



УДК 577.112.088.3 : 543.544

© 1994 В. Е. Ключниченко, А. Н. Вульфсон, К. Титель*,
Р. Эвальд*, А. И. Мирошников

РАЗДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА ВЕЗИКУЛЯРНЫХ СОРБЕНТАХ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

* Университет им. Гумбольдта, факультет физиологии растений, Берлин.

Ключевые слова: белки рекомбинантные, хроматография на везикулярных сорбентах.

Изучено разделение способных к олигомеризации рекомбинантных белков — γ -интерферона, α -фактора некроза опухоли и гибридного белка проинсулина на везикулярном сорбенте (ВС) Permselect с идентификацией продуктов с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Показано, что ВС имеет высокие массообменные характеристики, способствующие сохранению разрешения при увеличении нагрузки на колонку, что важно для препаративной очистки рекомбинантных белков.

В дополнение к классическим хроматографическим и мембранным методам разделения биологических макромолекул недавно был предложен метод разделения на так называемых везикулярных сорбентах [1]. Эти сорбенты представляют собой оболочки растительных клеток (т. е. везикул) *Chenopodium album*, получаемых суспензионным культивированием [2]. Клетки подвергаются экстракционной обработке для удаления липидов и ферментатической обработке нерастворимых остатков протоплазмы таким образом, что от них остается только целлюлозно-пектиновый скелет клеточной стенки [3]. Уникальными свойствами везикулярного сорбента (ВС) являются строго определенный размер пор, образованных скелетом клеточных стенок, и механическая и химическая стабильность частиц.

Механизм разделения биологических макромолекул на ВС основан на проникновении их во внутреннюю полость везикул, причем клеточные стенки действуют как диализная мембрана со строго определенным пределом проницаемости. Таким образом, хроматография на ВС подобно гель-хроматографии обеспечивает разделение макромолекул на две группы в зависимости от стоксового радиуса, т. е. молекулы, по размеру большие этого двойного радиуса, исключаются,

Сокращения: ВС — везикулярный сорбент, эВЭЖХ — эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография, ГБП — гибридный белок проинсулина, γ -IFN — γ -интерферон, TNF- α — α -фактор некроза опухоли.

Адрес для переписки: 117871 ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Институт биоорганической химии. Факс: (095)3307410.

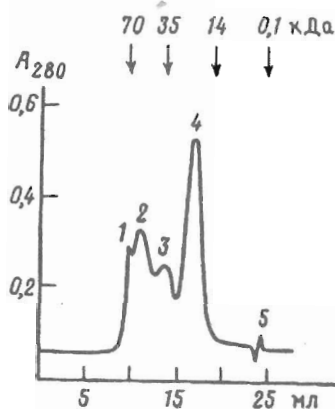


Рис. 1. Анализ гибридного белка проинсулина (40 мкг) на колонке TSK G 3000 SW (7,5×600 мм). Подвижная фаза — 0,1 М NH₄OAc, 0,1% SDS (pH 7,0). Скорость элюции 1 мл/мин. Пики 1—4 — полимер, олигомер, димер и мономер ГБП соответственно. Показана калибровка колонки по маркерным белкам

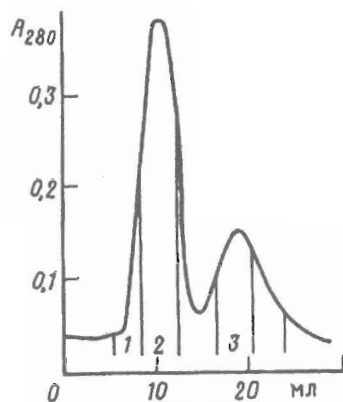


Рис. 2. Разделение ГБП (40 мкг) на колонке с Permselect (1,5×10 см). Подвижная фаза — 0,1 М NH₄OAc (pH 7,0). Скорость элюции 0,1 мл/мин. Фракции 1—3 собраны и рехроматографированы на колонке TSK G 3000 SW (рис. 3)

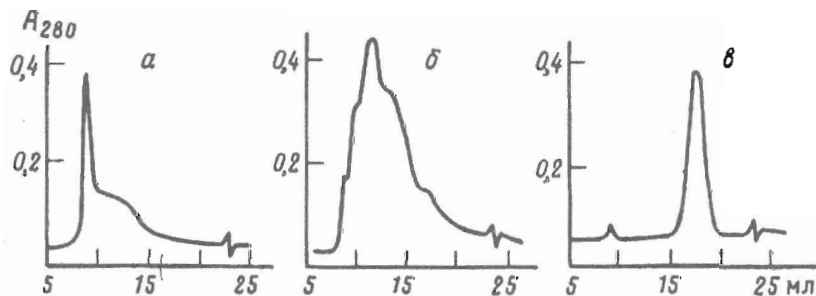


Рис. 3. Анализ фракций 1 (а), 2 (б) и 3 (в), полученных после разделения ГБП на колонке с ВС (рис. 2), на колонке TSK G 3000 SW. Условия разделения см. подпись к рис. 1

а меньшие проникают в поры. Причем ввиду строго определенного размера диаметра пор разница в размерах разделяемых молекул может составлять 1 кДа [4]. Проводя дополнительную обработку ВС буфером с высоким pH и этанолом, можно увеличивать размер пор [5]. У использованного нами ВС предел исключения составил 32—34 кДа. Этот метод фракционирования являет собой совмещение гель-фильтрации и мембранного разделения.

Эффективность разделения биополимеров на ВС была ранее продемонстрирована при фракционировании декстранов [1], различных белков [3], компонентов молока и плазмы крови человека [4], причем с сохранением ферментативной активности разделяемых продуктов [6]. Химическая структура ВС позволяет проводить его модификацию для последующих аффинных взаимодействий [7].

Цель настоящей работы — использование ВС для разделения белков, способность к агрегации: которых усложняет процессы выделения и идентификации. Рекомбинантные белки человека: гибридный белок проинсулина (ГБП), γ -интерферон (γ -IFN) и α -фактор некроза опухоли (TNF- α) — выделены из клеток *E. coli* с трансформированными плазмидами. Их технологии получения в настоящее время разрабатываются в нашей лаборатории. Эти белки имеют близкие молекулярные массы — около 17 кДа. Их отличительная черта — способность к агрегированию. ГБП существует в моно-, олиго- и полимерном виде, γ -IFN — в виде мономера и димера, а TNF- α — в виде мономера и тримера. Таким образом, мы имеем набор белков с дискретным распределением молекулярной массы — 17, 34, 51 и более кДа, причем димер γ -IFN и тример TNF- α обладают

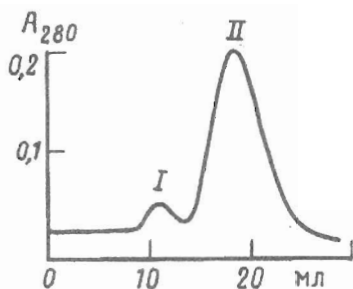


Рис. 4. Разделение γ -IFN (~50 мкг) на колонке с Permselect. Пик I соответствует олигомеру, пик II — мономеру. Условия см. в подписи к рис. 2

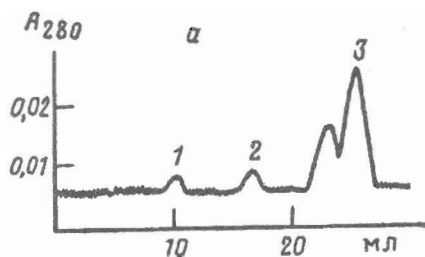


Рис. 5. Разделение γ -IFN (20 мкг) на колонке TSK G 3000 SW в 0,1 М NH_4OAc (рН 7,0) в отсутствие (а) и в присутствии 0,1% SDS (рН 7,0) (б). 1 — олимер, 2 — мономер γ -IFN, 3 — соли. Калибровку и остальные условия см. рис. 1

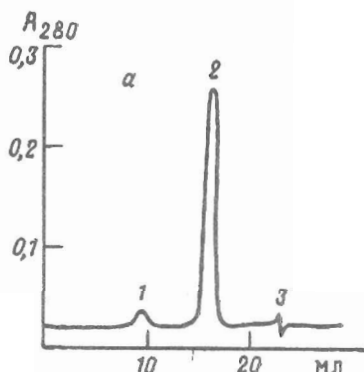
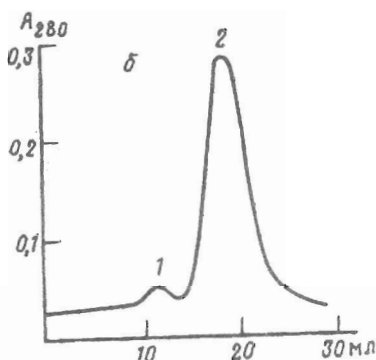


Рис. 6. Анализ TNF- α на колонках TSK G 3000 SW (а) и с Permselect (б). Подвижная фаза — 0,1 М NH_4OAc (рН 7,0). 1 — тример, 2 — мономер TNF- α , 3 — соли. Нанесение 40 мкг



повышенной биологической активностью по сравнению с их мономерами, и, напротив, именно мономерный ГБП является исходным материалом для получения инсулина [8]. Отделение мономерных и олигомерных фракций белков — важная принципиальная и технологическая задача, решение которой облегчает получение биологически активных рекомбинантных белков.

Как было отмечено ранее, ГБП существует в виде мономера, димера и олигомеров (рис. 1; калибровка колонки TSK G 3000 SW была проведена в соответствии с работами [8, 9]).

При разделении ГБП на колонке (длина 10 см), заполненной ВС, образец выходит в виде двух пиков (рис. 2). Элюат был собран по фракциям, как указано на рис. 2. Анализ фракций с помощью эВЭЖХ показал, что первая из них содержит преимущественно полимеризованный белок, вторая — сумму олигомеров и третья — практически только мономер (рис. 3). Таким образом, на 10-см колонке можно достичь эффективного разделения белков на 2 фракции, первая из которых соответствует полимеризованному и олигомеризованному ГБП,

а вторая содержит мономерный белок. Внутри каждой фракции происходит дополнительное распределение молекул по размеру.

При разделении образца γ -IFN в денатурирующих условиях на ВС также наблюдаются два пика, первый из которых содержит фракцию агрегированного белка, а второй — мономер (рис. 4). γ -IFN является сильногидрофобным белком [10] и при анализе в аналогичных условиях на колонке TSK G 3000 SW частично сорбируется на колонке и обнаруживается с трудом только при высокой чувствительности УФ-детектора (рис. 5а). При добавлении в подвижную фазу 0,1% SDS и растворении образца в SDS эВЭЖХ-анализ показывает присутствие мономера и олигомера γ -IFN (рис. 5б). На колонку наносили до 1 мл γ -IFN при концентрации 50 мкг/мл, поэтому пики в районе 23—26 мин, соответствующие низкомолекулярным веществам и солям, сильно размыты и увеличены. К сожалению, при эВЭЖХ-анализе в денатурирующих условиях трудно определить истинное соотношение мономера и олигомера в образце, поскольку наличие SDS в подвижной фазе и в исходном растворе образца существенно влияет, с одной стороны, на соотношение олигомер/мономер, а с другой — на неспецифические сорбционные взаимодействия обеих форм белка с насадкой эксклюзионной колонки. На ВС разделение γ -IFN происходит и без SDS (рис. 4) и, следовательно, без инактивации белка, что позволяет не только обнаруживать присутствие олигомера или мономера, но и проводить препаративное разделение.

TNF- α — достаточно гидрофильный белок и при хроматографии в денатурирующих условиях на эксклюзионной колонке в отличие от γ -IFN не сорбируется. Образец TNF- α состоит из мономера и тримера (рис. 6), доля последнего составляет 5—10% (рис. 6а). При разделении TNF- α на ВС также происходит разделение образца на два пика (рис. 6б). При этом соотношение тримера и мономера остается близким к найденному при разделении на колонке TSK G 3000 SW (рис. 6а), что свидетельствует о воспроизводимости результатов анализа.

Таким образом, разделение белков на ВС Permselect по размеру проходило без сорбционных эффектов, с высокой эффективностью и разрешением пиков белков на колонке длиной 10 см. Для такого же разделения на сорбенте типа Sephadex требуется колонка длиной 120 см [11]. ВС характеризуется низкой сорбционной активностью и высокой нагрузочной способностью, что важно для препаративной очистки рекомбинантных белков.

Экспериментальная часть

Для эксклюзионной ВЭЖХ использовали колонки TSK G 3000 SW (7,5×600 мм) (TOSOH, Япония). Элюирование проводили со скоростью 1 мл/мин с помощью насоса Waters 510 с инжектором Waters УБК, спектрофотометром Waters 490Е, интегратором Waters 740 (США). Для хроматографии на везикулярных сорбентах применяли стеклянную колонку размером 1,5×10 см. Колонку заполняли сорбентом Permselect [2] способом, указанным в работе [1]. Образцы гибридного белка проинсулина, рекомбинантного γ -интерферона человека, рекомбинантного α -фактора некроза опухоли получены в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН. Использованы следующие реактивы: вода, очищенная на установке Milli-Q (Waters, США), NH_4OAc , CH_3COOH , SDS (Serva, Германия). Перед хроматографией элюенты фильтровали через нитроцеллюлозные и GVWP-фильтры (диаметр пор 0,45 мкм, Waters, США) и дегазировали в течение 20 мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ehwald R., Heese P., Klein U. // J. Chromatogr. 1991. V. 542. P. 239—245.
2. Dongowski G., Ehwald R., Luck K., Stoof G. // Phytochemistry. 1992. V. 31. № 9. P. 3039—3042.
3. Ehwald R., Fuhr G., Olbrich M., Goring H., Knosche R., Kleine R. // Chromatographia. 1989. V. 28. № 11/12. P. 561—564.
4. Kleine R., Woehlecke H., Ehwald R. // Acta Biotechnol. 1992. V. 12. № 3. P. 243—253.

5. Ehwald R., Woehlecke H., Titel C. // *Phytochemistry*. 1992. V. 31. № 9. P. 3033—3038.
6. Igamberdiev A. U., Ehwald R. // *Soviet Plant Physiol.* 1993. V. 40. № 1. P. 146—149.
7. Luck K., Ehwald R., Ziska P., Koppitz H. // *Plant Sci.* 1992. V. 82. № 1. P. 29—35.
8. Ключиниченко В. Е., Якимов С. А., Мальцев К. В., Арутюнян А. М., Иванов А. Е., Вульфсон А. Н. // *Биоорган. химия*. 1992. Т. 17. № 12. С. 1478—1476.
9. Ключиниченко В. Е., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Бельев С. В. // *Журн. физ. химии*. 1991. Т. 65. № 10. С. 2840—2842.
10. Ealick S. E., Cook W. J., Vijay-Kumar S., Carson M., Nagabhushan T. L., Trotta P. P., Bugg C. E. // *Science*. 1991. V. 252. P. 698—702.
11. Hsu Y. R., Arakawa T. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 7959—7963.

Поступила в редакцию
8.X.1993

V. E. Klyushnichenko, A. N. Wulfson, C. Titel^{*}, R. Ehwald^{*},
A. I. Miroshnikov

SEPARATION OF RECOMBINANT PROTEINS BY VESICLE CHROMATOGRAPHY

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov *Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*
^{*} *Humboldt-University, Department of Biology, Berlin*

Key words: recombinant proteins, vesicle chromatography.

Vesicle chromatography, a recently developed method for separation of biomolecules, uses the vesicular packing (VP) material (clusters of microcapsules derived from plant cells), which was tested with respect to its application for the recombinant protein separation. Since VP has a well-defined separation limit, biomolecules are distributed in two separate peaks: large molecules are excluded and small molecules permeate through cell walls into the empty cell lumen. Recombinant proteins frequently form oligomers, which differ from monomers not only in size but also chemically and biologically. In the present study, separations of the recombinant proinsulin fusion protein oligomer and monomer, the recombinant human γ -interferon monomer and dimer and recombinant tumour necrosis factor- α were investigated. For peak identification, the fractions and starting samples of the recombinant proteins were analysed by HPLC. The separations occurred without any sorption effects and with high efficiency and resolution of the protein peaks at a short column (10 cm). The VP is characterised by a high load ability, which favours the scale-up purification of the recombinant proteins. The combination of VP and HPLC is a considerable advance in biotechnology separation.

Address: M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov *Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117871, GSP, Moscow, V-437, Russia. Fax +(095) 3307410.*
^{*} *Humboldt-University, Department of Biology, Invalidenstr. 42, D(0)-1040 Berlin, Germany.*