывками по схеме: водный ацетон – ацетон – дихлорэтан, но в первом случае матрица теряла способность давать гелевую структуру; 3) оптимальное время реакции 1,5 ч (рисунок, *b*), при его увеличении на степень иммобилизации заметно сказывается деградация лиганда; 4) степень иммобилизации зависит от порядка загрузки реагентов: так, при предварительной инкубации геля с ФЛ перед добавлением катализатора результаты иммобилизации лучше, чем при одновременной загрузке ФХ и хлористого алюминия, – 1,5 ч предварительной инкубации, по всей видимости, является оптимальным (рисунок, *c*); очевидно, за это время происходит наиболее полное распределение ФХ в геле, что и приводит к увеличению степени иммобилизации в 4 раза; 6) степень иммобилизации растет

практически линейно при увеличении загрузки ФЛ (рисунок, г), но использование более 0,3 ммоль ФХ на 1 мл геля (при оптимальном 5-кратном мольном избытке катализатора) приводит к разрушению гелевой структуры фенил-сепарозы из-за большой концентрации хлористого алюминия; по этой же причине объем реакционной смеси должен превышать в 4–5 раз объем исходного геля; 7) лучшим способом удаления катализатора оказалась промывка сорбента от нековалентно связанного ФЛ достигается спиртом и(или) раствором тритона X-100; 8) наиболее полная отмыка сорбента от нековалентно связанного ФЛ достигается спиртом и(или) раствором тритона X-100; 9) остаточная неспецифическая сорбция, определяемая по содержанию фосфора в образцах, полученных в контрольных опытах (без катализатора), находится на пределе чувствительности определения и составляет не более 4 мкмоль/г или 0,1 мкмоль/мл (рисунок, в).



фенил-сепароза (1, 14, 22, 23, 25, 26)  
 фенилацетил-целлюлоза (2, 15)  
 пиренилундеканоил-целлюлоза (3, 4, 16, 17)  
 полисорб-5 (5, 18, 24)  
 полистирол 1,5 МДа (6, 19)  
 полистирол 56 кДа (7, 20)  
 полистирол 16 кДа (8, 21)



Таким образом, при иммобилизации ФХ (9) на фенил-сепарозе (1) в указанных условиях с гелем связывается в среднем 4% используемого ФЛ, при этом модифицируется до 25% арильных групп матрицы (исходная фенил-сепароза CL-4В содержит ~40 мкмоль лиганда /мл геля). Не вступивший в реакцию ФХ может быть выделен колоночной хроматографией на силикагеле с ~70% выходом для дальнейшего использования.

Таблица I

## Иммобилизация ФЛ на полисахаридных и полистирольных матрицах

Мат- рица	ФЛ	Соотношение ФЛ/матрица в реакции, ммоль/г	Растворитель	Содержание Р в продукте		Сорбенты
				мкмоль/г	мкмоль/л	
1	ФХ	2,4—16	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	64—520	1,6—10	14
1	ФЭ	4—8,2	»	—	6—14	22
1	ФС	2,2	»	—	1,5	23
1	КЛ	4,8—5,6	»	—	5,2—8,5	25
1	ФИ	3,6	»	—	15	26
2	ФХ	1,4—2,3	»	96—140	9,1—13	15
3	»	0,75	»	25	2,7	16
4	»	0,85	»	34	4,4	17
5	»	0,24—12	»	12—140	3,0—34	18
5	ФС	0,89	»	20	5,0	24
6	ФХ	2,2—3,0	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	160—370	—	19
6 *	»	2,6	»	Образуется гель		—
7	»	4,3	»	166	—	20
8	»	2,2	»	205	—	21
**	ФХ	13	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	—	3,1	—
**	ДПФХ	7,8	»	5	0,1	—
***	ФХ	2,6	»	—	1,3	—

\* Мольное соотношение AlCl<sub>3</sub>/ФЛ равно 6, в остальных случаях — 5.

\*\* Сефароза CL-4B.

\*\*\* Гранулированная целлюлоза.

Эксперименты с другими ФЛ — ФЭ (10) из яйца, ФС (11) из бычьего мозга, КЛ (12) из сердца крупного рогатого скота, ФИ (13) из пекарских дрожжей — показали общий характер предлагаемого метода иммобилизации для фосфолипидных молекул с различным строением полярной части (табл. 1). Наименьшая степень иммобилизации наблюдалась для ФС: из-за плохой растворимости этого ФЛ в дихлорэтане не удалось создать необходимую концентрацию. В случае КЛ требовалась более длительная отмычка модифицированного носителя (25).

Помимо фенил-сефарозы нами использовались арилсодержащие целлюлозы (2)—(4). Матрицы (3), (4) были получены ацилированием гранулированной целлюлозы имидазолидом пиренилундекановой кислоты [7]. Степень ацилирования составляла 0,9 и 1,6 мкмоль/мл для матриц (3) и (4) соответственно. Носитель (2) получали ацилированием хлорангидридом фенилуксусной кислоты макропористой целлюлозы (степень ацилирования 380 мкмоль/г). Степень ацилирования определяли спектрофотометрически, а также титрометрически после гидролитического отщепления остатков жирноароматических кислот [8].

Было продемонстрировано, что в найденных условиях яичный ФХ присоединяется к арилцеллюлозным матрицам. Фенилацетил-целлюлоза (2) давала при этом сорбент (15), по свойствам близкий к аналогичным ФХ-содержащим матрицам (14) (степень иммобилизации 9—13 мкмоль/мл). Неожиданные результаты получались на матрицах (3), (4) с низким содержанием арильных групп. Количество иммобилизованного ФЛ в сорбентах (16), (17) оказалось больше количества пиренильных групп. Были проведены контрольные эксперименты с гранулированной целлюлозой и сефарозой CL-4B, не содержащими ароматических групп. Они показали, что в присутствии хлористого алюминия с этими полисахаридными матрицами связывается 30—40% от количества яичного ФХ, иммобилизующегося в тех же условиях на носителях, модифицированных арильными группами. Уменьшение содержания фосфора в полу-

ченных образцах на  $82 \pm 7\%$  после инкубации их с препаратом фосфолипазы А<sub>2</sub> в присутствии тритона X-100 и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  указывает на то, что преобладающая часть ФХ связывается через ацильный остаток во 2-м положении ФЛ.

Нами была также показана возможность использования для иммобилизации ФЛ предлагаемым методом полистирольных матриц: полисорб-5 (макропористый сшитый дивинилбензолом полистирол) и линейные, растворимые в органических растворителях полистиролы. Условия модификации фенил-сесфарозы оказались пригодными для иммобилизации ФЛ на полисорбе-5 (5). Были получены препараты иммобилизованных ФХ (18) и ФС (24) (табл. 1). Большая механическая и химическая стойкость этой матрицы позволила варьировать условия реакции в более широких пределах, чем для фенил-сесфарозы, и оценить емкость данной матрицы по ФХ (а также значительно упростить подготовку сорбента к иммобилизации, промывки его при обработке продуктов реакции). Наибольшая достигнутая степень иммобилизации ФХ на полисорбе (140 мкмоль/г) составляет 11% от максимально возможного значения, рассчитанного исходя из удельной поверхности сорбента ( $444 \text{ м}^2/\text{г}$ ).

Другая принципиальная возможность получить полистирольные носители с иммобилизованными ФЛ — проведение алкилирования в гомогенной среде растворимого полистирола. Были использованы полистиролы (6), (7), (8) с молекулярной массой 1,5 млн., 56 тыс. и 19 тыс. Да соответственно. В качестве растворителя использовали смесь дихлорэтана и нитрометана, в которой растворялись все компоненты реакции. Наибольшие количества ФХ иммобилизовывались при соотношении ФЛ — катализатор 1:5. При большем избытке катализатора, как было показано ранее [7], происходит значительная деградация ФЛ.

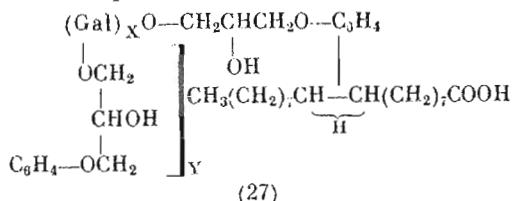
Также было замечено, что кроме присоединения ФХ к полимеру происходит сшивание молекул полимера, особенно в случае высокомолекулярного полистирола (6), что при 6-кратном избытке катализатора приводит к образованию геля во время реакции.

Степень иммобилизации, приблизительно равная максимальной для полисорба (162–366 мкмоль/г), достигается при концентрациях на порядок меньших, чем для нерастворимого полистирола. Это соответствует модификации одного из 60–21 стирольных остатков. В отсутствие хлористого алюминия иммобилизация ФХ не наблюдается.

Для установления структуры модифицированных ФЛ матриц (в первую очередь для подтверждения ковалентного характера связи лиганд—матрица и выяснения места присоединения в ФЛ) были использованы: ферментативный гидролиз фосфолипазой А<sub>2</sub>, кислотный и щелочной гидролиз с последующим анализом образующихся продуктов.

Тот факт, что в одних и тех же условиях происходит иммобилизация на различных арилсодержащих матрицах природных ФЛ, различающихся строением полярной части, указывает на то, что связывание с полимером происходит по гидрофобной области ФЛ. Доказательства были получены при обработке образцов сорбентов с иммобилизованным ФХ фосфолипазой А<sub>2</sub>: за 3–4 мии инкубации с ферментом при 37° С в присутствии тритона X-100 и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  количество фосфора на сорбентах уменьшалось на  $90 \pm 5\%$ . Это свидетельствует, во-первых, о сохранении структуры липидного лиганда в условиях иммобилизации, во-вторых, о доступности полярной части ФХ для образования комплекса иммобилизованного субстрата с ферментом (и следовательно, о связывании ФЛ с носителем своей гидрофобной частью), в-третьих, о локализации образовавшейся связи в основном во втором жирноненасыщенном остатке, что соответствует распределению ненасыщенных жирных кислот в яичном ФХ [9].

В случае сорбентов на основе фенил-сепарозы (14) нам удалось получить прямое доказательство ковалентной природы связи ФЛ с матрицей. После часового гидролиза сорбента (14) и параллельно исходной фенил-сепарозы (1) 80%-ной муравьиной кислотой [10] с помощью ТСХ сравнивали продукты гидролиза, поглощающие при 254 нм. Препаративной ТСХ из гидролизатов сорбента (14) были выделены вещества, отсутствующие в гидролизате фенил-сепарозы (1). В спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР этих соединений обнаружены сигналы протонов углеводного, ароматического участков и жирнокислотных остатков. Эти соединения, следовательно, представляют собой продукты, включающие в себя участки фенил-сепарозы и жирные кислоты, т. е. фрагменты типа (27)



Удалось выделить три фракции с  $R_f$ , 0,15 (А), 0,45 (Б) и 0,50 (В) в системе хлороформ — метанол (9 : 1), различающиеся интенсивностью сигналов ароматических протонов, протонов  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}-$  и жирнокислотных остатков. По этим данным, мольное соотношение моносахарид — фенильная группа — жирная кислота 6 : 3 : 1 для фракции А, 2 : 1 : 1 для фракции Б, 1 : 1 : 1 для фракции В.

Щелочной гидролиз сорбента (14) подтвердил сохранение структуры фосфолипидного лиганды. В гидролизате щелочного дезацилирования [8] определяли количество фосфора и жирных кислот. Полученное мольное соотношение фосфор — жирные кислоты составляло  $0,98 \pm 0,08$ , что хорошо совпадает с ожидаемым результатом в случае иммобилизации молекул ФХ (а не его фрагментов) через один из жирнокислотных остатков. Для подтверждения ключевой роли связей  $\text{C}=\text{C}$  в связывании ФЛ с матрицей проводили в стандартных условиях иммобилизацию на фенил-сепарозе дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Содержание фосфора на полученном сорбенте не превышало 0,3 мкмоль/мл геля, что соответствует неспецифической сорбции природных ФХ.

Приведенный набор экспериментальных данных дает возможность утверждать, что в условиях реакции Фриделя — Крафтса природные ФЛ ковалентно присоединяются жирнокислотными цепями к матрицам, содержащим ароматические остатки, причем ключевая роль в связывании принадлежит двойным связям ФЛ.

Получающиеся модифицированные полимеры могут быть использованы, в частности, для аффинного выделения белков, имеющих средство к отдельным классам фосфолипидов. Так, из  $\gamma$ -глобулиновой фракции сыворотки крови больных системной красной волчанкой были выделены анти-КЛ-антитела на КЛ-фенил-сепарозе (25). После удаления балластных белков в фосфатно-солевом буфере анти-КЛ-антитела элюировали 2,5 М раствором хлористого магния. По данным иммуноэлектрофореза, в выделенной фракции присутствовали только IgG и IgM; при этом наблюдалось увеличение иммунологической активности по сравнению с исходным  $\gamma$ -глобулином: IgG — в 18 раз, IgM — в 5 раз (табл. 2).

#### Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-240 (Япония), спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР — на импульсном фурье-спектрометре Bruker WH-250 (ФРГ). ТСХ осуществляли на силифоле UV-254 (ЧСФР) в

Таблица 2

**Результаты ИФА в исходной фракции γ-глобулинов и после выделения анти-КЛ-антител на сорбенте (25)**

Разведе- ние: образцов	Оптическая плотность при 405 нм			
	Исходный γ-глобулин, начальная концентрация белка 4,12 мг/мл		Анти-КЛ-антитела, начальная концентрация белка 0,19 мг/мл	
	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M
2	0,666	—	0,906	—
4	0,561	—	0,751	—
8	0,419	—	0,614	1,886
16	0,298	1,395	0,517	1,127
32	0,220	1,010	0,417	0,577
64	0,139	0,674	0,271	0,394
128	0,083	0,355	0,190	0,140
256	—	0,254	0,118	—

системах: петролейный эфир — эфир, 1 : 1 (А), 3 : 1 (Б), хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4 (В), хлороформ — метанол, 9 : 1 (Г). Для обнаружения веществ использовали: УФ-облучение (а), пары иода (б), про-каливание (в), молибденовый синий (г). Для колоночной хроматографии применяли силикагель L 100/160 (Chemapol, ЧСФР), для препаративной ТСХ — силикагель LSL<sub>254</sub> 5/40 (Chemapol, ЧСФР).

В работе использованы выделенные на Харьковском предприятии по производству бактериальных препаратов из природных источников коммерческие ФЛ: яичный ФХ, ФС из бычьего мозга, КЛ из сердечной мышцы крупного рогатого скота, ФИ из пекарских дрожжей. ФЭ выделяли из яичного желтка [9]. ДПФХ получали по стандартной методике [9].

В качестве исходных матриц использовали: фенил-сефарозу CL-4B (Pharmacia, Швеция; содержание фенильных групп 40 мкмоль/мл геля), полисорб-5 (5) (полистирол, смешанный дивинилбензолом (60%) в присутствии порообразователя (бензина БЛХ, 100%);  $d_{\text{пер}} = 1000 \text{ \AA}$ ,  $S_{\text{уд}} = 444 \text{ м}^2/\text{г}$ , насыпной вес 250 мг/см<sup>3</sup>)\*, полистиролы (6)–(8)\*\* с молекулярной массой 1,5 млн., 56 тыс. и 19 тыс. Да и гранулированную целлюлозу (95% пористости)\*\*\*.

В работе также использовали карбонилдиимиазол (Sigma, США), БСА (Serva, ФРГ), реагент Фолина (Fluka, Швейцария).

Концентрацию белка определяли по Лоури [11] и по поглощению растворов при 280 нм. Содержание ФЛ на сорбентах и в растворах определяли по содержанию фосфора по методике [8], используя в первом случае полуторное количество хлорной кислоты.

Подготовка полимеров перед модификацией заключалась в переводе их в соответствующий растворитель. Для гелеобразных сорбентов 1 объем водного геля промывали на фильтре 5 объемами водного ацетона, 10 объемами ацетона, 10 объемами сухого ацетона, 10 объемами сухого дихлорэтана (перед иммобилизацией ФЛ) или сухого DMF (перед ацилированием целлюлозы). Не давая гелю высокнуть, его переносили в реакционную колбу. Полисорб (250 мг) промывали на фильтре петролейным эфиром (20 мл) и сухим бензолом (20 мл), затем сушили в вакууме 2 ч. Непосредственно перед реакцией павеску полисорба промывали сухим ацетоном и сухим дихлорэтаном.

\* Синтезирован научным сотрудником А. С. Завадовской (НПО «Пластмассы» Москва).

\*\* Воронежский завод СК.

\*\*\* Сорбент получен Р. М. Норейка («Литфарм», Каунас).

**Фенилацетил-целлюлоза (2).** К 20 мл суспензии в DMF, содержащей 9 мл геля гранулированной целлюлозы, добавляли 6 мл пиридина и 0,67 мг (5,0 ммоль) хлорангидрида фенилуксусной кислоты (т. кип. 69–71° С при 2 мм рт. ст.). Реакционную массу перемешивали 11 ч при 95–100° С, переносили на фильтр и промывали (по 4 объема) DMF, 0,1 н. NaHCO<sub>3</sub>, водой, ацетоном и эфиром. Затем сорбент переводили в воду по схеме: ацетон – водный ацетон – вода. Получали 5,2 мл геля целлюлозы (2), содержащего 3,8 ммоль фенилацетата/г (0,36 ммоль/мл), содержание которого определяли как по поглощению в УФ-спектре (257 нм), так и титрованием после щелочного гидролиза [8].

**Пиренилундеканоил-целлюлозы (3), (4).** К раствору 967 мл (2,51 ммоль) 10(11)-(4-пиренил)ундекановой кислоты [4] в 7 мл DMF при перемешивании добавляли порциями 529 мл (3,36 ммоль) карбонил-диimidазола, затем через 18 ч 20 мл суспензии 10 мл гранулированной целлюлозы в DMF. Смесь встряхивали 14 ч при 90–95° С. После охлаждения сорбент промывали на фильтре (по 4 объема) DMF, водой, ацетоном, эфиром. Полноту удаления непрореагированного лиганда контролировали ТСХ в системе Б, обнаружение – в УФ-свете. Сорбент (3) переводили в воду как описано в предыдущем опыте. Получали 5 мл геля целлюлозы (3) с содержанием ацильных остатков 8,0 мкмоль/г (0,88 мкмоль/мл).

При увеличении количества лиганда до 2,18 г на 9,8 мл целлюлозы в тех же условиях получали 5 мл геля (4) с содержанием пиренилундекановых остатков 12 мкмоль/г (1,6 мкмоль/мл). Содержание последних на сорбентах (3), (4) определяли по УФ-поглощению в хлороформных экстрактах щелочного гидролизата сорбентов (342 нм).

### Иммобилизация ФЛ на фенил-сефарозе CL-4B (1)

**Сорбент (14).** К суспензии 2 мл (50 мг) фенил-сефарозы в 5–6 мл дихлорэтана добавляли 0,9–6,1 мл 10% раствора ФХ (9) в дихлорэтане (0,12–0,80 ммоль), встряхивали 1,5 ч при 20° С. Затем прибавляли при перемешивании порциями 5-кратный избыток AlCl<sub>3</sub> (80–534 мг), встряхивали еще 1,5 ч, добавляли 10 мл водного ацетона, встряхивали и переносили на фильтр. Промывали 20–30 мл водного ацетона, 10 мл ацетона, 10–20 мл хлороформа, 10 мл ацетона, 20–40 мл 0,25% тритона X-100 (или спирта) и водой. Содержание лиганда на сорбентах типа (14) составляло 64–520 мкмоль/г сухого геля (1,6–10 мкмоль/мл геля). Сорбенты с содержанием лиганда более 400 мкмоль/г гель не образовывали (рисунок, г).

**Сорбенты (22).** К суспензии 1 мл фенил-сефарозы в 4 мл дихлорэтана добавляли 0,7–1,5 мл 10% раствора ФЭ (10) в дихлорэтане (0,10–0,21 ммоль), встряхивали 1,5 ч при 20° С, прибавляли порциями 67–140 мг AlCl<sub>3</sub> (5-кратный избыток). Дальнейшие операции осуществляли как в предыдущем опыте. Содержание лиганда на сорбентах типа (22) составляло 6,0–14 мкмоль/мл геля.

**Сорбент (23).** Раствор 93 мг (0,11 ммоль) ФС (11) в 7 мл дихлорэтана встряхивали 1,5 ч при 20° С с суспензией 2 мл фенил-сефарозы в 7 мл дихлорэтана, добавляли 73 мг AlCl<sub>3</sub> и встряхивали еще 1,5 ч. Обработку реакции осуществляли как описывалось для сорбентов (14). Полученный в виде геля сорбент (23) содержал 1,5 мкмоль лиганда/мл геля.

**Сорбенты (25).** К суспензии, содержащей 2 мл фенил-сефарозы в 5 мл дихлорэтана, добавляли 3,5–4,0 мл 10% раствора КЛ (12) в дихлорэтане (0,24–0,28 ммоль), встряхивали 1,5 ч при 20° С, добавляли 160–190 мг AlCl<sub>3</sub>. Дальнейшие операции осуществляли как для сорбента (14), но после промывки раствором детергента сорбент оставляли на 10 ч в 20 мл

смеси 0,25% тритон X-100 — спирт (1 : 1), затем дестергент отмывали водным спиртом. Сорбенты типа (23) получали в виде гелей с содержанием лиганда 5,2—8,5 мкмоль/мл геля.

*Сорбент (26).* Смешивали 2 мл фенил-сефарозы в 5 мл дихлорэтана и 1,3 мл 12% раствора ФИ (13) в дихлорэтане (0,18 ммоль), встряхивали 1,5 ч при 20° С, добавляли 118 мг (0,88 ммоль) AlCl<sub>3</sub>. Обработку осуществляли как для сорбента (14). Сорбент (26) получали в виде геля с содержанием лиганда 15 мкмоль/мл.

#### *Иммобилизация ФХ (9) на модифицированных целлюлозах (2) — (4)*

*Сорбент (16).* К суспензии 1 мл (110 мг) пиренилцеллюлозы (3) с содержанием пиренильных остатков 8 мкмоль/г в 4 мл дихлорэтана добавляли 63 мг (82 мкмоль) ФХ (9) в 1 мл дихлорэтана, встряхивали 1,5 ч при 20° С, добавляли 55 мг (413 мкмоль) AlCl<sub>3</sub>, и встряхивали еще 1,5 ч. Дальнейшие операции осуществляли как для сорбента (14). Получали сорбент (16) со степенью иммобилизации лиганда 25 мкмоль/г (2,7 мкмоль/мл геля). *Сорбент (17)* со степенью иммобилизации ФХ 34 мкмоль/г (4,4 мкмоль/мл геля) получали из модифицированной целлюлозы (4) при загрузке ФХ 0,110 мкмоль/мл геля аналогично сорбенту (16).

*Сорбент (15)* со степенью иммобилизации ФХ 96—140 мкмоль/г (9,1—13 мкмоль/мл геля) получали из 1 мл (95 мг) фенилацетил-целлюлозы (2), 100—172 мг (0,13—0,22 ммоль) ФХ и 90—151 мг (0,68—1,13 ммоль) AlCl<sub>3</sub> аналогично сорбенту (14).

#### *Иммобилизация ФЛ на полисорба-5 (5)*

*Сорбенты (18).* К смеси 50 мг (0,2 мл) полисорба-5 в 2—3 мл дихлорэтана добавляли 0,09—4,7 мл 10% раствора ФХ (12—610 мкмоль) в дихлорэтане, встряхивали 1,5 ч при 20° С, добавляли порциями 8—414 мг AlCl<sub>3</sub> (5-кратный избыток), встряхивали еще 1,5 ч, добавляли 5 мл водного ацетона, перемешивали и переносили на фильтр. Сорбент промывали 10 мл водного ацетона, 5 мл ацетона, 15 мл хлороформа, 5 мл ацетона, 20 мл 0,25% тритона X-100 и 10 мл водного спирта. Модифицированный полистирол (18) содержал 12—140 мкмоль лиганда/г (3,0—34 мкмоль/мл).

*Сорбент (24)* получали при загрузке ФС (11) 0,89 мкмоль/г полисорба-5 аналогично сорбенту (23); сорбент промывали как в предыдущем опыте. Степень иммобилизации ФС на сорбенте (24) составляла 20 мкмоль/г (5,0 мкмоль/мл).

#### *Иммобилизация ФХ (9) на растворимых полистиролах (6) — (8)*

*Сорбент (19).* К раствору 132 мг полистирола (6) и 309 мг (0,402 ммоль) ФХ (9) в 10,5 мл дихлорэтана по каплям прибавляли раствор 265 мг (1,99 ммоль) AlCl<sub>3</sub>, в 0,5 мл нитрометана, перемешивали 2,5 ч, добавляли 2 мл ацетона и 0,5 мл воды. Реакционную смесь оставляли на 24 ч при —4° С и центрифугировали 15 мин при 90 g. К супернатанту добавляли 10 мл ацетона, выдерживали 1 ч при —4° С и снова центрифугировали. Осадки объединяли, диспергировали в 30 мл спирта, центрифугировали, осадок снова промывали спиртом до исчезновения в супернатанте ФХ (TCX). Получали 165 мг сорбента (19) со степенью иммобилизации 370 мкмоль/г. Объединенные супернатанты упаривали, растворяли в 3 мл дихлорэтана и 3 мл спирта осаждали непрореагировавший полимер. После отмычки его от ФХ спиртом содержание фосфора в нем не превышало 0,2 мкмоль/г.

При загрузке 128 мг полистирола (6), 215 мг (0,280 ммоль) ФХ (9) и 137 мг (1,03 ммоль)  $\text{AlCl}_3$ , в тех же условиях получали 83 мг сорбента (19) с содержанием лиганда 160 мкмоль/г.

*Сорбент (20).* К раствору 66 мг полистирола (7) и 216 мг (0,281 ммоль) ФХ (9) в 10,5 мл дихлорэтана прибавляли раствор 184 мг (1,38 ммоль)  $\text{AlCl}_3$  в 0,5 мл нитрометана. После перемешивания в течение 2,5 ч при 20° С в смесь добавляли 2 мл ацетона и 0,5 мл воды. Реакционную смесь оставляли на 24 ч при -4° С и центрифугировали 15 мин при 90 g. К супернатанту добавляли 12 мл ацетона, после 1 ч выдерживания при -4° С снова центрифугировали. Осадки объединяли и промывали его 25 мл спирта. Получали 29 мг сорбента (20) со степенью иммобилизации 166 мкмоль/г.

*Сорбент (21).* К раствору 134 мг полистирола (8) и 226 мг (0,294 ммоль) ФХ (9) в 10,5 мл дихлорэтана прибавляли раствор 193 мг (1,45 ммоль)  $\text{AlCl}_3$  в 0,5 мл нитрометана. После перемешивания в течение 2,5 ч в реакционную массу добавляли 2 мл ацетона и 0,5 мл воды, выдерживали 24 ч при -4° С, фильтровали через полипропиленовую мембрану ( $d_{\text{пор}}=0,17$  мкм). К фильтрату добавляли 2 мл ацетона, 4 мл спирта и 2,5 мл воды, выдерживали при -4° С, снова фильтровали. Получали 121 мг сорбента (21), содержащего 205 мкмоль ФХ/г.

*Кислотный гидролиз модифицированной (14) и немодифицированной (1) фенил-сепарозы.* К 100 мг высущенного сорбента (14) добавляли 20 мл 80%  $\text{HCOOH}$  и кипятили 1 ч, затем кислоту отгоняли. Остаток растворяли в 8 мл хлороформа и промывали водой (3×5 мл). Водные фракции объединяли и экстрагировали хлороформом (3×10 мл). Хлороформные экстракты объединяли и упаривали. Подобным образом гидролизовали исходную фенил-сепарозу CL-4B. Из гидролизатов сорбента (14) выделяли препаративной ТСХ в системе Г (обнаружение в УФ-свете) вещества с  $R_f$  0,14–0,16 (фракция I), 0,44–0,46 (фракция II) и 0,49–0,51 (фракция III), отсутствующие в гидролизате фенил-сепарозы.

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д., относительная интенсивность): фракция I: 7,2–6,9 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 1; 4,4–3,5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ , CHO), 5; 2,3–0,8 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2,4; фракция II: 7,0–6,8 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 1; 4,4–3,3 ( $\text{CH}_2$ , CH), 3,7; 2,3–0,8 ( $\text{CH}_2$ , CH), 7,6; фракция III: 7,0–6,8 ( $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 1; 4,2–3,3 ( $\text{CH}_2\text{O}$ , CHO), 4,4; 2,3–0,8 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 6,6.

*Щелочной гидролиз модифицированной фенил-сепарозы (14).* К 16 мг сорбента (14), содержащего 0,17 мкмоль липида/мг, добавляли 1 мл 0,3 н. раствора  $\text{NaOH}$  в 90% метаноле, кипятили 3 ч. После охлаждения сорбент отфильтровывали, промывали 10 мл 90% метанола и 10 мл хлороформа, фильтрат упаривали, к остатку добавляли 8 мл хлороформа, подкисляли 3 мл 0,1 н.  $\text{HCl}$ , промывали 5 мл воды. Водный слой экстрагировали хлороформом (3×5 мл), экстракты упаривали. Остаток растворяли в 2 мл петролейного эфира и определяли содержание жирных кислот титрованием 1,3 мМ раствором  $\text{NaOH}$  в 90% метаноле [8]. Ошибка титрования, определяемая в контрольном опыте с растворами пальмитиновой кислоты, не превышала 8%. В водном слое определяли фосфор. Содержание жирных кислот в образце  $2,78 \pm 0,14$  мкмоль, содержание фосфора  $2,82 \pm 0,07$  мкмоль.

*Ферментативный гидролиз иммобилизованных на сорбентах (14), (15) и (18) фосфолипидов* проводили в терmostатированной ячейке автоматического титратора и по изменению pH среды контролировали образование продуктов гидролиза. 20–25 мг сорбента суспендировали при 37° С в 2 мл раствора, содержащего 12 мМ тритон X-100 и 10 мМ  $\text{CaCl}_2$ . При перемешивании добавляли по 25–50 мкл водного раствора фермента (1 мг яда осы/мл), всего 150 мкл. За 3–4 мин гидролиз заканчивается (при последующем добавлении ферментного раствора в ячейку не наблюдается изме-

пение рН). Гидролизат переносили на фильтр, сорбент отфильтровывали и промывали 10 мл воды, 10 мл спирта, 5 мл эфира, сушили и анализировали на содержание фосфора: для сорбента (14) содержание фосфора уменьшилось с 440 до 20 мкмоль/г, для сорбента (15) — с 58 до 5 мкмоль/г.

**Иммобилизация ФЛ на немодифицированных полисахаридных матрицах.** К 1 мл (24 мг) геля сефарозы CL-4B в 5 мл дихлорэтана добавляли 137 мг (0,187 ммоль) ДПФХ в 5 мл дихлорэтана, встряхивали 1,5 ч при 20° С. Затем при перемешивании порциями прибавляли 125 мг (0,94 ммоль) AlCl<sub>3</sub>. Дальнейшие операции осуществляли по методике, описанной для сорбента (14). Содержание фосфора в полученном сорбенте 5 мкмоль/г (0,1 мкмоль/мл).

Аналогично из 240 мл (0,312 ммоль) яичного ФХ, 1 мл сефарозы CL-4B и 207 мг (1,55 ммоль) AlCl<sub>3</sub>, получали сорбент, содержащий 3,1 мкмоль ФХ/мл геля (после обработки фосфолипазой A<sub>2</sub> 0,8 мкмоль/мл).

Аналогично из 110 мл (0,143 ммоль) яичного ФХ, 1 мл гранулированной целлюлозы и 95 мг (0,713 ммоль) AlCl<sub>3</sub>, получали сорбент, содержащий 1,3 мкмоль ФХ/мл геля (0,3 мкмоль/мл после обработки фосфолипазой A<sub>2</sub>).

**Выделение аффинных антител к КЛ.** 25 мл сыворотки крови больного системной красной волчанкой с высоким титром антител к КЛ трижды переосаждали насыщенным раствором сульфата аммония до насыщения 40, 33 и 33% соответственно. Отцентрифугированный осадок после третьего осаждения растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, 0,15 М NaCl, 0,01 М фосфат, pH 7,3), диализовали против трех смен по 3 л ФСБ при 4° С. Конечная концентрация раствора  $\gamma$ -глобулина 4,12 мг/мл, объем 50 мл. 3 мл сорбента (25) переносили в стакан с 40 мл раствора  $\gamma$ -глобулина в ФСБ и осторожно перемешивали механической мешалкой 1,5 ч при 20° С. Сорбент переносили в колонку и несвязавшийся белок отмывали ФСБ до оптического поглощения элюента <0,02 при 280 нм. Элюцию адсорбированного белка осуществляли раствором MgCl<sub>2</sub> до оптического поглощения <0,02 (280 нм). Собранный фракцию (12 мл) диализовали против трех смен по 3 л ФСБ при 4° С и концентрировали на мемbrane PM-30 (Amicon, США) до объема 2 мл. Концентрация белка в растворе 490 мкг/мл. Выделенные белки, охарактеризованные иммуноэлектрофорезом по Оукхерлони [12], представляют собой смесь иммуноглобулинов классов G и M.

**Иммуноферментный анализ антител к КЛ.** КЛ наносили на поверхность лунок для ИФА (Nunc, Дания) из спиртового раствора с концентрацией 80 мкг/мл по 25 мкл на лунку. Спирт испаряли из лунок в течение ночи при 4° С. Плашки промывали 3 раза ФСБ по 150 мкл на лунку и блокировали места неспецифической сорбции, для чего в каждую лунку приливали по 75 мкл 10% раствора сыворотки крови крупного рогатого скота в ФСБ и инкубировали 1 ч при 20° С. Затем лунки промывали ФСБ (150 мкл на лунку) и вносили в них исследуемые образцы (по 50 мкл, двукратная повторность) исходного  $\gamma$ -глобулина и аффинно выделенных антител в последовательных двукратных разведениях, инкубировали 1 ч при 20° С. Разведение проводили в 10% сыворотке крови крупного рогатого скота в ФСБ. После инкубации все лунки промывали 3 раза по 150 мкл на лунку ФСБ и вносили в них в объеме 50 мкл на лунку раствор конъюгатов антител к IgG или IgM человека с пероксидазой хрена (ПХ). Рабочее разведение конъюгатов анти-IgG человека-ПХ (Sevac, ЧСФР) и анти-IgM человека-ПХ (Sevac, ЧСФР) — 1 : 2000 в 10% сыворотке крови крупного рогатого скота в ФСБ. После часовой инкубации лунки промывали 3 раза по 150 мкл на лунку ФСБ и вносили по 50 мкл на лунку 1 М раствора субстрата — 2,2'-азино-ди-(3- этилбензтиазолин-сульфата) (ABTS, Boehringer Mannheim, Австрия) в фосфат-цитратном

буфере, pH 4,3, содержащем 0,002% (по объему)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После 30 мин инкубации реакцию останавливали добавлением по 50 мкл на лунку 0,1 M раствора лимонной кислоты и измеряли оптическое поглощение с помощью денситометра для планшет ИФА (Titertek Multiscan, Flou, Великобритания) при 405 нм (результаты см. в табл. 2).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Остапенко О. В., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1445–1468.
2. Каплун А. П., Якупина Н. Б., Швец В. И. // Биотехнология. 1991. № 6. С. 33–39.
3. Rock C. O., Snyder F. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 16. P. 6564–6566.
4. Okumura T., Kimura S., Saito K. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 617. № 2. P. 264–273.
5. Якупина Н. Б., Каплун А. П., Швец В. И. Способ получения сорбентов для выделения липидзависимых белков. А. с. 1409319 СССР // Б. и. 1988. № 26. С. 33.
6. Богомолов О. В., Каплун А. П., Швец В. И. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1560–1564.
7. Богомолов О. В., Якупина Н. Б., Каплун А. П., Швец В. И. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1059–1067.
8. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. С. 273, 79.
9. Препаративная биохимия липидов/Ред. Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. М.: Наука, 1981. С. 110, 146, 157, 164, 186.
10. Rosengren J., Pahlman S., Glad M., Hjerten S. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 412. № 1. P. 51–61.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. V., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
12. Ouchterlony O. // Arkiv Kemi. 1950. B. 1. S. 43–50.

Поступила в редакцию  
22.VI.1991

A. P. KAPLUN, N. B. YAKUNINA, K. S. AIRAPETYAN, V. A. SAENKO\*,  
V. I. SHVETS

#### GENERAL METHOD OF COVALENT IMMOBILIZATION OF NATURAL PHOSPHOLIPIDS

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;  
\* Scientific Research Institute of Medical Radiology, Obninsk

A method of covalent immobilization of natural phospholipids to supports containing aryl groups (phenyl-sepharose, polystyrene etc.) under the Friedel – Crafts reaction conditions is described. For the egg phosphatidylcholine, the 2-sn-fatty acid residue is shown to be involved in the binding through its double bonds. Phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, and cardiolipin, having double bonds were immobilized in this way. The cardiolipin support has been used to isolate anticardiolipin antibodies.