



УДК 577.112.088.3:543.544

© 1994 В. И. Офицеров, С. И. Ястребов,
Е. Н. Николаева, Л. М. Дедкова, А. Г. Покровский,
С. Б. Фролова

КОМПОЗИЦИОННЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

АО «Вектор-БиоПродукт», пос. Кольцово, Новосибирский район Новосибирской обл.

Ключевые слова: аффинная хроматография, белки, сорбенты, гидрофильные полимеры, силохром.

Для аффинной хроматографии синтезированы сорбенты на основе широкопористого силохрома, модифицированного гидрофильными полимерами и активированного *N*-гидроксисукцинимидом. Отработаны условия иммобилизации лигандов и исследованы свойства полученных аффинных сорбентов. В качестве лигандов использовали соевый ингибитор трипсина, белок А, антивидовые иммуноглобулины. Показано, что полученные сорбенты обладают высокой емкостью и большей стабильностью по сравнению с ВгСN-сефарозой и могут с успехом применяться для аффинной хроматографии различных белков.

Высокоэффективная аффинная хроматография (ВЭАХ), основанная на использовании жестких сорбентов, сочетает в себе уникальную селективность с высокой скоростью разделения и является наиболее эффективным методом очистки антител, антигенов, ферментов и других белковых молекул. Один из подходов к созданию сорбентов для ВЭАХ заключается в иммобилизации лигандов на матрицах на основе кремнеземов, модифицированных производными алкилсиланов [1, 2]. Однако для носителей этого типа характерна невысокая стабильность в щелочных растворах и недостаточная биосовместимость с белками [3].

Ранее для ионообменной хроматографии олигонуклеотидов и белков нами были успешно использованы сорбенты композиционной структуры, представляющие собой кремнеземы, модифицированные гидрофильными поперечно сшитыми полимерами [4–7].

В настоящей работе были синтезированы и исследованы композиционные носители для аффинной хроматографии.

В качестве матрицы для сорбентов использовали широкопористый силохром С-80 с полимерным покрытием на основе полиэтиленимина (PEI), декстрана и многоатомных спиртов: *D*-маннита и поливинилового спирта (PVA). Сорбцию

Сокращения: PEI — полиэтиленимин, PVA — поливиниловый спирт, STI — соевый ингибитор трипсина, DAMP — *N,N*-диметиламинопиридин, EDAC — *N*-этил-*N'*-(3-диметиламинопропил)карбодимидгидрохлорид, IgG_ч, IgG_к, IgG_м — иммуноглобулины человека, кролика, мыши.

Адрес для переписки: 633159 пос. Кольцово Новосибирской обл. Новосибирского района, п/я 65, В. И. Офицерову.

Свойства композиционных сорбентов на основе силохрома С-80 с иммобилизованным соевым ингибитором трипсина (STI)

Полимерное покрытие	Количество иммобилизованного STI, мг/г сорбента	Емкость по трипсину	
		мг/г сорбента	мг/мг STI
Декстран	22,0	2,9	0,13
PVA	18,7	7,2	0,38
D-Маннит	17,5	6,0	0,34
PEI	20,0	7,6	0,38

этих веществ на исходный силохром проводили из водных или водно-спиртовых растворов. Для формирования полимерного покрытия удерживаемый на поверхности кремнеземной матрицы слой PVA, декстрана или D-маннита сшивали алифатической эпоксидной смолой ДЭГ-1, а слой PEI — 1,2-дибромэтаном. С целью получения активированных сорбентов модифицированный полимером силохром ацилировали янтарным ангидридом и введенные карбоксильные группы превращали в N-гидроксисукцинимидные эфиры. При этом количество карбоксильных групп составило 0,5, 0,65 и 2,0 ммоль/г сорбента для PEI-, декстран- и PVA-модифицированных сорбентов соответственно (удельный объем полученных сорбентов — 2,0—2,3 мл/г). Активированные сложноэфирные группы в составе носителя позволяют проводить одностадийную иммобилизацию белков и других аминокислотных лигандов в мягких условиях с образованием прочных амидных связей [8].

Для сравнительного изучения свойств полученных носителей на них была проведена иммобилизация соевого ингибитора трипсина (STI) и определена их динамическая емкость при хроматографии трипсина. Оказалось (табл. 1), что количество иммобилизованного лиганда на всех полученных носителях различается незначительно (17,5—22,0 мг/г носителя). Однако при хроматографии трипсина силохром, модифицированный декстраном, специфически связывает в несколько раз меньше трипсина, чем другие аффинные сорбенты. Это, по-видимому, может быть объяснено недоступностью большей части активных центров иммобилизованного на нем лиганда.

Аффинные сорбенты на основе PVA- и PEI-модифицированных кремнеземов показали максимальную емкость по трипсину. Они были использованы для иммобилизации различных иммуноглобулинов и последующей иммуноаффинной очистки соответствующих антивидовых антител. В ходе исследования этих сорбентов было установлено, что носитель на основе PVA при изменении pH элюентов с 7,5 на 2,3 теряет в результате отщепления часть иммобилизованного IgG. Мы предположили, что это обусловлено недостаточно эффективным закреплением PVA на силохроме в процессе получения композиционной матрицы.

Для более прочного связывания PVA с кремнеземом исходный силохром обрабатывали глицидоксипропил- или аминопропилтриэтоксисиланом [1, 2]. Это позволило ввести в матрицу ковалентно связанные с кремнеземом реакционноспособные группы, которые при сорбции и последующей сшивке полимера дополнительно закрепляли его на поверхности матрицы. Такой носитель с введенными по описанному выше методу активными сложноэфирными группами использовали для иммобилизации IgG человека. Полученный иммуносорбент был стабилен при смене pH, однако количество иммобилизованного лиганда и соответственно количество сорбируемых на носителе антивидовых антител было

Характеристика Полисил-АФ-иммуносорбентов и очищенных на них антител

Лиганд	Количество иммобилизованного лиганда, мг/г сорбента	Количество сорбированных антител		Удельная активность, ед.ИФА/мг		Выход белка с колонки по активности, % от исходного
		мг/г сорбента	мг/мг иммобилизованного лиганда	исходной сыворотки	очищенных антител	
IgG _ч	7,4	6,9	0,93	480	26 000	77,8
IgG _к	6,0	4,9	0,81	400	16 000	98,0
IgG _м	9,9	5,85	0,59	800	38 000	92,0
Кроличьи АТ против IgG _ч **	17,1	1,5	0,09			

* Приведены усредненные данные трех экспериментов; ед. ИФА — обратный титр в твердофазном ИФА.

** Аффинно очищенные антитела.

ниже, чем у РЕИ-модифицированного сорбента. В связи с этим в дальнейших исследованиях для иммобилизации использовали только активированный РЕИ-носитель*.

Полученные композиционные иммуносорбенты (табл. 2) обладают достаточно высокой емкостью и позволяют проводить эффективную аффинную очистку антивидовых антител из соответствующих сывороток. На рис. 1 приведен в качестве примера профиль хроматографии сыворотки кролика против IgG человека. Выделенные антитела имеют высокую удельную активность (табл. 2) и гомогенны при электрофорезе в агарозном геле и ПААГ (рис. 2).

Композиционный носитель с ковалентно связанными аффинно очищенными антителами кролика против IgG человека при хроматографии сорбировал 0,09 мг IgG человека на 1 мг иммобилизованного лиганда (количество связавшегося белка определяли в элюате после десорбции 0,5 М глицин·НСl). Это на 30% больше того, что связывает аналогичный лиганд, иммобилизованный на агарозном сорбенте через активированные сложноэфирные группы [9].

Активированный композиционный сорбент был также использован для иммобилизации белка А, широко применяемого в настоящее время для аффинной хроматографии иммуноглобулинов человека и животных [10]. Такой композиционный сорбент, содержащий 1,5 мг белка на 1 г сорбента, специфически связывал 8 мг IgG человека на 1 мг иммобилизованного белка А.

На основе композиционного активированного сорбента был получен иммуносорбент для аффинной хроматографии белков вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Для сравнения кроме этого была взята широко используемая в лабораторной практике ВгСN-сефароза [11]. В качестве лиганда для иммобилизации использовали фракцию IgG, выделенную из сероположительных к ВИЧ сывороток крови людей, содержащих, по данным иммуноблоттинга, антитела к большинству вирусных полипептидов. Сравнение полученных иммуносорбентов было проведено при хроматографии на них концентрата вирусосодержащей культуральной жидкости, полученной после культивирования ВИЧ-1 на моноцитах человека линии ЭВК-ИРА/3 (производство НПО «Вектор»). Как видно из табл. 3, сефароза

* В настоящее время такой сорбент выпускается под торговой маркой Полисил-АФ (АО «Вектор-БиоПродукт», пос. Кольцово Новосибирской обл.).

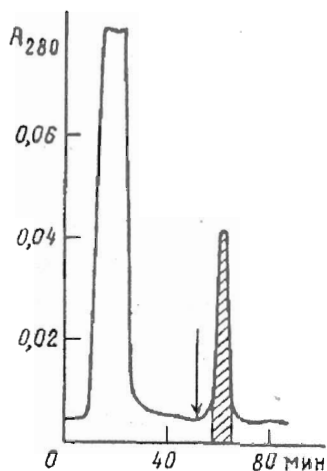


Рис. 1

Рис. 1. Профиль элюции аффинной хроматографии сыворотки кролика против IgG человека. Условия хроматографии: колонка 10×70 мм, Полисил АФ-IgG, скорость элюции 0,5 мл/мин. Стартовый и промывочный буфер — 0,5 М NaCl в 0,25 М KH_2PO_4 , pH 7,5, буфер для элюции специфических антител — 0,5 М глицин·HCl, pH 2,3 (смена буфера показана стрелкой). Заштрихована фракция очищенных IgG

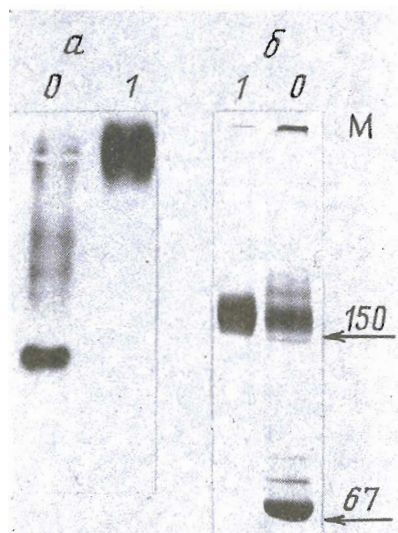


Рис. 2

Рис. 2. Электрофорез исходной сыворотки (0) и очищенных IgG (см. рис. 1) (1) в 1% агарозе (а) и 7,5% ПААГ (б). М — маркеры (приведены молекулярные массы, кДа)

обеспечивает более высокую плотность иммобилизации лиганда, чем композиционный сорбент (количество IgG, ковалентно связанных сефарозной матрицей, в 5 раз выше). Однако сопоставление количества специфически связанного антигена и его активности показывает, что композиционный сорбент превосходит по своим свойствам сорбент на основе сефарозы и позволяет получить фракцию вирусных белков с более высоким выходом и удельной активностью.

Таким образом, в результате проведенных исследований получен жесткий композиционный сорбент и показана перспективность его использования для иммобилизации белковых лигандов и аффинной хроматографии различных белков.

Экспериментальная часть

В работе использовали силихром С-80 (удельная поверхность 70—90 $\text{м}^2/\text{г}$, средний диаметр пор 50 нм, размер частиц 40 мкм) производства Ставропольского завода химреактивов и люминофоров; BrCN-активированную сефарозу (Pharmacia, Швеция); полиэтиленимин (PEI) с M 600 000 — 1 000 000, поливиниловый спирт (PVA) с M 15 000, N,N-диметиламинопиридин (DMAP), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидгидрохлорид (EDAC), N-гидроксисукцинимид (Fluka, Швейцария); декстран Т-20 с M 20 000, N,N-дициклогексилкарбодиимид (Ferak, Германия); D-маннит (Lachema, Чехо-Словакия); 1,2-дибромэтан (Apolda, Германия); соевый ингибитор трипсина (STI) (Reanal, Венгрия); алифатическую диэпоксидную смолу ДЭГ-1; эфират трехфтористого бора квалификации ч.; янтарный ангидрид квалификации ч. д. а.; трипсин кристаллический (Ленинградский завод медицинских препаратов). Иммуноглобулины G (IgG) человека, кролика, мыши и другие были получены из соответствующих сывороток крови ионообменной хроматографией на Полисиле-СА [7].

Характеристика иммуносорбентов, использованных для очистки белков ВИЧ*

Носитель	Количество иммобилизованного лиганда (IgG ₀), мг/г сорбента	Количество сорбированного антигена		Удельная активность, ед. ИФА/мг		Выход антигена по акти-ти, % от исходного
		мг/г	мг/мг	исходн. концентрат	очищен. антиген	
Полисил-АФ	5,4	0,03	0,056	11,6	7403	37,6
BtCN-Сефароза	27,8	0,08	0,028	11,6	5263	33,4

* Приведены усредненные данные трех экспериментов; ед. ИФА — обратный титр в твердофазном ИФА.

Модификация силохрома ПВС и декстраном. К силохрому добавляли 3—5 объемов концентрированной азотной кислоты, выдерживали 2—3 ч, отмывали водой на фильтре под вакуумом водоструйного насоса до нейтрального рН и высушивали на воздухе.

К 1 г силохрома добавляли 10 мл 5% водного раствора PVA или декстрана, дегазировали, выдерживали 1 ч и отфильтровывали на стеклянном фильтре. Носитель промывали на фильтре водой (3 × 10 мл), 50% водным диоксаном (3 × 10 мл), диоксаном и высушивали. К носителю, суспендированному в 10 мл сухого диоксана, при перемешивании по каплям добавляли 0,2 мл эфирата трехфтористого бора, затем через 5 мин — 0,2 мл ДЭГ-1. Продолжали перемешивание 1 ч при 20° С. По окончании реакции осадок промывали диоксаном, 50% водным диоксаном, водой и высушивали.

Модификацию силохрома D-маннитом проводили аналогично модификации ПВС, используя 10% водный раствор D-маннита.

Модификацию силохрома PEI осуществляли согласно [4], последовательно обрабатывая силохром 10% раствором PEI в этиловом спирте, 20% раствором 1,2-дибромэтана в диоксане.

Ацилирование модифицированных сорбентов. Для введения карбоксильной группы носитель обрабатывали янтарным ангидридом в абсолютном пиридине согласно [4] из расчета 1 г янтарного ангидрида и 0,1 г DMAP на 1 г сорбента.

Содержание карбоксильных групп на сорбентах, модифицированных PVA, декстраном и D-маннитом, определяли потенциометрическим титрованием с КОН согласно [12], а на сорбенте, модифицированном PEI, — по разности содержания аминогрупп до и после обработки сорбента янтарным ангидридом в тесте с пикриновой кислотой согласно [5].

Активация карбоксилсодержащих сорбентов N-гидроксисукцинимидом. К 0,5 г носителя в сухом этилацетате последовательно добавляли 46 мг (0,4 ммоль) N-гидроксисукцинимидом и 103 мг (0,5 ммоль) DCC или 96 мг (0,5 ммоль) EDAC и перемешивали 10—15 ч. Носитель промывали этилацетатом, 2-пропанолом и высушивали на воздухе.

Иммобилизация белков на активированных сорбентах. Для получения аффинных сорбентов к активированному носителю добавляли раствор белка с концентрацией 0,5—15 мг/мл (3—20 мг белка на 1 г носителя) в 0,5 М NaCl в 0,25 М KH₂PO₄, рН 7,0—8,0, выдерживали при осторожном перемешивании 2 ч при 20° С и оставляли на 10—15 ч при 4° С. Количество связанного белка определяли методом Лоури [13] по его содержанию в растворе до и после реакции с активированным носителем. Для блокирования остаточных реакционно-способных групп полученный носитель выдерживали 2 ч при 20° С с 1 М

моноэтаноламином, рН 7,0—8,0, или с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в 0,25 М K_2HPO_4 , рН 7,0—8,0, с 0,5 М NaCl 10—15 ч при 4° С.

При хроматографии для уравнивания носителей и адсорбции белков использовали 0,25 М фосфат калия, рН 7,5, с 0,5 М NaCl . Элюцию проводили 0,5 М глицином· HCl , рН 2,3—2,5. Количество белка в элюатах рассчитывали по поглощению при длине волны 280 нм и методом Лоури. Активность выделенных иммуноглобулинов определяли иммуноферментным анализом (ИФА), а гомогенность — электрофорезом в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) и 1% агарозе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии/Ред. Г. В. Лисичкина. М.: Химия, 1986. С. 36—38.
2. Krasilnikov I., Borisova V.//J. Chromatogr. 1988. V. 446.
3. Kitagawa N.//J. Chromatogr. 1988. V. 443. P. 133—141.
4. Ястребов С. И., Попов С. Г.//Биоорганической химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 661—669.
5. Ястребов С. И., Офицеров В. И.//Биотехнология. 1991. № 4. С. 43—46.
6. Ястребов С. И., Ломакин А. И., Горбунов Ю. А., Карпышев Н. Н.//Методы получения и анализа биохимических реактивов. Сб. тез. V Всес. конф. Рига, 1987. С. 67.
7. Ястребов С. И., Дедкова Л. М., Фролова С. Б., Офицеров В. И.//Биотехнология. 1991. № 3. С. 43—45.
8. Cuatrecasas P., Parikh I.//Biochemistry. 1972. V. 11. № 12. P. 2291—2299.
9. Cress M. C., Ngo T.//Amer. Biotechnol. Lab. 1989. V. 7. № 2. P. 16—19.
10. Philips T. M., Queen W. D., More N. S., Thompson A. M.//J. Chromatogr. 1985. V. 327. P. 213—219.
11. Johnson G., Garvey J. S.//J. Immunol. Meth. 1977. V. 15. P. 29—37.
12. Alpert A. J.//Chromatogr. 1983. V. 266. P. 23—37.
13. Практическая химия белка. Пер. с англ./Ред. П. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. 623 с.

Поступила в редакцию
2.XI.1993

После доработки
15.II.1994

V. I. Ofitserov, S. I. Yastrebov, E. N. Nikolaeva,
L. M. Dedkova, A. G. Pokrovsky, S. B. Frolova

COMPOSITE SORBENTS FOR AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS

Vector-BioProduct Ltd, Koltsovo, Novosibirsk Region

Key words: affinity chromatography, proteins, sorbents, hydrophilic polymer, silica.

Sorbents for affinity chromatography based on the wide pore silica modified with hydrophilic polymers activated by means of N-hydroxysuccinimide were synthesized. Conditions for immobilization of ligands were found and properties of the synthesized affinity sorbents were investigated. Soybean trypsin inhibitor, protein A and immunoglobulins were used as ligands. The sorbents demonstrated high capacity, stability and may be used for affinity chromatography of proteins.

Address for correspondence: V. Ya. Ofitserov, Vector-BioProduct Ltd., box 65, Koltsovo, Novosibirsk Region 633159, Russia.