



УДК 547.96.05:543.544.2

© 1990 г.

А. Е. Иванов, Л. В. Верховская*, С. Н. Хилько*,
В. П. Zubov

ТВЕРДОКАРКАСНЫЕ ШИРОКОПОРИСТЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ГИДРОФОБНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;

*ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ, Москва

Предложены новые твердокаркасные сорбенты для гидрофобной хроматографии белков, представляющие собой макропористое стекло (диаметр пор 2000 Å) с поверхностью, модифицированной хемосорбированными *N*-бутилполиакриламидом (Бутил-МПС) и *N*-бензилполиакриламидом (Бензил-МПС). Изучение изотерм адсорбции и условий десорбции модельных сорбатов — овальбумина и γ -глобулина — показало, что Бутил-МПС по свойствам близок к полужесткому сорбенту Butyl Toyopearl 650C (TOSOH, Япония), но обладает в 1,6 раза меньшей емкостью по связыванию γ -глобулина и одновременно в 2,8 раза лучшей проницаемостью для этого белка.

На примере очистки высокомолекулярных (M 3—4·10⁵ Да) поверхностных антигенов аденовирусов человека и птиц (гексонов) методом гидрофобной хроматографии проведено сравнение нескольких гидрофобных сорбентов (Бутил-МПС, Бензил-МПС, Butyl Toyopearl 650C, Phenyl Toyopearl 650S, Phenyl Sepharose CL-4B и Octyl Sepharose CL-4B). Все сорбенты выявили сходную избирательность связывания вирусных белков, а максимальной емкостью связывания для гексона вируса снижения яйценоскости (ССЯ-76) обладал Бутил-МПС. Фракционирование на Бутил-МПС неочищенной алантоиновой жидкости зараженных утиных эмбрионов приводит к 4-кратному концентрированию гексона ССЯ-76 при одновременной 20-кратной очистке. Такая же эффективность очистки при 10-кратном концентрировании достигнута при фракционировании неочищенной культуральной жидкости, содержащей гексон аденовируса человека серотипа 5 (Ad5).

Методы гидрофобной хроматографии белков, разработанные в 70-е годы в работах Шальтье [1], Хофсти [2] и Пората [3], в настоящее время переживают период интенсивного развития. Это обусловлено широким распространением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и созданием новых гидрофобных сорбентов на основе химически модифицированных кремнезёмов [4, 5], а также полимерных жестких широкопористых гелей [6], устойчивых под высоким давлением.

В начале 80-х годов были исследованы возможности применения обращенно-фазовой хроматографии для выделения и очистки биологически активных белков и пептидов. Было установлено, что указанный метод весьма эффективен для разделения пептидов и небольших белков, в то время как белки с молекулярной массой более 50 кДа, как правило, могут быть элюированы с обращенно-фазовых сорбентов с низкими выходами [7]. Предположительно это объясняется слишком высокой гидрофобностью алкилсилильных «привитых фаз», вследствие чего в дальнейшем были разработаны твердокаркасные сорбенты с гидрофильными, в том числе полимерными, покрытиями, содержащими короткие алкильные радикалы [4, 5]. Параллельно были исследованы кремнезёмные сорбенты, химически модифицированные синтетическими полимерами, обладающими балансом гидрофильных и гидрофобных свойств (полиэтиленгликоль [8], поливиниловый спирт [9]). Сорбенты обеих указанных групп обладают тем преимуществом, что фракционирование белков, в том числе и весьма крупных, возможно с их использованием без при-

менения органических элюентов и характеризуется высоким выходом сорбатов и сохранением их нативности.

В настоящей работе получены гидрофобные твердокаркасные сорбенты, химически модифицированные N-замещенными полиакриламидами. Сополимеры N-замещенных акриламидов, химически адсорбированные на кремнеземе, весьма эффективно экранируют поверхность носителей, препятствуют необратимой адсорбции белков и могут быть использованы для иммобилизации биоспецифических лигандов. Эксклюзивные и аффинные сорбенты указанного класса успешно использованы для выделения и очистки некоторых практически важных биополимеров [10, 11]. В работе осуществлен синтез сорбентов, содержащих бутильные и бензильные группы, исследованы их физико-химические и хроматографические свойства.

Полученные сорбенты использованы для препаративной хроматографической очистки высокомолекулярных антигенов аденовирусов — гексонов. Эти белки являются основными иммуногенами и диагностическими антигенами указанной группы вирусов, и их очистка представляет важную самостоятельную задачу. Сложность очистки гексонов из культуральной жидкости состоит в низком их содержании в этом источнике, а также в относительно высокой ионной силе раствора, что исключает применение ионообменной хроматографии на первой стадии. Ранее мы применили для этих целей гидрофобную хроматографию на коротких колонках Phenyl Sepharose CL-4B [12], что позволило быстро концентрировать и одновременно существенно обогащать гексоны даже из таких относительно бедных источников, как культуральная жидкость.

В данной работе мы изучили возможность замены Phenyl Sepharose в такой хроматографической методике на более современные гидрофобные сорбенты, в том числе на синтезированные нами Бутил- и Бензил-МПС.

Синтез и структура сорбентов

В качестве исходного материала для приготовления гидрофобных сорбентов было выбрано макропористое стекло МПС-2000 ВГХ со средним диаметром пор 2000 Å и удельным объемом пор 2,1 см³·г⁻¹. Для проведения синтеза сорбентов в соответствии со способом [13] на поверхность стекла, содержащего аминопропильные группы (см. «Экспериментальную часть»), из раствора химически адсорбировали поли-*n*-нитрофенилакрилат и после удаления избытка полимера получали носитель, содержащий 180 мкмоль сложноэфирных групп на 1 г сорбента.

Для оценки конформационного состояния хемосорбированных макромолекул было изучено взаимодействие узкой молекулярно-массовой фракции полимера ($\bar{M}_n = 11\ 000$, $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1,1$) с аминопропилсилирированным стеклом. Количество *n*-нитрофенола, выделенного при хемосорбции, составляло 50 мкмоль на 1 г сорбента, в то время как содержание сложноэфирных групп равнялось 190 мкмоль·г⁻¹ сорбента. Следовательно, лишь 20% мономерных звеньев макромолекулы непосредственно связаны с носителем, а остальные расположены на петлях и «хвостах» химически фиксированного клубка. Расчет показывает, что в этом случае каждая макромолекула хемосорбированного слоя связана с поверхностью в среднем 10—12 амидными связями.

Для получения Бутил-МПС и Бензил-МПС носитель, содержащий сложноэфирные группы, обрабатывали соответственно растворами бутил- или бензиламина в диметилформамиде, контролируя полноту амидирования по выделению в раствор *n*-нитрофенола. Содержание бутил- и бензилакриламидных звеньев в составе сорбентов составило 160 и 150 мкмоль на 1 г сорбента соответственно. После блокирования остаточных сложноэфирных групп 2% раствором аммиака в диметилформамиде в ИК-спектрах сорбентов наблюдаются полосы поглощения при 1630 и 1550 см⁻¹, характерные для замещенных амидов, и отсутствуют полосы поглощения сложноэфирных групп при 1740 см⁻¹, что свидетельствует об исчерпывающем характере амидирования. Таким образом, полимер-

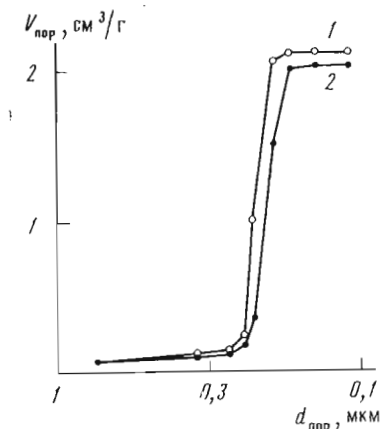


Рис. 1. Интегральные кривые ртутной порометрии сорбентов [14]: 1 — исходное пористое стекло МПС-2000 ВГХ, 2 — Бутил-МПС

ные покрытия обоих сорбентов состоят из N-замещенных полиакриламидов, ковалентно и многоточечно связанных с поверхностью, причем 85—90% акриламидных звеньев содержат гидрофобные радикалы.

Проведение химической модификации пористого кремнезема полимерными реагентами в принципе может сопровождаться искажением первоначальной пористой структуры материала из-за уменьшения диаметра пор вследствие образования адсорбционного слоя, а также из-за образования пробок в сужениях пористой структуры. Для изучения внутреннего строения частиц был использован метод ртутной порометрии [14]. Диаметр пор Бутил-МПС примерно на 100 Å меньше диаметра пор кремнезема (рис. 1). В то же время удельный объем пор носителя уменьшается на $0,1 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$ (5%). Указанное снижение объема пор количественно соответствует уменьшению их диаметра вследствие хемосорбции полимера, на основании чего можно сделать вывод о том, что закупорки пор не происходит. В целом сорбент сохраняет пористую структуру исходного кремнезема, что весьма существенно для реализации его хроматографических свойств.

Свойства сорбентов

Одними из наиболее эффективных современных сорбентов для препаративной гидрофобной хроматографии белков являются полужесткие гели Butyl Toyopearl 650C и Phenyl Toyopearl 650S (TOSOH, Япония). Указанные сорбенты обладают высокой по сравнению с агарозными аналогами механической стабильностью (несжимаемы при давлении до 10 атм) и в то же время имеют значительный диаметр пор (предел исключения для глобулярных белков 10^7 Да), а также обеспечивают высокие выходы водорастворимых белков в условиях элюции. При хроматографии на Butyl Toyopearl адсорбция белков осуществляется, как правило, из раствора с высокой ионной силой (до 3 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), а элюция — путем понижения ионной силы в элюенте ступенчато или в виде непрерывного градиента. В настоящей работе нами проведено сравнение сорбентов Бутил-МПС и Butyl Toyopearl, имеющих сходную химическую функциональность и близкий размер частиц, но различающихся по структуре и физико-химическим свойствам пористого каркаса.

При нанесении на колонку с Бутил-МПС (1×15 см) 1 мл 0,5% раствора овальбумина в 0,05 М бикарбонатном буфере (pH 8,5), содержащем 20% (1,5 М) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и раствора γ -глобулина в том же буфере, содержащем 10% (0,75 М) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наблюдается полная сорбция обоих белков. При смене элюента на 0,05 М бикарбонатный буфер, не содержащий сульфата аммония, оба белка десорбируются с высокими выходами. Аналогичные адсорбционные эксперименты, проведенные с использованием Butyl Toyopearl, дали сравнимые результаты (см. табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о том, что N-бутилполиакриламидное покрытие сорбента, во-первых, достаточно экранирует поверхность кремнезема и, во-вторых, обеспечивает обратимую адсорбцию белков в условиях тра-

Связывание и десорбция белков на гидрофобных сорбентах *

Условия десорбции	Сорбат	Бутил-МПС		Butyl Toyorearl	
		Сорбция, %	Общий выход белка, % **	Сорбция, %	Общий выход белка, % **
А	γ-Глобулин	95	95	95	90
	Овальбумин	40	100	0	100
Б	»	100	100	100	100

* Условия сорбции: 0,05 М бикарбонатный буфер, pH 8,5, с 10 (А) или 20% (Б) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; элюция тем же буфером без $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

** В расчете на наносимый белок.

диционной гидрофобной хроматографии. Следует отметить, что Бутил-МПС обладает, по-видимому, несколько более гидрофобными свойствами по сравнению с Butyl Toyorearl, поскольку частично сорбирует овальбумин из 10% раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (см. табл. 1), в то время как на Butyl Toyorearl адсорбция в указанных условиях не наблюдается.

Для десорбции белков, связанных в тех же условиях на Бензил-МПС, недостаточно понижения концентрации соли в элюенте. Количественная десорбция белков возможна в этом случае с применением в качестве элюента 20%-ного изопропанола. Однако, как будет показано ниже, при адсорбции белков на Бензил-МПС из растворов с низкой ионной силой элюция может быть достигнута без применения органического модификатора.

Наиболее полное сопоставление свойств сорбентов получено при изучении изотерм адсорбции модельных сорбатов (рис. 2, 3), а также кинетики этого процесса (рис. 4, 5). Линеаризация изотерм адсорбции γ-глобулина на Бутил-МПС и Butyl Toyorearl в координатах Скэтчарда дает возможность рассчитать константы диссоциации комплексов γ-глобулин — сорбент и предельные емкости сорбентов. Константы диссоциации равны $1,9 \cdot 10^{-9}$ и $2,8 \cdot 10^{-9}$ М для Бутил-МПС и Butyl Toyorearl соответственно, что подтверждает несколько большую гидрофобность Бутил-МПС. Предельная емкость Butyl Toyorearl по γ-глобулину ($27 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) в 1,6 раза выше, чем предельная емкость Бутил-МПС ($17 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Вероятнее всего, это связано с тем, что частицы Butyl Toyorearl обладают более развитой поверхностью и, не исключено, меньшим, чем у Бутил-МПС, диаметром пор. Если это предположение верно, то наряду с повышенной адсорбционной емкостью по белку Butyl Toyorearl должен характеризоваться более низкими в сравнении с Бутил-МПС коэффициентами внутренней диффузии макромолекулярных сорбатов. Непосредственное измерение диаметра пор широкопористых сорбентов методом ртутной порометрии, к сожалению, невозможно из-за их сжимаемости.

Кинетика адсорбции γ-глобулина на Бутил-МПС и Butyl Toyorearl 650 С (рис. 4, 5) описывается в координатах $\ln(1 - F) \div t$ (рис. 5) (F — степень завершенности процесса адсорбции; см. «Экспериментальную часть») прямолинейной зависимостью, что свидетельствует о достижении в эксперименте регулярного режима адсорбции. Отсюда степень завершенности процесса может быть выражена в виде: $F = 1 - B_1 e^{-B_2 t^{B_3}}$ [15].

При линеаризации кинетической кривой в указанных координатах (рис. 5) отрезок, отсекаемый на оси ординат, численно равен $\ln B_1$. Из рис. 5 следует, что $\ln B_1 = -0,4$ для обоих сорбентов и тогда $B_1 = 0,67$. Поскольку эксперимент проводился при концентрациях белка, соответствующих начальному участку изотермы адсорбции (см. «Экспериментальную часть»), можно принять, что относительный диаметр непоглощающего ядра сорбента $\phi \geq 0,5$. Тогда, согласно работе [16], при указанном значении B_1 диффузионный критерий $Bi \geq 20$ и, следовательно, режим сорбции белка является полностью внутридиффузионным для обоих сорбентов.

В этом случае для расчета коэффициентов внутренней диффузии достаточно знать среднее время сорбции, численно равное площади над ки-

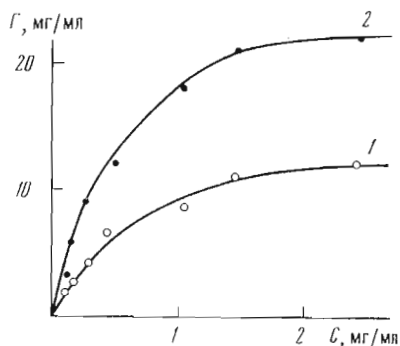


Рис. 2

Рис. 2. Изотермы адсорбции γ -глобулина на Бутил-МПС (1) и Butyl Toyorearl 650C (2). По оси абсцисс — равновесная концентрация белка в растворе, по оси ординат — удельная адсорбция белка (Γ , мг/мл сорбента)

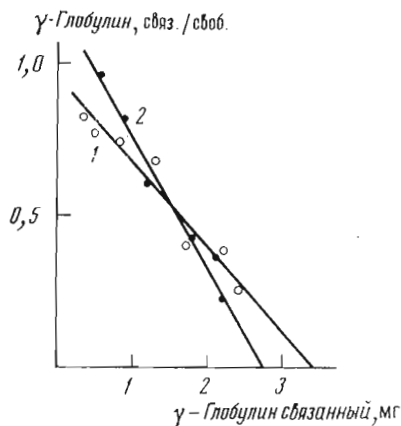


Рис. 3

Рис. 3. Линеаризация изотерм адсорбции γ -глобулина (см. рис. 2) в координатах Скэтчарда на Бутил-МПС (1) и Butyl Toyorearl 650C (2)

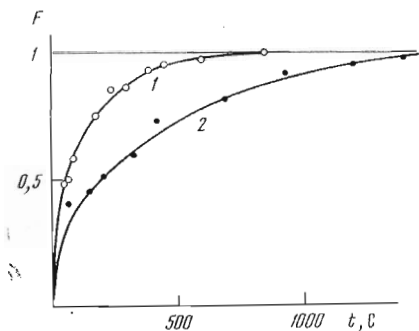


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика адсорбции γ -глобулина на Бутил-МПС (1) и Butyl Toyorearl 650C (2). F — степень завершенности процесса (см. «Экспер. часть»)

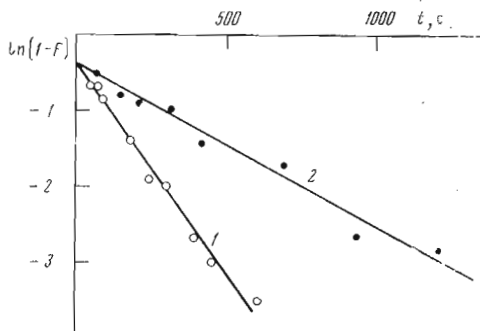


Рис. 5

Рис. 5. Линеаризация кинетических кривых адсорбции γ -глобулина на Бутил-МПС (1) и Butyl Toyorearl 650C (2) (см. рис. 4)

нетическими кривыми (рис. 4). Среднее время сорбции γ -глобулина в условиях эксперимента составило для Butyl Toyorearl 370 с, а для Бутил-МПС — 130 с. Поскольку сорбенты имеют близкое распределение частиц по размерам, разница в средних временах сорбции может быть в основном отнесена к проницаемости сорбентов, которая, таким образом, почти в 3 раза выше для Бутил-МПС.

Так как частицы Butyl Toyorearl имеют сферическую форму, по формуле $D = R^2/15 (\omega + 1) \bar{t}_1$ [17] (R — радиус частицы, ω — параметр, характеризующий свойства раствора, \bar{t}_1 — среднее время сорбции) можно рассчитать значение коэффициента внутренней диффузии (D) γ -глобулина, равное в настоящем случае $4 \cdot 10^{-9}$ см²/с. Для частиц Бутил-МПС, имеющих неправильную форму, расчет коэффициента внутренней диффузии по указанной формуле невозможен. По-видимому, величина D будет находиться в интервале значений $8 \cdot 10^{-9} - 1,5 \cdot 10^{-8}$ см²/с.

Проницаемость сорбентов для макромолекул белков — важное свойство, определяющее скорость фронтального хроматографического процесса при высокоселективной экстракции одного или нескольких компонентов смеси. Если целевой компонент присутствует в растворе в малой концентрации, для насыщения сорбента может понадобиться пропускание через колонку объемов раствора, в десятки и сотни раз превосходя-

щих ее собственный объем. В этом случае параметром, определяющим производительность процесса в целом, будет именно проницаемость сорбентов в сочетании с устойчивостью к высоким скоростям потока элюента. К указанному типу хроматографии относится начальный этап методики очистки гексонового антигена аденовирусов: гидрофобная хроматография [12].

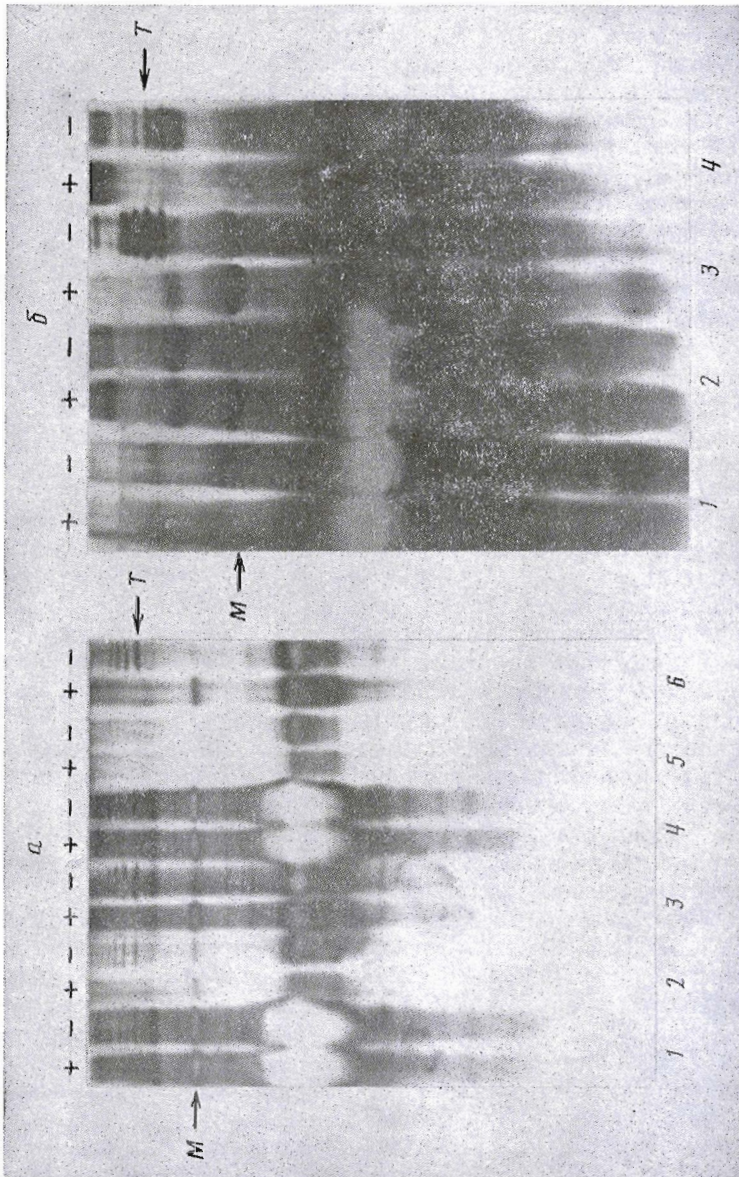
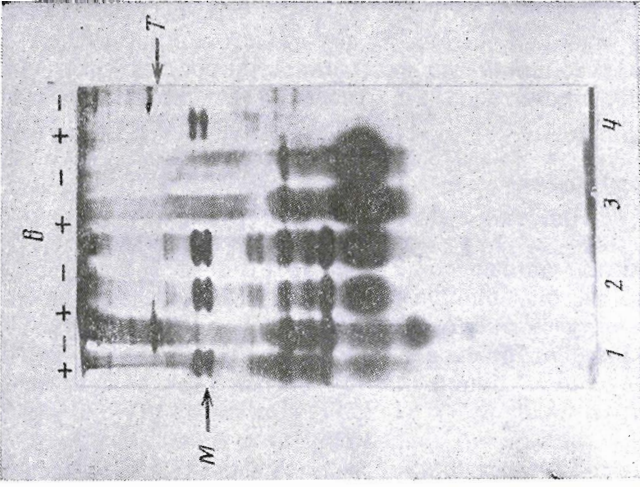
Очистка гексонов аденовирусов

Гексон — главный диагностический антиген аденовирусов [18] — представляет собой высокомолекулярный белок (молекулярная масса для разных серотипов вирусов около $3 \cdot 10^5$ Да). Гексоны аденовирусов человека и млекопитающих содержатся в среде культивирования зараженных вирусами клеток в концентрации 0,1—10 мкг/мл (при общем содержании белков 1—5 мг/мл). В более высоких концентрациях (30—300 мкг/мл) гексоны содержатся в экстрактах зараженных клеток, откуда их обычно и выделяют, отбрасывая указанную выше среду культивирования [19]. Аденовирусы птиц обычно выращивают в зараженных эмбрионах и выделяют из алантоисной жидкости, где их содержание составляет 20—300 мкг/мл при содержании суммарного белка 4—10 мг/мл. Традиционные методы очистки гексонов аденовирусов предусматривают применение анионообменной хроматографии в качестве ключевого этапа процедуры [19]. Однако для выполнения начального условия такой хроматографии — низкой ионной силы наносимого раствора — необходимы этапы концентрирования и обессоливания исходных препаратов, что повышает длительность методики и снижает выход целевых продуктов. Это также делает не реальным использование культуральной среды в качестве источника для очистки гексона, и в традиционных методиках такую среду отбрасывают, хотя содержание в ней разбавленного гексона составляет 20—50% от его суммарного количества.

Для упрощения методики очистки и повышения выхода целевого продукта (в частности, с использованием культуральной жидкости) мы применили гидрофобную хроматографию на Phenyl Sepharose [12], что позволило быстро концентрировать гексоны аденовирусов млекопитающих из больших объемов культуральной жидкости (20—50 объемов колонки) при одновременном существенном обогащении гексонов и освобождении от примесных белков. Поскольку элюция гексонов при такой хроматографии достигается разбавленными слабощелочными буферными растворами, элюаты без дополнительной обработки пригодны для анионообменной хроматографии [12].

В данной работе мы расширили рамки применения того же подхода за счет его распространения на очистку гексонов аденовирусов птиц, выделяемых из алантоисной жидкости зараженных эмбрионов, и за счет использования более удобных жестких гидрофобных сорбентов, в том числе описанных выше Бутил- и Бензил-МПС.

Сравнение сорбционных свойств различных видов носителей при гидрофобной хроматографии гексона аденовируса человека серотипа 5 (Ad5) упрощенным «бэтч-методом» (см. «Экспериментальную часть») приведено на рис. 6а. Для идентификации гексонового антигена Ad5 в присутствии избытка примесных белков использовали так называемый плюс-минус-вариант электрофореза [21], при котором в «плюс-треках» гексон Ad5 выделяется в виде зоны мономерного полипептида с кажущейся молекулярной массой 120 кДа, а в «минус-треках» — в виде серии зон нативного тримера с меньшей подвижностью. Результаты электрофоретического анализа сорбированных и несорбированных белковых фракций для двух сорбентов — Бутил-МПС и Butyl Toyopearl (рис. 6а) демонстрируют сходство картин разделения на обоих сорбентах — большинство примесных белков не сорбируются в выбранных условиях, а гексон Ad5 специфически сорбируется и элюируется с существенным обогащением слабощелочным буфером. Аналогичные результаты разделения получены и для других гидрофобных сорбентов: Бензил-МПС, Phenyl Toyopearl, Phenyl Se-



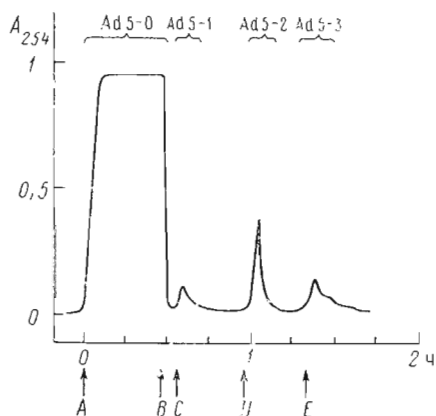


Рис. 7

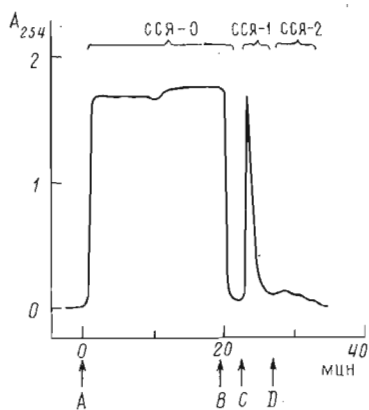


Рис. 8

Рис. 7. Очистка гексона Ad5 из культуральной жидкости на колонке (5 × 1,6 см) с Бутил-МПС. Стрелками обозначено нанесение на колонку: А — культуральной жидкости, рН 5,5; В — 10 мМ ацетата калия, рН 5,5; С — 10 мМ ацетата калия, рН 6,8; D — 10 мМ КНСО₃, рН 8,0; E — 10 мМ К₂СО₃, рН 9,6, с 5% изопропанола. Скорость нанесения образца 650 мл/ч. Скорость промывки и элюции 100 мл/ч. Вверху указаны собранные фракции

Рис. 8. Очистка гексона ССЯ-76 из алантоиной жидкости. Сорбент и колонка те же, что и на рис. 7. Стрелками обозначено нанесение на колонку: А — алантоиной жидкости куриных эмбрионов, разбавленной в 5 раз 50 мМ калий-ацетатным буфером, рН 4; В — 10 мМ ацетата калия, рН 5,5; С — 10 мМ КНСО₃, рН 8,0, с 10% изопропанола; D — 10 мМ К₂СО₃, рН 9,6, с 10% изопропанола. Скорость нанесения образца 300 мл/ч. Скорость промывки и элюции 100 мл/ч. Вверху указаны собранные фракции

pharose, Octyl Sepharose (данные не приводятся), что свидетельствует о сходной избирательности всех этих сорбентов в условиях выбранной схемы гидрофобной хроматографии (рН-зависимая элюция).

Препаративное концентрирование и очистка гексона Ad5 из культуральной жидкости путем колоночной хроматографии на Бутил-МПС (рис. 7) показали, что основная масса белков (345 из нанесенных 405 мг), не содержащая гексона по данным электрофоретического анализа (рис. 6б), элюировалась с Бутил-МПС без задержки с исходным буфером (рН 5,5), часть примесных белков — с буфером промывки (рН 6,8). Основная часть гексона с малой долей примесных белков (суммарное содержание белков 15 мг) десорбировалась при рН 8, некоторое количество относительно более чистого гексона — при рН 9,6. Белковый состав полученных фракций (см. рис. 6б) наглядно иллюстрирует высокую степень обогащения гексона в процессе гидрофобной хроматографии. В этом опыте достигнуто примерно 20-кратное обогащение гексона при практически полном выходе и одновременном концентрировании в 10 раз (табл. 2). К недостаткам данного разделения можно отнести дробную элюцию гексона в двух различных фракциях (рН 8 и 9,6), однако модификация схемы элюции (включение 10% изопропанола) позволяет устранить это не-

Рис. 6. Электрофоретический анализ фракций хроматографической очистки гексонов Ad5 (а, б) и ССЯ-76 (в). Обработка образцов: в «плюс-треках» — кипячение в диссоциирующем буфере Лэммли [20], в «минус-треках» — инкубация при 20° С в том же буфере [21]. Стрелки указывают на положение электрофоретических зон мономеров (М) и тримеров (Т) гексона. а — аналитическая очистка гексона Ad5 «бэтч-методом» на Butyl Toyopearl 650С (1—3) и Бутил-МПС (4—6); 1, 4 — не сорбированные при рН 5,5 фракции; 2, 5 — фракции в 10 мМ ацетате калия, рН 7,0; 3, 6 — элюаты в 5 мМ КНСО₃ с 5% изопропанола (см. «Экспер. часть»). б — хроматография гексона Ad5 на Бутил-МПС (см. «Экспер. часть»); 1 — несорбированная фракция; 2 — фракция культуральной жидкости до хроматографии; 3 — элюат 10 мМ КНСО₃, рН 8,0; 4 — элюат 10 мМ К₂СО₃, рН 9,6, с 5% изопропанола. в — хроматография гексона ССЯ-76 на Бутил-МПС (см. «Экспер. часть»); 1 — фракция алантоиной жидкости до хроматографии; 2 — та же фракция после подкисления до рН 4; 3 — элюат 10 мМ ацетатом калия, рН 5,5; 4 — элюат 10 мМ КНСО₃, рН 8,0 с 10% изопропанола

Очистка гексонов аденовирусов на колонке (1,6×5 см) с Бутил-МПС (рис. 7, 8)

Шифр фракции	Элюент	Скорость элюции, мл/ч	Объем, мл	Количество белка, А ₂₈₀	Содержание гексона
Ad5 — исходная культуральная жидкость	—	—	300	405	+
Ad5-0	В: 50 мМ ацетат калия, рН 5,5	650	320	345	—
Ad5-1	С: 10 мМ ацетат калия, рН 6,8	100	55	5,5	—
Ad5-2	Д: 10 мМ КНСО ₃ , рН 8,0	100	25	15	++
Ad5-3	Е: 10 мМ К ₂ СО ₃ , рН 9,6 с 5% изопропанола	100	30	4,5	+
ССЯ-76 — исходная алантоисная жидкость	—	—	130	370	+
ССЯ-0	В: 10 мМ ацетат калия, рН 5,5	300	140	325	—
ССЯ-1	С: 10 мМ КНСО ₃ , рН 8,0, с 10% изопропанола	100	15	30	++
ССЯ-2	Д: 10 мМ К ₂ СО ₃ , рН 9,6, с 10% изопропанола	100	28	2,2	—

удобство, как показано ниже для очистки гексона ССЯ-76 на том же сорбенте.

Для очистки гексона аденовируса птиц ССЯ-76 были модифицированы условия селективности гидрофобной хроматографии, поскольку оказалось, что в условиях сорбции гексонов аденовирусов млекопитающих на Phenyl Sepharose (рН 6—6,5) гексон ССЯ-76 не задерживается на этом сорбенте. Путем подбора условий сорбции, проведенного «бэтч-методом» (см. «Экспериментальную часть»), было найдено, что гексон ССЯ-76 может быть избирательно сорбирован из более кислых растворов (рН 4—5), причем все указанные выше гидрофобные сорбенты выявляют близкую избирательность в отношении гексона ССЯ-76. С помощью количественного титрования антигенной активности гексона ССЯ-76 в элюатах при такой очистке мы сравнили эффективную емкость сорбентов в условиях избытка белков. Оказалось, что максимальной емкостью обладал Бутил-МПС, а емкость Butyl Toyopearl и Бензил-МПС была в 1,5—2 раза ниже.

Для препаративной очистки гексона ССЯ-76 на Бутил-МПС использована вышеописанная схема хроматографии со следующими изменениями: исходную алантоисную жидкость разбавляли в 5 раз 50 мМ ацетатом калия, рН 4, несвязанные белки элюировали буфером с рН 5,5, а для элюции гексона использовали буфер (рН 8), содержащий 10% изопропанола (рис. 6а, рис. 8, табл. 2). Гексон ССЯ-76 полностью сорбировался на Бутил-МПС и полностью элюировался во фракции ССЯ-1. Эффективность очистки гексонового антигена составила, по данным титрования в иммуноферментном анализе, около 20 раз. Аналогичные данные получены в ряде повторных хроматографий по той же схеме, где за счет снижения скорости хроматографии на этапе элюции удалось достичь 4-кратного концентрирования гексона ССЯ-76 при сохранении 20-кратного обогащения.

Отметим, что использование сорбентов Бутил-МПС и Бензил-МПС характеризуется высокой воспроизводимостью параметров очистки гексонов Ad5 и ССЯ-76. После 10-кратного повторения сорбции и десорбции белков на одной и той же порции сорбента в условиях «бэтч-метода» не наблюдалось ни изменения емкости сорбентов, ни снижения селективности сорбции целевых гексонов. Изучение стабильности сорбентов показало, что инкубация с растворами, имеющими рН 2 и 10, в течение недели при 20° С не изменяет их адсорбционные свойства по отношению к модельным белкам — овальбумину и γ -глобулину. Указанный интервал рН-стабильности позволяет проводить регенерацию сорбентов слабощелочными буферными растворами с добавками органических растворителей.

Таким образом, применение гидрофобной хроматографии на Бутил-МПС позволяет быстро (в пределах 1—2 ч) концентрировать и существенно обогащать гексоны аденовирусов птиц и млекопитающих из различных источников. Методика может быть легко масштабирована за счет применения колонок большего диаметра, что делает ее перспективной в отношении первой стадии очистки диагностических антигенов человека и животных в производстве компонентов диагностикумов.

На основании вышеизложенного можно заключить, что разработанные нами полимерно-модифицированные сорбенты обеспечивают высокую разделяющую способность в различных условиях проведения гидрофобной хроматографии биополимеров, позволяют получать целевые продукты с высоким сохранением их биологической активности и вследствие высокой стабильности и проницаемости могут служить базовым материалом при создании крупномасштабных хроматографических процессов.

Экспериментальная часть

В работе использовали макропористое стекло МПС-2000 ВГХ зернистостью 80—160 мкм, Butyl Toyopearl 650С, Phenyl Toyopearl 650S (TOSOH, Япония), Phenyl Sepharose и Octyl Sepharose CL-4В (Pharmacia, Швеция). γ -Аминопропилтриэтоксисилан (марки АГМ-9) перегоняли в вакууме (110° С, 1 мм рт. ст.). *n*-Нитрофенилакрилат получали по методике [22], т. пл. 54° С. *n*-Бутиламин (VEB Laborchemie Apolda, ГДР) и бензиламин (Merck, ФРГ) дополнительной очистки не подвергали. Бензол (х. ч.) перегоняли (т. кип. 80° С). В качестве белковых стандартов использовали γ -глобулин и овальбумин (Serva, ФРГ).

Концентрацию аминокрупп в модифицированном стекле определяли с *o*-фталевым диальдегидом, как описано в работе [10].

Концентрацию *n*-нитрофенилакрилатных групп в носителях устанавливали путем обработки носителей 5% раствором аммиака в диметилформамиде (25° С, 48 ч), определяя количество выделившегося *n*-нитрофенола в супернатанте.

Концентрацию *n*-нитрофенола в растворах определяли спектрофотометрически ($\lambda = 325$ нм, $\epsilon = 11\ 000$ М⁻¹·см⁻¹ в диметилформамиде или $\lambda = 405$ нм, $\epsilon = 15\ 300$ М⁻¹·см⁻¹ в водных растворах с рН > 7).

Концентрацию белка в растворе устанавливали с помощью окрашивания кумасси ярко-голубым G-250 [23].

Носители с NH₂-группами получали путем обработки макропористого стекла (30 г) 2% раствором γ -аминопропилтриэтоксисилана в 200 мл сухого толуола при 80—90° С в течение 16 ч. Затем стекло промывали 3-кратными объемами ацетона, воды, ацетона, эфира и сушили 2 ч на воздухе и 2 ч в вакууме при 100° С. Полученный носитель содержал 150 мкмоль аминокрупп на 1 г сорбента.

Поли-*n*-нитрофенилакрилат получали путем проведения радикальной полимеризации *n*-нитрофенилакрилата в бензоле при концентрации мономера 1 М в токе аргона при 70° С (инициатор — азобисизобутиронитрил) в течение 20 ч. Полимер переосаждали из ацетона в метанол, промывали метанолом и сушили на листах фильтровальной бумаги. Выделение узкой молекулярно-массовой фракции полимера проводили дробным осаждением полимера с использованием той же пары растворитель — осадитель.

Молекулярные массы (\bar{M}_w и \bar{M}_n) определяли гель-хроматографией на колонке с гелем LH-60 (Pharmacia, Швеция) в диметилформамиде. Калибровку колонки предварительно проводили по этиленгликолевым стандартам (Loba Chemie, Австрия).

Синтез Бутил-МПС и Бензил-МПС осуществляли по модифицированному способу [13], используя в качестве полимерного модификатора поли-*n*-нитрофенилакрилат ($\bar{M}_n = 12\ 000$, $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 2$).

Объем и диаметр пор сорбентов определяли методом ртутной порометрии на порометре Poresizer 9300 (Micrometrics, США).

Изотермы адсорбции γ -глобулина на сорбентах изучали путем инкубации 4 мл раствора белка с начальными концентрациями 0,2—3,0 мг/мл в 0,05 М бикарбонатном буфере, pH 8,5, содержащем 10% сульфата аммония, со 100 мкл геля Butyl Toyopearl 650C и 200 мкл Бутил-МПС. После установления равновесия (1 ч) при перемешивании в термостатированном шейкере (25° С) концентрацию белка в супернатанте измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 280$ нм, $\epsilon = 1,4$ см⁻¹·мл·мг⁻¹).

Кинетику адсорбции γ -глобулина изучали, используя начальную концентрацию белка 0,5 мг/мл и фиксируя изменение оптической плотности супернатанта. Степень завершенности процесса (F) рассчитывали как отношение $(A_0 - A_t)/(A_0 - A_e)$, где A_0 — поглощение ($\lambda = 280$ нм) раствора до внесения сорбента, A_e — поглощение супернатанта в равновесии, A_t — поглощение в текущий момент времени с сорбентом.

Хемосорбцию узкофракционированного поли-*n*-нитрофенилакрилата изучали путем инкубации 0,2 г носителя с 5 мл 1% раствора полимера при 25° С в течение 3 ч с периодическим определением концентрации *n*-нитрофенола в супернатанте.

Аналитическую сорбцию гексонов аденовирусов на гидрофобных сорбентах проводили «бэтч-методом» в микропробирках типа Eppendorf. Влажные гидрофобные сорбенты, уравновешенные 10 мМ ацетатом калия (pH 4,0—5,5), в количестве 10 мкл упакованного объема, смешивали с 0,5 мл, белкового раствора, содержащего гексон аденовируса и забуференного избытком (50 мМ) ацетата калия с тем же значением pH. Суспензию выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Сорбент отделяли от несвязанной фракции центрифугированием, промывали 1 мл 10 мМ ацетата калия (pH 7,0) и элюировали связанные белки 0,5 мл 5 мМ бикарбоната калия, содержащего 5% изопропанола. Элюат отделяли центрифугированием.

Препаративную очистку гексона Ad5 из культуральной жидкости проводили при хроматографии на колонке (1,6 × 5 см) с Бутил-МПС. На колонку, уравновешенную 50 мМ ацетатом калия, pH 5,5 (буфер В), наносили (650 мл/ч) 300 мл культуральной жидкости, подкисленной до pH 5,5 буфером В. Колонку промывали последовательно 320 мл буфера В, 55 мл 10 мМ ацетата калия, pH 6,8 (буфер С), 25 мл 10 мМ КНСО₃, pH 8,0 (буфер D) и 30 мл 10 мМ К₂СО₃, pH 9,6, содержащим 5% изопропанол (буфер E). Скорость промывки 100 мл/ч.

Очистку гексона ССЯ-76 из алантоисной жидкости осуществляли в подобных условиях, используя в качестве уравновешивающего буфера 10 мМ ацетат калия, pH 4,0. На колонку наносили 130 мл алантоисной жидкости, разбавленной в 5 раз 50 мМ ацетатом калия, pH 4,0. Колонку промывали 140 мл 10 мМ ацетата калия, pH 5,5, со скоростью 300 мл/ч и затем 15 мл 10 мМ КНСО₃, pH 8,0, с 10% изопропанола и 28 мл 10 мМ К₂СО₃, pH 9,6, с 10% изопропанола. Скорость элюции 100 мл/ч.

Электрофоретический анализ белков аденовирусов осуществляли в блоках 10% полиакриламидного геля по Лэммли [20] или в нашей модификации [21] с окрашиванием белковых зон коллоидным серебром. Непрямой иммуноферментный анализ гексона аденовирусов с куриными антителами проводили на полистироловых микропанелях [24].

Авторы выражают благодарность С. Д. Осидзе, Н. В. Фоминой (Все-союзный институт экспериментальной ветеринарии ВАСХНИЛ) и Т. И. Пономаревой (ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ) за предоставление вирусных материалов, а также сотрудникам фирмы

TOSOH (Япония) за безвозмездное предоставление образцов гидрофобных сорбентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shaltiel S.* // *Meth. Enzymol.* 1974. V. 34. P. 126—140.
2. *Hofstee B. H. J.* // *Anal. Biochem.* 1973. V. 52. P. 430—448.
3. *Porath J., Sundbyrg L., Fornstedt N., Ollson I.* // *Nature.* 1973. V. 245. P. 465.
4. *Fausnaugh J. L., Kennedy L. A., Regnier F. E.* // *J. Chromatogr.* 1984. V. 317. № 1. P. 141—155.
5. *Alpert A. J.* // *J. Chromatogr.* 1986. V. 359. № 1. P. 85—97.
6. *Kato Y., Kitomura T., Hashimoto T.* // *J. Chromatogr.* 1984. V. 292. P. 418—426.
7. *O'Hake M. J., Capp M. W., Nice E. C., Cooke N. H. C., Archer B. G.* // *Anal. Biochem.* 1982. V. 126. P. 17—28.
8. *Miller M. T., Karger B. L.* // *J. Chromatogr.* 1985. V. 366. P. 45—61.
9. *Rassi Z. E., Horvath C.* // *J. Liq. Chromatogr.* 1986. № 9. P. 3245—3268.
10. *Козлов Л. В., Сизой М. Н., Зинченко А. А., Иванова А. Е., Зубов В. П.* // *Биоорганич. химия.* 1984. Т. 10. № 12. С. 1629—1639.
11. *Иванов А. Е., Жигис Л. С., Турчинский М. Ф., Копьев В. П., Решетов П. Д., Зубов В. П., Кастрикина Л. Н., Лонская Н. И.* // *Молекулярн. генетика, микробиология, вирусология.* 1987. № 11. С. 39—46.
12. *Хилько С. Н., Григорьев В. Г., Понамарева Т. И., Карпова О. В., Комаров Ю. С., Тихоненко Т. И.* Способ получения антигена аденовирусов: А. с. 1364342 СССР // *Б. И.* 1988. № 1.
13. *Иванов А. Е., Турчин С. И., Зубов В. П.* Способ получения сорбента для хроматографии. А. с. 1451295 СССР // *Б. И.* 1985. № 15.
14. *Грег С., Синг К.* Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984. С. 186—203.
15. *Самсонов Г. В., Меленевский А. Т.* Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии. Л.: Наука, 1986. С. 173.
16. *Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э.* Карбоксильные катиониты в биологии. Л.: Наука, 1979. С. 279—282.
17. *Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э.* Карбоксильные катиониты в биологии. Л.: Наука, 1979. С. 134.
18. *Ginsburg H. S.* // *Comprehensive Virology.* V. 13 / Ed. Fraenkel-Konrat Wagner. N. Y.: Plenum Press, 1979. P. 409—457.
19. *Boulangier P., Pawion F.* // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 39. № 1. P. 37—42.
20. *Laemmli U. K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680—685.
21. *Григорьев В. Г., Хилько С. Н., Тихоненко Т. И.* // *Биохимия.* 1985. Т. 50. № 2.
22. *Лебедев Н. И., Андрианова А. В.* // *Журн. общ. химии.* 1955. Т. 25. С. 258—263.
23. *Spector T.* // *Anal. Biochem.* 1987. V. 86. № 1. P. 142—146.
24. *Хилько С. Н., Кирасова М. А., Осидзе С. Д., Фомина Н. В., Бургасова М. П., Пукер Е. Г., Тихоненко Т. И.* // *Молекуляр. генетика, микробиология, вирусология.* 1989. № 9. С. 43—48.

Поступила в редакцию 24.X.1989

А. Е. IVANOV, Л. В. VERKHOVSKAYA*, С. Н. KHILKO*, В. Р. ZUBOV

RIGID, MACROPOROUS ADSORBENTS FOR HYDROPHOBIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow: *Research Institute for Agricultural Biotechnology, Moscow*

Two new rigid adsorbents for hydrophobic-interaction chromatography of proteins have been synthesized. Both are based on macroporous glass with average pore diameter of 2000 Å with their surface being derivatized by chemisorbed N-butylpolyacrylamide (Butyl-PG) or N-benzylpolyacrylamide (Benzyl-PG). Studies of adsorption isotherms and of desorption conditions for model proteins (ovalbumin and γ -globuline) revealed that Butyl-PG resembles semirigid synthetic adsorbent Butyl-Toyoppearl 650C (TOSOH, Japan) but has 0,6-fold capacity and 2,8-fold permeability of the latter for γ -globulin.

Several kinds of adsorbents for hydrophobic-interaction chromatography (Butyl-PG, Benzyl-PG, Butyl-Toyoppearl 650C, Phenyl-Toyoppearl 650S, Phenyl-Sepharose CL-4B and Octyl-Sepharose CL-4B) were compared in a model purification of high-molecular weight (M 3—4 10^5 Da) surface antigens of human and avian adenoviruses (hexon antigens).

All the adsorbents tested have revealed similar selectivities for the viral proteins, Butyl-PG having the maximal capacity for the hexon of egg-drop syndrom-76 virus (EDS-76). The chromatography of crude allantoic fluid from duck embryos infected with EDS-76 gave rise to 4-fold concentration of EDS-76 hexon with simultaneous 20-fold purification. The same degree of purification and 10-fold concentration were obtained during chromatography of crude cultural fluid containing hexon of human adenovirus serotype 5.