



УДК 578.088.9

ПОВЕДЕНИЕ БЕЛКОВ, ЛИПИДОВ И РНК В ДВУХФАЗНОЙ СИСТЕМЕ ДЕКСТРАН — ВОДА — ИЗОПРОПИЛОВЫЙ СПИРТ*Михеева Л. М., Заславский В. Ю., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

Для разделения биологических частиц и макромолекул методом распределения в двухфазных полимерных системах предложена новая система декстран — вода — изопропиловый спирт. Преимущества системы состоят в ее повышенной липофильности и в замене обычно используемого полиэтиленгликоля легколетучим изопропиловым спиртом. Исследована фазовая диаграмма указанной системы. Изучено поведение ряда модельных соединений — белков, липидов и РНК — в системе с равными объемами фаз и зависимость поведения от ионной силы. Показано, что распределение указанных соединений в предложенной системе подчиняется общим принципам и закономерностям, известным при использовании двухфазной системы декстран — вода — полиэтиленгликоль.

Одним из наиболее эффективных методов фракционирования биологических частиц и макромолекул в настоящее время является предложенный Альбертсоном метод разделения в двухфазных полимерных системах [1]. Этот метод основан на неравномерном распределении биополимеров и их комплексов в фазах, образуемых в водном растворе такими несовместимыми полимерами, как, например, декстран и полиэтиленгликоль. Распределение биополимера или биологической частицы в двухфазной системе зависит от рН, ионной силы, природы добавок электролитов, а также от концентраций, молекулярных весов и типов полимеров, используемых для образования двухфазной системы.

В последнее время рассматриваемый метод находит все большее применение в экспериментальной биохимической практике. Он успешно используется для выделения и очистки ферментов [2,3], нуклеиновых кислот [4], биологических мембран [5] и других сложных биологических систем. Наиболее часто при этом используют подробно изученную Альбертсоном [1] двухфазную систему декстран — вода — полиэтиленгликоль.

Следует отметить, что при всех достоинствах указанная система не лишена ряда недостатков. К ним в первую очередь надо отнести трудности, связанные с удалением полимеров, входящих в состав фазовой системы, при очистке биологических макромолекул, а также то, что разделению в этой системе подвергаются лишь гидрофильные биополимеры и их комплексы, а структуры с выраженным липофильным характером проявляют, как правило, тенденцию к концентрированию на границе раздела фаз [6,7].

Частично эти недостатки могут быть преодолены заменой одного из полимеров, входящих в состав фазовой системы, соединением, обладающим более высокой липофильностью, чем декстран или полиэтиленгликоль.

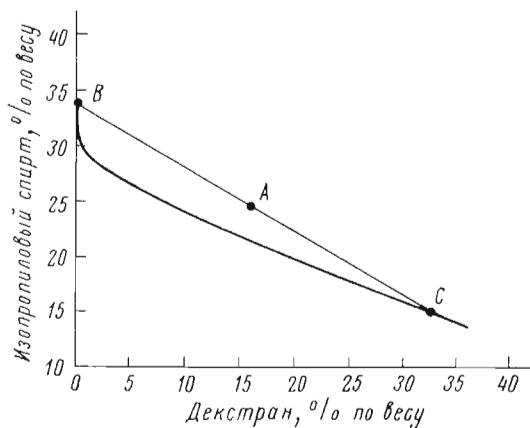


Рис. 1

Рис. 1. Фазовая диаграмма системы декстран — вода — изопропиловый спирт (при 20°). Точка А характеризует общий состав системы, точки В и С характеризуют состав верхней и нижней фазы системы соответственно

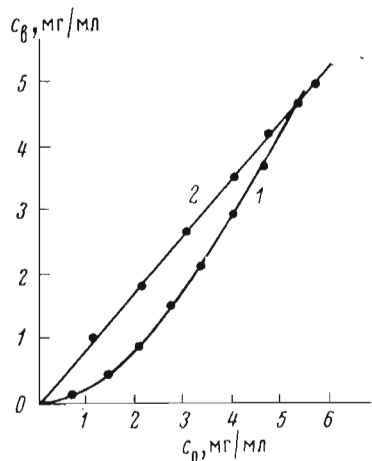


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость концентрации лизоцима в верхней фазе от общей концентрации лизоцима в системе декстран — вода — изопропиловый спирт: 1 — рН 6,6, ионная сила 0,01 М; 2 — рН 4,4, ионная сила 0,0025 М

Описано использование двухфазной системы, образованной декстраном и полиэтиленгликолем, этерифицированным пальмитиновой кислотой, для экстракции сывороточного альбумина из сыворотки крови [8]. Концентрирование альбумина в фазе, обогащенной пальмитилполиэтиленгликолем, было осуществлено благодаря повышенной гидрофобности этой фазы.

В настоящей работе нами была предпринята попытка заменить в двухфазной системе полиэтиленгликоль летучим органическим соединением с повышенной гидрофобностью, в качестве которого был выбран изопропиловый спирт. Введение изопропилового спирта в двухфазную систему должно повышать ее гидрофобность [9], а летучесть изопропанола позволяет удалить его из системы одновременно с водой упариванием или лиофилизацией, что значительно упрощает выделение расфракционированных биополимеров. Все это дало нам основание предположить, что описанная ниже двухфазная водно-органическая полимерная система может оказаться полезной при фракционировании природных соединений и биологических частиц с липофильными свойствами.

Исследовано образование двухфазной системы декстран — вода — изопропиловый спирт и поведение в этой системе ряда индивидуальных природных соединений: сывороточного альбумина быка, лизоцима белка куриных яиц, пепсина, липазы из пшеничных зародышей, натриевой соли дрожжевой РНК, биксина, а также суммарного экстракта липидов из пекарских дрожжей.

В результате ряда предварительных экспериментов было обнаружено, что введение изопропилового спирта в водный раствор декстрана приводит к образованию двухфазных систем при условии, что молекулярный вес декстрана составляет не менее 20 000.

Мы использовали декстран с молекулярным весом $\sim 150\,000$. Поскольку система, образуемая декстраном с изопропиловым спиртом в воде, до сих пор не описана, нами исследовался ее состав и фазовое равновесие при разных соотношениях компонентов. Фазовая диаграмма указанной системы приведена на рис. 1.

Поведение перечисленных выше соединений в рассматриваемой системе изучалось при составе системы, соответствующей на фазовой диаграмме

Таблица 1

Состав системы и фаз системы декстран — вода — изопропиловый спирт (% по весу) в точке А на фазовой диаграмме (рис. 1)

Компоненты	Состав		
	системы	верхней фазы	нижней фазы
Декстран	15,9	0,03	32,3
изо-PrOH	24,4	33,4	15,1
H ₂ O	59,7	66,6	52,6

Таблица 2

Распределение модельных соединений в двухфазной системе декстран — вода — изопропиловый спирт в зависимости от полной силы В % от общего количества образца, введенного в систему

Фазы	Биксин		Липиды		Альбумин		Пепсин		Липаза	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Верхняя	100	100	100	100	90,8	90,2	66,5	29,4	79,6	97,2
Нижняя	0	0	0	0	9,2	9,8	33,5	70,6	20,4	2,8
<i>K</i> **	>10	>10	>10	>10	9,9	9,2	2,0	0,42	3,9	>10

Таблица 2 (продолжение)

Фаза	Лизоцим				РНК		Смесь альбумина и РНК*	
	А	Б	В	Г	А	Б	альбумин	РНК
Верхняя	—	86,3	60,5	86,3	10,9	4,8	90,6	12,3
Нижняя	—	13,7	39,5	13,7	89,1	95,2	9,4	87,7
<i>K</i> **	—	6,3	1,53	6,3	0,12	0,05	9,7	0,14

Буферы А, Б — рН 6,6, ионная сила 0,01 и 1,01 М соответственно; буферы В и Г — рН 4,4, ионная сила 0,0025 и 1,0025 М соответственно (см. «Экспериментальную часть»).

* Смесь альбумина и РНК в буфере А, соотношение компонентов смеси варьировали от 1:1 до 7:1.

** *K* — коэффициент распределения (пояснение см. в тексте).

точке А (рис. 1). В этих условиях образуется двухфазная система с равными объемами обеих фаз. Состав каждой из них указан в табл. 1.

Поведение веществ в двухфазной системе характеризуется коэффициентом распределения $K = c_v/c_n$, выражающим отношение концентраций вещества в верхней (c_v) и нижней (c_n) фазе [1]. Равномерное распределение вещества в системе характеризуется K , равным 1; следовательно, чем больше величина K отличается от 1, тем лучше происходит фракционирование данного вещества в выбранной системе.

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, поведение биксина и экстракта суммарных липидов из пекарских дрожжей, концентрирующихся в верхней, обогащенной изопропиловым спиртом фазе, свидетельствует о том, что гидрофобность рассматриваемой системы превышает гидрофобность системы декстран — вода — полиэтиленгликоль, в которой подобные соединения концентрируются на границе раздела фаз [7].

Поведение натриевой соли дрожжевой РНК при распределении в изучаемой системе мало отличается от ее поведения в системе декстран —

вода — полиэтиленгликоль [10]. При ионной силе 0,01 М коэффициент распределения этого биополимера составляет 0,12, а при повышении ионной силы до 1,01 М — 0,05. Концентрирование нуклеиновых кислот и их производных в нижней, обогащенной декстраном фазе при увеличении ионной силы аналогично их поведению при распределении в двухфазной системе декстран — вода — полиэтиленгликоль [1].

Наибольший интерес представляло выяснение перспективности использования рассматриваемой системы для выделения белков.

Из литературы известно [11], что введение изопропилового спирта в водный раствор бычьего сывороточного альбумина приводит к осаждению белка. Денатурация альбумина в этом случае является обратимой. Известно также [12, 13], что альбумин можно растворить в ацетоне, метиловом и этиловом спиртах путем предварительного осаждения белка из водного раствора трихлоруксусной кислотой или введением добавки этой кислоты в органический растворитель, однако, как отмечается в работе [13], в изопропиловом спирте при такой обработке белок растворить не удается. Кроме того, растворимость белков в воде снижается в присутствии полисахаридов, в частности декстрана [14, 15].

Все вышесказанное вызвало определенные сомнения в возможности использовать рассматриваемую систему для фракционирования белков. В действительности оказалось, что при введении в двухфазную систему декстран — вода — изопропиловый спирт в отсутствие добавок солей белки, в частности бычий сывороточный альбумин, выпадают в осадок.

Добавление в систему солей коренным образом изменяет ситуацию. Альбумин, например, не выпадает в осадок. Напротив, как видно из табл. 2, при введении в систему фосфатов, создающих суммарную ионную силу 0,01 М, он концентрируется в верхней, обогащенной изопропиловым спиртом фазе (K 9,9).

Увеличение ионной силы в исследуемой системе от 0,01 до 1,01 М мало влияет на поведение альбумина. Коэффициент распределения белка при этом снижается лишь незначительно — от 9,9 до 9,2. При изменении рН от 6,6 до 11 коэффициент распределения этого белка изменяется сильнее — от 9,9 до 3,0 (данные в табл. 2 не приведены), однако во всех случаях наблюдается концентрирование белка в более гидрофобной верхней фазе. При распределении бычьего сывороточного альбумина в рассматриваемой системе его концентрация в верхней фазе достигает 20 мг/мл. По-видимому, столь повышенное сродство этого белка к более гидрофобной фазе обусловлено высокой липофильностью белковой глобулы, выполняющей в природе функции переносчика жирных кислот. Величины коэффициентов распределения альбумина при всех исследованных значениях рН и ионных сил в изучаемой двухфазной системе значительно превышают коэффициенты, характеризующие поведение данного белка при распределении в тех же условиях в системе декстран — вода — полиэтиленгликоль [1], и лежат на одном уровне со специально применявшейся системой декстран — вода — пальмитилполиэтиленгликоль [8].

Концентрирование в верхней, обогащенной изопропиловым спиртом фазе наблюдается также в случае липазы пшеничных зародышей. Сродство этого белка к более гидрофобной фазе, по-видимому, как и для альбумина, объясняется липофильностью поверхности макромолекулы фермента, субстратами которого служат глицериды жирных кислот. Увеличение коэффициента распределения при увеличении ионной силы (см. табл. 2), возможно, обусловлено экранированием заряженных групп на поверхности белка, обеспечивающим повышение гидрофобности макромолекулы.

При низкой ионной силе пепсин, хотя и в меньшей степени, чем альбумин и липаза, также концентрируется в верхней, обогащенной изопропанолом фазе. При увеличении ионной силы, однако, происходит перераспределение белка, и пепсин в основном собирается в нижней фазе — коэффициент распределения падает от 2,0 до 0,42. В литературе [1] отмечается,

что снижение коэффициента распределения при увеличении ионной силы характерно для отрицательно заряженных белков в двухфазной системе декстран — вода — полиэтиленгликоль. Как следует из данных табл. 2, для бычьего сывороточного альбумина и пепсина, отрицательно заряженных при рН 6,6, при распределении белков в системе декстран — вода — изопропиловый спирт имеет место такая же тенденция.

Для лизоцима, несущего при рН 6,6 и 4,4 суммарный положительный заряд, наблюдается картина, противоположная описывающей поведение пепсина и бычьего сывороточного альбумина. При увеличении ионной силы в системе коэффициент распределения лизоцима увеличивается. Это также согласуется с поведением положительно заряженных белков, в частности лизоцима, при распределении в системе декстран — вода — полиэтиленгликоль [1].

Для всех исследованных ранее биополимеров было показано, что коэффициент распределения в двухфазной системе при фиксированных условиях не зависит от концентрации биополимера [1]. Это эмпирическое условие является общим и сохраняется практически для всех изученных нами биополимеров (типичная картина — рис. 2, 2). Несоблюдение этого условия свидетельствует о том, что биополимер претерпевает агрегацию или участвует в каких-либо взаимодействиях с веществами, присутствующими в системе.

В нашей работе изменение коэффициента распределения с увеличением концентрации белка наблюдалось для лизоцима при рН 6,6 и ионной силе 0,01 М (рис. 2, 1). Поскольку поведение лизоцима в ацетатном (рН 4,4) и фосфатном (рН 6,6) буферах при высокой ионной силе (1,01 М) «типично» и даже коэффициенты распределения в обоих случаях, как видно из табл. 2, совпадают, представляется возможным предположить, что наблюдаемое при рН 6,6 и ионной силе 0,01 М поведение лизоцима обусловлено происходящей в этих условиях димеризацией белка [16]. При рН 4,4 димеризация, как известно [16], не происходит и лизоцим ведет себя при распределении в системе декстран — вода — изопропиловый спирт обычным образом. То, что величина коэффициента распределения при этом близка к 1, типично для биополимеров с низким молекулярным весом [1]. Коэффициенты распределения димера и мономера лизоцима при рН 6,6, по-видимому, различны, и это может приводить к смещению равновесия мономер — димер в системе и обуславливать поведение белка, характеризующееся представленной на рис. 2 (кривая 1) зависимостью. Тот факт, что коэффициенты распределения лизоцима при ионной силе 1,01 М совпадают при рН 4,4 и 6,6, возможно, указывает на отсутствие димеризации при высокой ионной силе при рН 6,6. В целом поведение лизоцима в исследуемой системе проявляет тенденции, характерные для белков с высокой изоэлектрической точкой при распределении в системе декстран — вода — полиэтиленгликоль.

Чтобы более полно судить о пригодности рассматриваемой системы для целей фракционирования и очистки биополимеров, необходимо было проверить, выполняется ли при распределении в ней правило о том, что каждое соединение распределяется в двухфазной системе независимо от присутствия в ней других соединений при условии, что эти вещества не взаимодействуют друг с другом [1]. Для проверки выполнения этой закономерности в системе декстран — вода — изопропиловый спирт исследовалось распределение в ней смеси натриевой соли дрожжевой РНК и бычьего сывороточного альбумина при варьировании соотношения количеств распределяемых компонентов смеси от 1 : 1 до 1 : 7. Во всех случаях оказалось, что поведение компонентов в смеси не отличается от их индивидуального распределения в тех же условиях (см. табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение биополимеров в двухфазных полимерных системах и в описанной полимерной водно-органической двухфазной системе происходит по одному и тому же

принципу и, по-видимому, подчиняется тем же закономерностям. Система декстран — вода — изопропиловый спирт, однако, обладает рядом преимуществ. К ним следует, видимо, отнести упрощение стадии отделения распределяемых веществ от полимеров, входящих в состав системы, и повышенную липофильность системы, обеспечивающую, в частности, концентрирование липидных соединений в верхней, обогащенной изопропиловым спиртом фазе. Гидрофобность описанной системы позволяет осуществлять в ней фракционирование нерастворимых в воде веществ, и, возможно, именно она обуславливает значительную неравномерность распределения белков и, вероятно, других соединений, обладающих гидрофильно-гидрофобным характером.

Таким образом, двухфазная система декстран — вода — изопропиловый спирт, по-видимому, может успешно использоваться для фракционирования и очистки различных природных соединений.

Экспериментальная часть

В работе использовали декстран с молекулярным весом $\sim 150\ 000$ (фракция Т-150, Pharmacia, Швеция), сывороточный альбумин быка (Koch-Light, Англия), липазу из пшеничных зародышей (Koch-Light, Англия), лизоцим белка куриных яиц (Koch-Light, Англия) в виде кристаллического препарата и обессоленный на биогеле Р-2, пепсин (ОЗХР, СССР), очищенный гель-филтрацией на сефадексе G-50 по [17] и обессоленный на сефадексе G-50, и натриевую соль дрожжевой РНК (Lawson, Англия) и биксин (Merck, ФРГ). Все неорганические соли марки х. ч. использовали без дополнительной очистки. В работе использовали свежеперегнанный изопропиловый спирт. Суммарный липидный экстракт из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* марки ч. к. (Московский дрожжевой завод) получали экстракцией смесью $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 1 : 1$ по методу Фолча [18].

Белок определяли по биуретовой реакции [19], РНК — спектрофотометрически [20], биксин — также спектрофотометрически при $\lambda\ 460$ нм. Липиды определяли гравиметрически, используя экстракт из системы по методу [18].

Двухфазная система. В работе использовали двухфазную систему декстран — вода — изопропиловый спирт следующего состава (вес. %): декстран — 15,9; изопропиловый спирт — 24,4; вода — 59,7. Способ построения бинодальной кривой и соединительных линий на фазовой диаграмме подробно описан в работе [1].

Двухфазную систему образовывали смешением рассчитанных количеств исходного концентрированного раствора декстрана ($\sim 30\%$), воды или солевого раствора и изопропилового спирта, перемешиванием и центрифугированием смеси в течение 10 мин при 1000 g. Конечный состав двухфазной системы во всех случаях поддерживали постоянным независимо от способа введения в систему образца — в виде раствора, суспензии или твердого вещества.

В работе использовали следующие буферы: фосфатный с ионной силой 0,01 М, рН 6,6 (А); фосфатный, рН 6,6, ионная сила 1,01 М создана добавкой NaCl (Б); ацетатный, рН 4,4, ионная сила 0,0025 М (В); ацетатный, рН 4,4, ионная сила 1,0025 М создана добавкой NaCl (Г).

Коэффициент распределения (K) определяли согласно работе [1] по формуле $K = c_v/c_n$. Поскольку для большинства исследуемых веществ эта величина не зависит от концентрации вещества в системе, для определения K использовали графический способ, состоящий в построении зависимости $c_v - c_n$, выражающейся в общем случае прямой, тангенс угла наклона которой равен величине K .

Поскольку присутствие больших количеств декстрана мешает определению белка по биуретовой реакции, его концентрацию в нижней фазе находили исходя из разности между количеством белка, введенным в сис-

тему, и его содержанием в верхней фазе. Белок в верхней фазе определяют, удаляя растворитель лиофилизацией и перерастворяя остаток в 0,5 н. NaOH.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертсон Пер-Оке (1974) Разделение клеточных частиц и макромолекул, «Мир», М.
2. Okazaki T., Kornberg A. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 259—268.
3. Little J. W., Lehman I. R., Kaiser A. D. (1967) J. Biol. Chem., **242**, 672—678.
4. Pettijohn D. (1967) Eur. J. Biochem., **3**, 25—32.
5. Albertsson P. A. (1973) Biochemistry, **12**, 2525—2530.
6. Miller L. S., Evans S. B., Rossio J. L., Dodd M. C. (1974) Prep. Biochem., **4**, 489—498.
7. Hofsten B. V., Baird G. D. (1962) Biotechn. Bioeng., **4**, 403—410.
8. Shanbhag V. P., Johansson G. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **61**, 1141—1146.
9. Kates M., Eberhardt F. M. (1957) Can. J. Bot., **35**, 895—905.
10. Alberts B. (1967) in Methods in Enzymology (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds.), vol. 12A, pp. 566—581, Acad. Press., N. Y.
11. Singer S. J. (1962) in Adv. Protein Chem., vol. 17, pp. 1—68, Acad. Press, N. Y.
12. Levine S. (1954) Arch. Biochem. and Biophys., **50**, 515—517.
13. Michael S. E. (1962) Biochem. J., **82**, 212—218.
14. Laurent T. C. (1963) Biochem. J., **89**, 253—257.
15. Laurent T. C. (1966) Fed. Proc., **25**, 1127.
16. Sophianopoulos H. J., Van Holde K. E. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2516—2524.
17. Gelotte B., Krantz A. B. (1959) Acta chem. scand., **13**, 2127.
18. Folch J., Lees M., Stanley G. H. (1957) J. Biol. Chem., **226**, 497—509.
19. Cornall A. G., Bardawill C. J., David M. M. (1949) J. Biol. Chem., **177**, 751—766.
20. Спирын А. С. (1958) Биохимия, **23**, 656—662.

Поступила в редакцию
19.II.1976

PARTITION BEHAVIOUR OF PROTEINS, LIPIDS AND RNA IN AQUEOUS DEXTRAN — ISO-PROPANOL BIPHASIC SYSTEM

МИНЕЕВА Л. М., ЗАСЛАВСКИЙ В. Ю., РОГОЖИН С. В.

*Institute of Organo Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Phase diagram of an aqueous dextran — *i*-propanol biphasic system was studied. The partition behaviour was examined of bixin, total lipid extract from baker's yeast, yeast RNA, bovine serum albumin, pepsin, lipase and lysozyme in the system containing 15.9% (w/w) dextran (molecular weight about 150 000), 24.4% (w/w) *i*-propanol and 59.7% (w/w) water. It was shown that the partition of the above compounds follows the laws similar to those found for typical aqueous polymeric biphasic systems. The enhanced hydrophobicity of the system extends its possible application in biopolymer fractionation, whereby substitution of polyethyleneglycol for volatile *i*-propanol simplifies the procedure of separation of the isolated substance from the phase-forming polymers.