



УДК 547.96.04:666.189.24

ПРОСТОЙ СПОСОБ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ
МАКРОПОРИСТЫХ СТЕКОЛ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ

Зубов В. Ш., Иванов А. Е., Туркин С. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Предложен метод химической модификации макропористого стекла, сильно снижающий адсорбцию ряда белков на его поверхности по сравнению с немодифицированным стеклом. Метод включает последовательную обработку стекла γ -аминопропилтриэтоксисиланом, акрилоилхлоридом и смесью перекиси водорода – уксусная кислота. Для связывания белков носитель обрабатывают раствором бромциана. Свойства носителя не изменяются в токе буферных растворов (рН 3,0–11,0) по крайней мере 2 ч.

Для иммобилизации белков чаще всего используются мягкие органические гели (сефароза, агароза, полиакриламид и др.). В последнее время для этой цели начинают применять макропористые стекла (МПС), которые, хотя и обладают рядом определенных преимуществ перед мягкими гелями [1], сильно адсорбируют белки. Чтобы уменьшить адсорбцию, стекла обычно обрабатывают кремнийорганическими реагентами, содержащими полярные неионогенные группы (диольную, амидную и др.) [2]. Однако синтез таких реагентов довольно трудоемок. Нами предлагается новый способ инактивации МПС, согласно которому поверхность стекла последовательно обрабатывается доступными химическими реагентами: γ -аминопропилтриэтоксисиланом, акрилоилхлоридом и, наконец, смесью H_2O_2 – CH_3COOH .

Обработку МПС раствором γ -аминопропилтриэтоксисилана проводили по методике [3]. Растворитель тщательно сушили перед употреблением, чтобы исключить поликонденсацию реагента. Концентрацию аминогрупп в аминосиланированном стекле в образце с диаметром пор 630 Å (300 мкмоль/г или 1,8 групп/нм²) определяли по методике [4], растворяя его в плавиковой кислоте и нейтрализуя далее раствор щелочью. Далее аминосиланированное стекло ацилировали, встряхивая 1 г стекла сначала 15–20 мин при 20°С с 4 мл 5% раствора акрилоилхлорида в эфире, а затем трижды по 1 мин со свежей смесью 0,2 мл акрилоилхлорида и 4 мл воды. При этом содержание NH_2 -групп снижается до 45 мкмоль/г.

Такой способ присоединения винильных групп к МПС не требует синтеза сложных винилсодержащих силанов и позволяет при необходимости пространственно разделять двойную связь и поверхность стекла. Уже после ацилирования МПС слабо адсорбирует белки. Еще более инертным становится оно после обработки в течение 1 ч при 45°С смесью 30%-ной H_2O_2 и уксусной кислоты (1:3, по объему). Такая обработка, кроме того, позволяет далее активировать полученную инертную поверхность стекла для ковалентного связывания белков. Это достигается последующей обработкой носителя раствором бромциана [5]. С использованием такого способа активации был получен препарат иммобилизованного α -химотрипсина. 1 г этого препарата эквивалентен по каталитической активности 6 мг нативного белка (активность определяли, измеряя начальную скорость гидролиза этилового эфира *L*-триптофана при рН 6,5), тогда как общее количество связанного химотрипсина 9 мг/г. Этот результат свидетельствует о возможности иммобилизации на полученном носителе белков с сохранением их природных функций.

Неспецифическую адсорбцию на носителе химотрипсина, гемоглобина и лизоцима определяли по методике [6]. Выход химотрипсина с колонки,

заполненной немодифицированным МПС, составил 7% (рН 6,5, ионная сила 0,1). После ацилирования аминосилилированного МПС выход химотрипсина достиг 80%, а после завершающей обработки смесью H_2O_2 — CH_3COOH выход белка 90% при рН 3,0; 85% при рН 6,5; 80% при рН 9,2. Выход гемоглобина в этих условиях 87% при рН 11,0; 100% при рН 6,5, тогда как выход лизоцима при рН 6,5 — 95%. После предварительного 2-часового промывания носителя буфером с рН 11,0 выходы химотрипсина при рН 6,5 и гемоглобина при рН 11,0 не изменяются. Это дает возможность активировать носитель бромцианом, как и сепарозу, при рН 11.

Можно предположить, что образовавшийся в результате трехстадийной обработки стекла защитный слой состоит из олигомеров N-замещенного полиакриламида, содержащего некоторое количество гидроксильных групп на концах олигомерной цепи. При этом олигомер в целом химически связан с поверхностью МПС каждым мономерным звеном. В пользу такой гипотезы говорит, например, высокая устойчивость полученного носителя в щелочной среде. После суточной обработки буфером с рН 11 адсорбция химотрипсина при рН 6,5 увеличивалась всего на 10%, оставаясь намного ниже, чем в случае немодифицированного стекла.

Таким образом, предлагаемый способ модификации МПС сильно снижает неспецифическую адсорбцию белков в интервале рН 3,0—11,0. Он может быть использован при создании носителей для эксклюзионной хроматографии белков, для их иммобилизации и биоспецифического выделения, а также для получения «привитых фаз» на силикатных поверхностях в различных вариантах твердофазного синтеза и твердофазной активации [7].

Авторы приносят благодарность П. П. Нефедову (ИАП АН СССР), предоставившему МПС с диаметром пор 2000 Å. В работе также использовали МПС-700 ГХ (СССР).

ЛИТЕРАТУРА

1. Haller W. Nature, 1965, v. 206, p. 693—696.
2. Unger K. K., Becker N., Poumeliotis P. J. Chromatogr., 1976, v. 125, p. 115—127.
3. Robinson P. J., Dunhill P., Lilly M. D. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 242, p. 659—661.
4. Svedas V.-J. K., Galaev I. J., Borisov I. L., Berezin I. V. Anal. Biochem., 1980, v. 101, p. 188—195.
5. Azen R., Myrin P. A., Janson J. C. Biopolymers, 1970, v. 9, № 4, p. 401.
6. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980, с. 237—239.
7. Mathur N. K., Narang C. K., Williams R. E. Polymers as aids in organic chemistry. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 53—137.

Поступила в редакцию
15.1.1982

A SIMPLE METHOD OF THE POROUS GLASS MODIFICATION FOR PROTEIN IMMOBILIZATION

ZUBOV V. P., IVANOV A. E., TURKIN S. I.

M. M. Shemyakin Institute of Biorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The proposed method of porous glass modification strongly decreases the adsorption of a number of proteins by the glass surface as compared to unmodified counterpart. It involves macroporous glass successive treatment with readily available reagents: γ -aminopropyltriethoxysilane, acryloyl chloride, and hydrogen peroxide — acetic acid mixture. To confer the support a capability of protein binding, it may be treated with cyanogen bromide, analogously to Sepharose. The properties of the support are not changed in a flow of buffer solutions (pH 3,0—11,0) for at least 2h.