



КОМПОЗИЦИОННЫЕ ФТОРПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОПОЛИМЕРОВ

© 1998 г. Д. В. Капустин[#], В. В. Сабуров, Л. Л. Завада,
А. В. Евстратов*, Г. Б. Барсамян**, В. П. Zubov

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Научно-исследовательская лаборатория прикладной экологии Минздравмедпрома РФ, Москва;

** Институт прикладной химической физики РАН (РИЦ "Курчатовский институт"), Москва

Поступила в редакцию 13.03.98 г. Принята к печати 01.07.98 г.

Для выделения и очистки биополимеров в неденатурирующих условиях синтезированы композиционные фторполимерсодержащие сорбенты на основе пористых кремнезёмов. Приведены примеры использования таких сорбентов при разделении различных смесей пептидов, белков, очистки нуклеиновых кислот из различных источников (плазмидная ДНК, ДНК из ядросодержащих клеток крови человека) с использованием "картриджного" (патронного), колоночного, "batch" (адсорбция в перемешиваемом объеме) методов. Показана целесообразность использования указанных сорбентов в лабораторной практике, поскольку такие материалы селективны к нуклеиновым кислотам (ДНК и РНК) и белкам. Данные материалы сочетают механические свойства неорганической матрицы со специфическими сорбционными свойствами полимерной фазы и характеризуются повышенной гидролитической стабильностью в щелочных условиях. Описаны альтернативные методы получения и тестирования политетрафторэтилен-, политрифторстирол- и полифторбутадиенсодержащих сорбентов. На примере синтеза сорбентов последнего типа рассматривается принципиально новый метод получения фторированных полимерных фаз, предварительно сформированных на поверхности пористых дисперсных носителей с использованием дифторида ксенона.

Ключевые слова: сорбенты композиционные; кремнезёмы модифицированные; фторсодержащие стационарные фазы; агенты фторирующие; хроматография биополимеров; разделение ДНК, РНК, белков.

В последние годы успешно разрабатываются сорбционные материалы, позволяющие проводить эффективное разделение и очистку биологически активных соединений с сохранением их функциональных свойств. Перспективными в этом направлении оказались работы по созданию новых фторполимерсодержащих сорбентов для разделения и очистки биополимеров.

Как известно, к идеальному сорбенту предъявляется целый ряд требований, которым используемые на практике материалы обычно удовлетворяют лишь отчасти – в соответствии с задачами по разделению конкретных веществ. К таким требованиям нужно отнести низкую неспецифическую сорбцию, устойчивость при работе в ши-

роком диапазоне растворителей, рН и окислителей, селективность, регенерируемость, механическую стабильность и прочее.

В наиболее полной мере таким требованиям отвечают композиционные сорбенты, т.е. материалы, сочетающие в себе свойства неорганического жесткого носителя и специфические свойства полимерной фазы. Подобные материалы характеризуются заданной механической прочностью, пористостью и гидродинамическими характеристиками исходного носителя и специфическими характеристиками – определенной селективностью, смкостью, обусловленными наличием на носителе сформированной тем или иным способом стационарной фазы. Полимерная стационарная фаза может играть роль селективного лиганда, и предохранять носитель от гидролитического разрушения [1].

Материалы, содержащие фторированные полимерные фазы, весьма перспективны для создания композиционных сорбентов для выделения и очистки биологически активных соединений. Способы получения таких материалов разнообразны,

Сокращения: ПТФЭ – политетрафторэтилен, ПТФС – политрифторстирол, ПФБД – полифторбутадиен, МПС – макропористое стекло, DMAE – диметиламиноэтил, TFA – трифторуксусная кислота, EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота, TE – буферный раствор (Трис + EDTA), TBE – буферный раствор (Трис + борная кислота + EDTA динатриевая соль).

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-06-00, 304-22-01, факс: (095) 330-70-10, e-mail: Zubov@ibch.siohc.ras.ru).

и выбор их может определяться как доступностью исходных материалов, так и комплексом необходимых свойств конечного продукта.

Нами за последние годы разработано и опробовано при выделении и очистке биологически активных соединений большое число сорбентов, содержащих фторированные полимерные стационарные фазы. Методики получения и принципы, лежащие в их основе, весьма различны, однако такие сорбенты можно отнести к одному классу благодаря специфическим свойствам, определяемым фторированной полимерной фазой [2].

Атом фтора – наиболее электроотрицательный из всех элементов, занимает малый объем, что обуславливает незначительные стерические затруднения при межмолекулярных взаимодействиях с участием фторуглеродов и способствует образованию ими однородных покрытий. Последние содержат углеродные цепи в максимально окисленном состоянии и, следовательно, отличаются очень высокой химической стабильностью.

Наиболее подходящими для синтеза композиционных сорбентов оказались носители на основе оксида кремния: кремнеземы и макропористые стекла, различающиеся значениями пористости и размерами частиц. Пористое стекло представляет собой особую форму кремнезема [3], получаемого из расплава гомогенного боросиликатного стекла, разделяющегося при охлаждении на две несмешивающиеся жидкие фазы. При определенном составе эти фазы образуют взаимопроникающие сетки. Затвердевание системы этих фаз можно осуществить на любой стадии образования сетки, а соединения бора можно растворить в сильной кислоте и таким образом отделить. Остающееся чистое высокопористое вещество имеет губчатую структуру.

На поверхности таких пористых частиц имеется большое количество разнообразных заряженных групп (различные гидроксильные и силоксановые), определяющих высокие значения неспецифической сорбции для многих компонентов разделяемых смесей природных соединений, что может приводить к многоточечному контакту молекул сорбата (прежде всего белков) с поверхностью сорбента и являться причиной необратимой сорбции и даже денатурации последних [4]. Такие взаимодействия значительно увеличивают времена удерживания и потери биополимеров и приводят к асимметрии и размыванию пиков на хроматограмме. Поэтому применение таких материалов без надлежащей модификации оказывается неэффективным. Кроме того, кремнеземы неустойчивы в щелочных и кислотных средах, что ограничивает диапазон рН их использования, а также делает невозможным их полное регенерирование и стерилизацию.

В значительной мере эти проблемы решаются при формировании на поверхности макропористых частиц полимерной фазы, экранирующей неорганическую поверхность. Выбор способов формирования полимерной фазы определяется геометрическими параметрами исходного носителя, а также доступностью для исследователя мономера, образующего полимерную фазу, либо свойствами растворов полимеров, используемых для этого. Важно добиться равномерного покрытия слоем полимера как внешней поверхности частицы носителя, так и внутренней поверхности ее пор. Кроме того, необходимо соблюдать определенные условия проведения процесса формирования полимерной фазы, при которых не происходит закупорки узких участков пор. Полимерное покрытие должно быть прочно связано с поверхностью кремнезема, чтобы предотвратить его вымывание при проведении хроматографии и регенерации в водно-органических элюентах.

Удовлетворительные результаты были получены при формировании полимерной фазы путем так называемой радиационной пост-полимеризации тетрафторэтилена из газовой фазы [5] в результате совместного облучения кремнезема и тетрафторэтилена при 77 К и последующей полимеризации при разогреве системы вне зоны облучения. Таким образом был впервые осуществлен синтез композиционных сорбентов для обращенно-фазовой хроматографии биополимеров.

γ -Иницирированная пост-полимеризация тетрафторэтилена на кремнеземе была принята в качестве основного метода получения композиционных сорбентов поскольку при проведении полимеризации в жидкой среде прививаемый полимер образует не сплошной слой, а отдельные глобулы на активированной кремнеземной поверхности. Полученные перфторполимерсодержащие материалы оказались достаточно устойчивыми в диапазоне значений рН среды от 1 до 14. В частности, в щелочных и сильно кислых средах они значительно превосходят по устойчивости немодифицированные кремнеземы и коммерческие силилированные силикагели. Промывание таких сорбентов органическими растворителями, например, этанолом, пропанолом, ацетонитрилом, хлороформом и др., а также водными растворами солей с высокой ионной силой или 6М мочевиной не меняет их адсорбционные свойства. Такие сорбенты выдерживают длительную термообработку при температурах до 200°C без заметной потери хроматографических свойств.

На ПТФЭ-содержащих сорбентах изучали эффективность сорбции тРНК *Escherichia coli* из водных и водно-спиртовых буферов в зависимости от количества вводимых в колонку проб в сравнении с сорбцией на МПС и МПС, модифицированном гексафторпропиленом. Заметная необра-

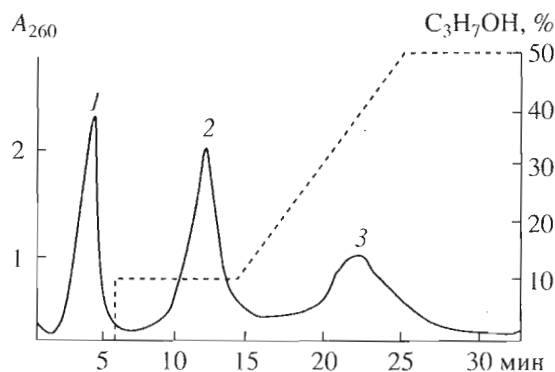


Рис. 1. Очистка плазмиды рВR 322 от РНК и сопутствующих белков. Колонка: МПС-2000ГХ-ПТФЭ. Элюент: 0,01М Трис-НСI (рН 7,5–8,2). Градиент: 0–50% пропанола за 20 мин. Скорость потока: 100 мкл/мин. 1 – плазида, 2 – РНК, 3 – белки [6].

тимая сорбция тРНК наблюдалась при этом из водных буферов. Однако при сорбции из буферов, содержащих всего 5% пропанола, необратимо сорбировалось не более 5% введенной тРНК [5].

Синтезированные сорбенты использовали для избирательной обратимой сорбции биологических макромолекул. Подобные задачи легко решаются путем регулирования полярности и/или гидрофобности элюента, на чем основаны методы обращенно-фазовой и гидрофобной хроматографии.

ПТФЭ-содержащий сорбент на основе МПС-2000ГХ оказался весьма эффективным при концентрировании, обессоливании и депротеинизации тРНК. Например, раствор тРНК с высокой ионной силой и примесями белка удается обессолить с количественным выходом и очистить за один короткий цикл [6].

Селективность ПТФЭ-содержащего сорбента позволяет разделять также смеси нуклеиновых кислот. Например, при пропускании через микроколонку с сорбентом раствора плазмиды рВR 322 с примесями РНК и белков в буфере с рН 7,5–8,2, РНК и белки остаются на колонке, а плазида оказывается в элюате (рис. 1). Далее элюирование проводят 10% пропанола в Трис-НСI-буфере, при этом фракция, содержащая РНК, разделяется на две зоны, хорошо видимые на электрофорезе в 1% агарозном геле. Последующее элюирование в линейном градиенте концентрации пропанола в том же буфере (10–50%, 10 мин) приводит к десорбции белков [6].

В качестве примера очистки белков на ПТФЭ-содержащем сорбенте можно привести разделение смеси, содержащей α -интерферон и нуклеиновые кислоты, при градиентном элюировании ацетони-трилом в 7М мочеvine.

Кремнеземные сорбенты на основе модифицированных методом радиационной полимериза-

ции политетрафторэтиленом силикагелей Лихросфер и Армсорб с диаметрами пор 10, 30, 50 нм с успехом применяли для разделения стандартных пептидов, пептидов бромцианового гидролизата бактериородопсина, защищенных и незащищенных олигонуклеотидов, жирорастворимых витаминов. Эксперименты с ПТФЭ-содержащими сорбентами со ссылками на методики их синтеза опубликованы, например, в [5–7].

Принципиально отличный от радиационной полимеризации способ формирования полимерных фаз на дисперсных пористых поверхностях заключается в хемосорбции на носителе предварительно синтезированных сополимеров, имеющих в своем составе реакционноспособные “якорные” группы. Для этого был синтезирован сополимер трифторстирола и метилвинилдиэтоксисилана, который удалось сорбировать на поверхности кремнезема за счет конденсации этоксигрупп сополимера с поверхностными силанольными группами носителя [8]. Полученный таким образом ПТФС-содержащий сорбент, оказался пригодным для проведения обращенно-фазового разделения смесей биологически активных соединений [8, 9].

В работе [8] изучали также хемосорбцию из растворов на поверхность носителя трифторстиролсодержащих сополимеров, изменяя как количество вводимого в раствор сополимера (от 44 до 470 мг/г МПС), так и концентрацию используемых растворов (от 2,5 до 40 мг/мл). Как оказалось, хемосорбция одинаково эффективна в интервале температур от 60 до 110°C во всем диапазоне использованных концентраций. При этом весь вводимый в реакцию смесь полимер хемосорбируется за 10–15 мин. По-видимому, это происходит благодаря наличию большого числа якорных этоксигрупп в макромолекуле сополимера. При этом для фиксации макромолекулы на поверхности кремнезема достаточно реакции одной этоксигруппы с поверхностной силанольной группой носителя, а затем происходит присоединение полимера по другим этоксигруппам.

При увеличении количеств хемосорбируемого сополимера вплоть до 450 мг/г МПС наблюдали практически линейную зависимость количества хемосорбированного сополимера от исходной концентрации раствора, т.е. эффект насыщения поверхности носителя отсутствовал. Этот факт можно объяснить на основании предположения, что после формирования полимерного слоя, эффективно экранирующего поверхность кремнезема, хемосорбция других макромолекул сополимера может продолжаться за счет наличия в них силанольных групп, образующихся в результате гидролиза якорных алкилэтоксигрупп следами воды. При этом одной силанольной группы может оказаться достаточно для фиксации следующей макромолекулы сополимера. За счет после-

дующего взаимодействия с алкоксигруппой этой макромолекулы может образовываться более сложная (многослойная) структура полимерной фазы. Появляющиеся при этом полимерные "петли" и "хвосты" способствуют возрастанию числа центров адсорбции, что повышает неспецифическую сорбцию разделяемых компонентов и снижает выход "чистых" продуктов [4].

Наряду с этим для синтеза ПТФС-содержащих сорбентов применяли метод γ -инициированной радикальной пост-полимеризации трифторстирола на поверхности пористого кремнезема, предварительно модифицированной ПТФЭ [8, 9]. Модифицированный кремнеземный носитель облучали при 77 К с целью образования на его поверхности свободных радикалов. Затем в систему вводили пары трифторстирола при 333 К. Радиолит без предварительного охлаждения приводил к частичному разрушению ПТФЭ слоя, ухудшал качество синтезированных сорбентов. Этого удалось избежать при предварительном охлаждении образцов [8]. Основной причиной того, что при пост-полимеризации трифторстирола непосредственно привитым к поверхности оказывается не более 25–30% исходного мономера, следует считать, видимо, димеризацию последнего, которая является основным побочным процессом при радикальной полимеризации трифторстирола [2].

Синтезированные описываемыми двумя способами ПТФС-содержащие сорбенты применяли в обращенно-фазовой хроматографии различных белков, пептидов и антибиотиков, преимущественно пептидной природы, а также ряда реальных смесей веществ пептидной и гликопептидной природы [9]. Например, разделяли смеси пептидов и белков с молекулярными массами от нескольких сотен (эндорфин, брадикинин) до десятков тысяч дальтон (бычий сывороточный альбумин), а также смеси пептидов и белков близкой молекулярной массы. На рис. 2 представлена хроматограмма разделения компонентов пчелиного яда. Параметры удерживания белков и пептидов в этом случае имеют значения, характерные для традиционных обращенных фаз типа C_8 - C_{18} (ср. [10]), что подтверждает основную роль гидрофобного механизма удерживания соединений белковой природы на модифицированных политрифторстиролом кремнеземах.

На основе ПТФС-содержащих композиционных сорбентов была также синтезирована серия катионо- и анионообменников различной емкости [8]. С точки зрения стабильности матрицы в условиях полимераналогичных превращений [11], наиболее подходящим оказался композиционный материал МПС-2000ГХ-ПТФС. Изменяя температуру реакционной смеси, получали ионообменники различной емкости (от 95 до 300 мкмоль/г сорбента). На основе сульфохлоридных произ-

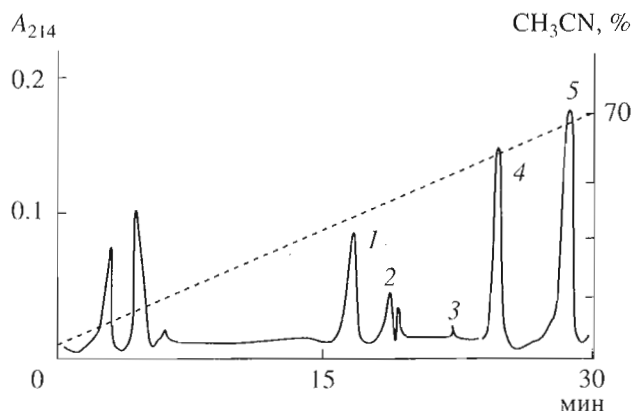


Рис. 2. Разделение компонентов пчелиного яда на колонке Silasorb 300-ПТФЭ (250 × 4.6 мм). Элюент: 0.1% TFA, градиент: 5–70% CH_3CN за 30 мин. Скорость потока: 1 мл/мин. 1 – апамин, 2 – MCD-пептид, 3 – скарпанин, 4 – фосфолипаза, 5 – мелиттин [9].

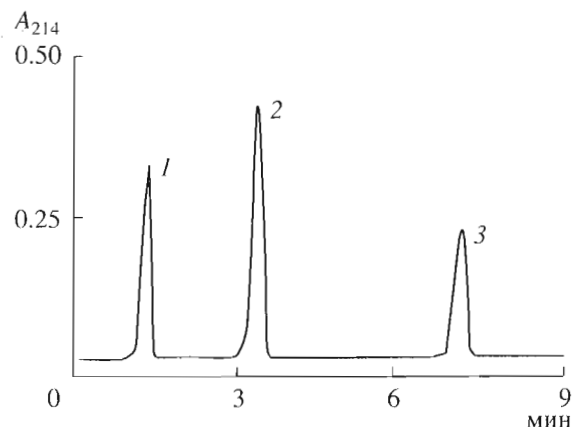


Рис. 3. Разделение моно- (1), ди- (2) и трифосфатов (3) аденозина на колонке (4.6 × 50 мм) с анионообменником Silasorb 300-ПТФЭ- $SO_2NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$. Элюент: Трис- HCl , 0.05M NaCl (pH 8.2). Скорость потока: 1 мл/мин [8].

водных катионообменников обработкой алкилзамещенными диаминами были синтезированы образцы DEAE-сорбентов. Полученные указанными способами ионообменники использовались при разделении инсулина и дезаминоинсулина, а также нуклеотидфосфатов [8] (рис. 3).

Несмотря на успешное применение фторполимерсодержащих сорбентов, получаемых указанными методами, ввиду их высокой стоимости, а также сложности или невозможности полимеризации ряда желательных для введения в состав сорбента исходных мономеров целесообразным кажется поиск новых способов получения таких материалов. Альтернативой описанным методикам является химическая модификация поверхности нанесенного на матрицу тем или иным способом полимера посредством обработки ее фтором,

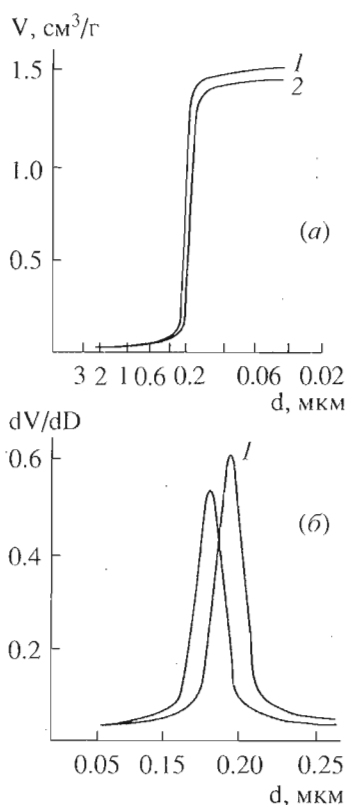


Рис. 4. Интегральные (а) и дифференциальные (б) кривые, полученные при ртутной порометрии образцов необработанного МПС-2000ГХ (1) и МПС-2000ГХ, модифицированного фторированным полибутадиеном (2). Снижение значений эффективного диаметра пор (2), а также удельного объема пор (V , $\text{см}^3/\text{г}$) свидетельствует о наличии полимерной фазы на внутренней поверхности пор.

т.е. введение в химическую структуру полимерного слоя атомов фтора. При этом поверхностный полимерный слой приобретает свойства фторсодержащих полимеров, причем объемные свойства полимера не изменяются. Обычно оптимальным оказывается метод прямого фторирования, т.е. полимер обрабатывают смесью газообразного фтора и азота в определенном соотношении в течение заданного времени [12]. Однако фтор токсичен и взрывоопасен при определенных условиях [13], а меры безопасности, необходимые при его использовании, значительно повышают стоимость получаемого продукта.

Подобные трудности удалось во многом преодолеть, применив нетрадиционный фторирующий агент – дифторид ксенона, представляющий собой белое кристаллическое вещество пожаро- и взрывобезопасное, устойчивое при температурах до 500°C и удобное в обращении [13].

В процедуре выделения и очистки нуклеиновых кислот из различных источников мы использовали серию композиционных ПФБД-содержа-

щих сорбентов различной пористости на основе МПС. В качестве исходного соединения для создания полимерной фазы такого типа на поверхности макропористого стекла МПС-2000ГХ был выбран олигобутадиен (с молекулярной массой около 10000; с содержанием 1,2-звеньев в цепи 40.1%), поскольку данное вещество хорошо охарактеризовано, доступно, и подвергается фторированию в относительно мягких условиях. Процедуру нанесения олигомерного покрытия осуществляли, вводя раствор олигомера в предварительно вакуумированную ампулу, содержащую навеску МПС, и отгоняя растворитель. После отмывки и сушки полученный материал подвергали фторированию. В ампулу помещали дифторид ксенона, пары которого циркулировали с током инертного газа через трубку, снабженную фильтрами на входе и выходе. Трубку предварительно заполняли фторируемым материалом. В этой реакционной трубке током газа, генерируемым насосом, создавался режим псевдооживления. Скорость циркуляции паров дифторида ксенона через систему, температуру и продолжительность процесса можно регулировать. Реакция фторирования происходит на границе раздела фаз: поверхность полимера / пары дифторида ксенона.

Структурные характеристики исходных и модифицированных стекол изучали методом ртутной порометрии. Полученные при этом дифференциальные и интегральные кривые распределения пор по эффективным диаметрам свидетельствовали, что средние значения диаметров пор в модифицированных образцах МПС снижались, однако при этом материалы сохраняли высокую пористость. Уменьшение удельного объема пор также подтверждало наличие полимерного покрытия на внутренней поверхности пор, а не только на внешней поверхности частиц. Разница в диаметре пор исходных и модифицированных МПС составила в среднем 60 \AA (рис. 4).

Об устойчивости сорбентов в щелочной среде судили по переходу кремнезема носителя сорбента и немодифицированного стекла в водный раствор буфера с рН 9.2, измеряя концентрацию силикат-ионов в этом растворе после инкубирования в указанном буфере в течение 8 ч тестируемых навесок с последующим добавлением подкисленного серной кислотой раствора молибдата натрия [ср. 14]. Измерения проводили спектрофотометрически по образованию кремниймолибденовой кислоты ($\lambda_{\text{max}} 370 \text{ нм}$). Полученные нами спектрограммы подтверждали, что образцы носителей, модифицированных фторированным полибутадиеном, в среднем в 2.5–3 раза превосходят по гидролитической стабильности исходные образцы МПС. Положительный эффект экранирования поверхности носителя слоем ПФБД, таким образом, состоит в повышении гидролитической стабильности

неорганической матрицы сорбента в стандартных условиях проведения хроматографического процесса в сравнении с немодифицированным носителем.

Синтезированные нами ПФБД-содержащие сорбенты были использованы в процедуре выделения плазмидной ДНК и ДНК ядросодержащих клеток крови человека. Сорбенты замачивали в метаноле, дегазировали, многократно обрабатывали ТЕ-буфером и упаковывали в пластиковые картриджи или стеклянные колонки.

Первые эксперименты по тестированию сорбентов проводили с плазмидными ДНК. Относительно небольшой размер этих молекул облегчает работу с ними при тестировании сорбентов. Источником плазмидных ДНК служили клетки грамотрицательной бактерии *E. coli* (штамм JM 109).

Наиболее известные ранее методики очистки плазмидных ДНК после щелочной обработки клеточных лизатов, при которой в виде осадка отделяется основная часть геномной ДНК, РНК и белков, включают: центрифугирование в градиенте плотности в присутствии интеркалирующего красителя или поэтапную обработку раствора ДНК фенолом, смесью фенола с хлороформом и хлороформом [15–18]. В первом случае трудно точно визуально оценивать наличие ДНК в образце, второй способ достаточно трудоемок, учитывая сопутствующую процедуру перегонки фенола и небезопасен для здоровья.

Процедура очистки образцов с применением фторполимерсодержащих сорбентов предельно проста. Раствор, полученный после щелочной экстракции клеточного лизата, и содержащий ДНК, РНК, и сопутствующие белки в ТЕ-буфере (рН 7.5–8.0), наносили на сорбент и элюировали ТЕ-буфером, элюат анализировали спектрофотометрически при λ 260 нм и 280 нм. Плазмидная ДНК элюируется первой. Вслед за ней тем же буфером элюируется РНК. Белки удается выделить, проводя последующее элюирование 50% метанолом. Тем самым сорбент легко регенерируется. Фракции анализировали в электрофорезе в 0.8% агарозном геле. Полученные результаты представлены на спектрограмме и электрофореграмме (рис. 5). Соотношение интенсивностей поглощения ДНК : белок $\approx 2 : 1$ для фракции, содержащей ДНК, свидетельствует о хорошем отделении белков.

Удобство и простота эксперимента обуславливались и тем, что и сорбент, и образец находились в традиционном для плазмидных ДНК очень слабом 0.05М Трис-буфере, содержащем символические количества EDTA (1 мМ).

Для выделения более крупной ДНК из крови человека нами было разработано несколько методик с использованием синтезированных сорбентов. Ранее известные методы выделения ядерной ДНК имеют ряд недостатков. Так, метод Ле-

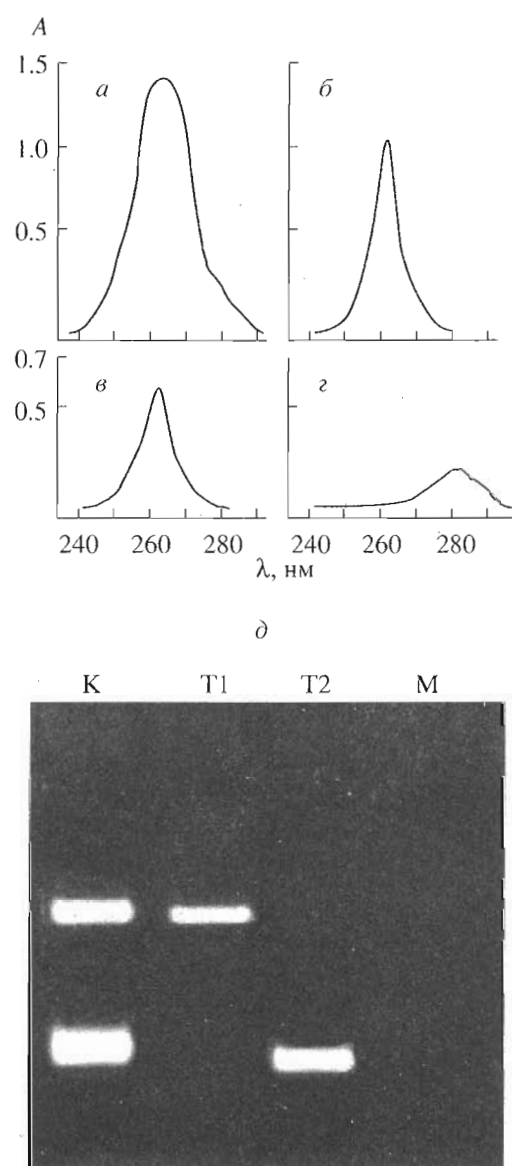


Рис. 5. Спектрограммы фракций, собранных при картриджном варианте выделения плазмиды pBR 322 на сорбенте МПС-2000ГХ-ПФБД: а – раствор плазмиды в ТЕ-буфере (рН 7.5–8.2) перед нанесением на картридж; б, в – первая и вторая фракции после элюирования ТЕ-буфером; г – фракция после элюирования 50% метанолом; д – электрофореграмма собранных фракций в 0.8% агарозном геле (К – контрольный образец – раствор плазмиды в ТЕ-буфере до выделения; Т1, Т2 – элюирование ТЕ-буфером; М – элюирование 50% метанолом).

адона [19], в котором ДНК выделяли на поликарбонатных фильтрах, либо метод выделения ДНК с помощью хлоргидрата гуанидина [20], неприменимы при выделении ДНК из ядросодержащих клеток крови, а метод Хаусера [21] или метод Миллера [22] – достаточно трудоемки и сопровождаются значительным увеличением объема исследуемого образца.

В сравнении с перечисленными методами предложенные нами процедуры выделения ДНК из ядросодержащих клеток крови человека требуют меньше затрат времени и реактивов.

Так, после выделения и лизиса ядросодержащих клеток с одновременной обработкой протеиназой К [23], получали препарат, ДНК из которого выделяли, сорбируя примеси на хроматографической колонке с ПФБД-содержащим сорбентом. При этом образец, содержащий ДНК, растворяли в ТЕ-буфере и наносили на колонку с сорбентом, уравновешенную этим же буфером. Для очистки колонки от примесей, сорбировавшихся после элюирования ТЕ-буфером и попытки их разделения, последующую элюцию проводили в режиме линейного градиента концентрации изопропанола (0–70%) в ТЕ-буфере. Спектрофотометрический и электрофоретический контроль состава фракций показал, что ДНК элюируется с колонки ТЕ-буфером в “мертвом” объеме.

Удачным оказался также упрощенный метод выделения ДНК, заключающийся в сорбции примесей сорбентом в перемешиваемом объеме (в режиме “batch-процесса”). Раствор, полученный после лизиса клеток и обработки лизата протеиназой К, разбавляли ТЕ-буфером, вносили в пробирку, содержащую суспензию сорбента в том же буфере. Операцию повторяли дважды. По данным электрофореза в 0.8% агарозном геле в первом супернатанте содержалось около 60%, а во втором – около 40% ДНК от ее суммарного количества в образце. При этом ни в первом, ни во втором супернатантах РНК на электрофореграмме обнаружена не была. Полученные растворы ДНК в ТЕ-буфере имели соотношение $\lambda_{260}/\lambda_{280} = 1.5–1.66$.

Таким образом, объемно-пористые композиционные фторполимерсодержащие сорбенты благодаря специфическим свойствам фторированных полимерных фаз в сочетании с механическими свойствами неорганической матрицы, с успехом применимы в лабораторной практике при выделении и очистке биополимеров. Такие материалы селективны как для разделения нуклеиновых кислот от белков, так и ДНК от РНК. Их использование позволяет экономить время и реактивы, получая препараты выделяемых соединений в неденатурирующих условиях в практически бесслезных средах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали в качестве неорганической матрицы макропористое стекло марки МПС-2000ГХ (средний диаметр пор 200 нм), фракция <0.16 мм, удельный объем пор 1.6 см³/г, удельная поверхность 33 м²/г (Горьковский опыт-

ный завод ВНИИ НП, Россия). МПС предварительно замачивали в 18% соляной кислоте в течение 3 сут, отмывали водой до нейтральных значений pH, сушили до постоянного веса в вакуумном сушильном шкафу; олигобутадие (молекулярная масса 10000, содержание 1,2-звеньев 40.1%, получен на кафедре “Синтез полимеров” МГАТХТ им. М.В. Ломоносова); н-гексан (Fluka, США); метанол (Sigma, США). ТЕ-буфер: 0.05 М Трис, 1мМ EDTA, pH 7.5–8.2. В качестве препаратов ДНК использовали плазмиду pBR 322, а также ДНК ядросодержащих клеток периферической крови человека.

Синтез сорбента МПС-2000ГХ-ПФБД проводили на установке, представляющей собой вакуумируемую колбу (объемом 100 мл), содержащую навеску МПС (10 г), соединенную с герметически закрывающейся емкостью, содержащей предварительно подготовленный раствор олигобутадие (0.08 г/г МПС) в н-гексане (50 мл). После вакуумирования в течение 0.5 ч колбы с навеской МПС при перекрытой вакуумной линии в колбу вводили раствор олигомера, смачивающий при этом навеску. Отгоняя растворитель в этой же установке в течение 0.5 ч с использованием водяной бани (70°C) с последующей сушкой при комнатной температуре в течение ночи, промывкой метанолом (0.5 л) и дополнительной сушкой (80°C, 3 ч), получали полупродукт, который подвергали фторированию.

Фторирование полимерной фазы, адсорбированной на поверхности пор носителя, проводили на специальной установке в режиме “псевдооживления”, продувая аргон в течение 3 ч через реакционную трубку, заполненную навеской сорбента и парами возгоняемого в специальной камере дифторида ксенона. Полученный сыпучий образец сорбента белого цвета не смачивается водой.

Для оценки гидролитической стабильности сорбентов два образца МПС (немодифицированного и модифицированного фторполибутадиеном) одинаковой массы предварительно замачивали в 70% метаноле на ночь, затем добавляли равный объем буфера (pH 9.5), содержащего 0.025 М борат натрия и 0.1 М гидроксид натрия, осаждали сорбент, центрифугируя в течение 1 мин при 3000 об/мин, отбрасывали супернатант, вновь добавляли буферный раствор до получения 10% суспензии сорбента (по массе) и инкубировали образцы в этом буфере при комнатной температуре в течение 8 ч. Добавляли раствор 0.05 М молибдата натрия, подкисленный серной кислотой (1/200 объема раствора молибдата натрия) и перемешивали суспензию 10 мин; после осаждения сорбента пипеткой отбирали аликвоты надосадочной жидкости и измеряли интенсивность поглощения

при λ 370 нм, снимая спектрограммы на спектрофотометре Векстан.

Ртутную порометрию образцов сорбента проводили на приборе "Poresizer 9300" (Micromeretics, США). Образец сорбента помещали в чашку пенетрометра, представляющего собой полый открытый с двух концов стержень со стеклянной чашкой на одном конце, вакуумировали и приводили в контакт с металлической ртутью. Ртуть заполняла внутренний стержень пенетрометра и объем чашечки, свободный от частиц сорбента, затем к открытому концу пенетрометра прикладывали давление. При этом ртуть вдавливалась в поры сорбента, а внутренний объем стержня пенетрометра частично освобождался. По разнице электрической емкости конденсатора, "пластинами" которого служат металлическая поверхность стержня пенетрометра и поверхность столбика ртути, рассчитывали объем вдавленной в поры ртути. Зависимости объема вдавленной ртути при данном давлении от диаметра пор представляли в виде дифференциальных и интегральных кривых вдавливания ртути или, что то же самое, в виде кривых распределения пор по эффективным диаметрам.

Очистку плазмидной ДНК осуществляли, нанося раствор (400 мкл), содержащий ДНК, РНК и сопутствующие белки в ТЕ-буфере после щелочной экстракции клеточного лизата (очистка была более эффективной, если из препаратов дополнительно удаляли с помощью хлорида лития рибосомную РНК [23]) на сорбент, содержащийся в пластиковом картридже (7 × 25 мм), вмещающем 0.3 г сорбента. Фракции элюата собирали в микропробирки (по 400 мкл в каждую). Наличие ДНК во фракциях подтверждали спектрофотометрически при λ 260 нм и по результатам электрофореза в 0.8% агарозном геле в ТВЕ-буфере. ДНК окрашивали бромидом этидия и фиксировали при облучении длинноволновым УФ-светом.

Получение препарата ДНК ядродержащих клеток крови. 15 мл крови центрифугировали для отделения форменных элементов, эритроциты лизировали, ядродержащие клетки концентрировали центрифугированием. Проводили лизис клеток и их ядер с одновременной обработкой протеиназой К при 37°C в течение ночи.

Выделение ДНК из крови человека проводили, нанося 200 мкл исследуемого образца на колонку 7 × 26 мм, содержащую сорбент МПС-2000ГХ-ПФБД. Использовали линейный градиент изопропанола (0–70%, 60 мин) в ТЕ-буфере.

Очистка ДНК ядродержащих клеток человека сорбцией примесей в объеме проводили, разбавляя в два раза ТЕ-буфером препарат ядерной ДНК, полученный после лизиса клеток и обработ-

ки протеиназой К [23], вносили в пробирку, содержащую примерно такой же объем суспензии сорбента в ТЕ-буфере, встряхивали 5–10 мин, инкубировали раствор с сорбентом еще 10 мин (все операции проводили при комнатной температуре), седиментировали 2 мин на настольной центрифуге центрифугированием при 3000 об/мин и отбирали супернатант. Далее сорбент заливали новой порцией ТЕ-буфера (равной объему сорбента) и процесс повторяли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даванков В.А., Навратил Дж., Уолон Х. Лигандообменная хроматография. М.: Мир, 1989.
2. Фторполимеры. Под ред. Л. Уолла; Пер. с англ. М.: Мир, 1975.
3. Лисичкин Г.В., Кудрявцев Г.В., Сердан А.А., Староверов С.М., Юффа А.Я. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии. М.: Химия, 1986. С. 34–35.
4. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 45, 261.
5. Сабуров В.В., Муйдинов М.Р., Гурьянов С.А., Катаев А.Д., Туркин С.И., Зубов В.П. // Ж. физ. химии. 1991. Т. 65. С. 2692–2698.
6. Сабуров В.В. Синтез композиционных перфторполимерсодержащих сорбентов и их использование в хроматографии биополимеров. Дис. ... канд. хим. наук. М.: Моск. ин-т тонкой хим. технологии им. М.В. Ломоносова, 1989.
7. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.P. // Adv. Polym. Sci. 1992. V. 104. P. 136.
8. Катаев А.Д. Синтез композиционных политфторстиролсодержащих сорбентов и их использование в хроматографии биополимеров. Дис. ... канд. хим. наук. М.: Моск. ин-т тонкой хим. технологии им. М.В. Ломоносова, 1993.
9. Kataev A.D., Saburov V.V., Reznikova O.A., Kapustin D.V., Zubov V.P. // J. Chromatogr., A. 1994. V. 660. P. 131–136.
10. Препаративная жидкостная хроматография. Под ред. Б. Бидлингмейера. М.: Мир, 1990. С. 34, 247.
11. Энциклопедия полимеров. Под ред. В.А. Кабанова (гл. ред.). М.: Сов. Энциклопедия. 1972. Т. 2. С. 874.
12. Соединения фтора. Под ред. И. Исикава. М.: Мир, 1990. С. 19.
13. Руководство по неорганическому синтезу. Под ред. Г. Брауэра. М.: Мир, 1985. С. 313.
14. Крешков А.П. Основы аналитической химии. М.: Химия, 1976. Т. 1. С. 404.
15. Blin N., Stafford D.W. // Nucl. Acids Res. 1976. P. 2303–2308.
16. David G.L., Dibner M.D., Sambrook J. // J. Molecular Cloning. 1982. P. 280–281.
17. David G.L., Dibner M.D., Battey J.F. // Basic Methods in Molecular Biology / New York: Elsevier, 1986. P. 42–50.

18. Birnboim H.C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. P. 1513.
19. Leadon S.A., Cerutti P.A. // Anal. Biochem. 1982. V. 120. P. 282–288.
20. Bowtell D.L. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 463–465.
21. Civilla T.A., Sklar R.M., Hauser S.L. // Anal. Biochem. 1988. V. 174. P. 485–488.
22. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 1215.
23. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York, 1989. P. 9, 12.

Composite Fluoropolymer-containing Sorbents for Isolation and Purification of Biopolymers

D. V. Kapustin[#], V. V. Saburov*, L. L. Zavada*, A. V. Evstratov^{},
G. B. Barsamyan^{***}, and V. P. Zubov***

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

^{**}Research Laboratory of Applied Ecology, Ministry of Health and Medicinal Industry of the Russian Federation, Moscow

^{***}Institute of Applied Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
(Russian Research Center "Kurchatovskii Institut"), Moscow

Composite fluoropolymer-containing sorbents based on porous silicas were synthesized for the isolation and purification of biopolymers under non-denaturing conditions. Examples of the application of these sorbents in the separation of various mixtures of peptides and proteins and purification of nucleic acids from various sources (plasmid DNA and DNA from nucleated human blood cells) using the cartridge, column, and batch (sorption in a stirred volume) methods are presented. It was shown that the sorbents can be used in laboratory practice because they are selective to nucleic acids (DNA and RNA) and proteins. These materials combine the mechanical properties of the inorganic matrix with the specific sorption properties of the polymer phase and exhibit enhanced stability to alkaline hydrolysis. Alternative methods of preparing sorbents containing polytetrafluoroethylene, polytrifluorostyrene, and polyfluorobutadiene are described. By the example of polyfluorobutadiene-containing sorbents, a completely new method for obtaining fluorinated polymer phases was developed: the polymer phase was preliminarily formed on the surface of porous disperse carriers and was fluorinated with xenon difluoride.

Key words: composite sorbents, modified silica, fluorine-containing stationary phases, fluorinating agents, chromatography of biopolymers, separation of DNAs, RNAs, and proteins

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-0600 or +7 (095) 304-2201;
fax: +7 (095) 330-7010; e-mail: zubov@ibch.stobc.ras.ru.