



УДК 547.953.04+547.96.05

СИНТЕЗ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ СОРБЕНТОВ
ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ*Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Кондратьева Н. Ю.,
Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова**Варламов В. П., Селенова Н. Н., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

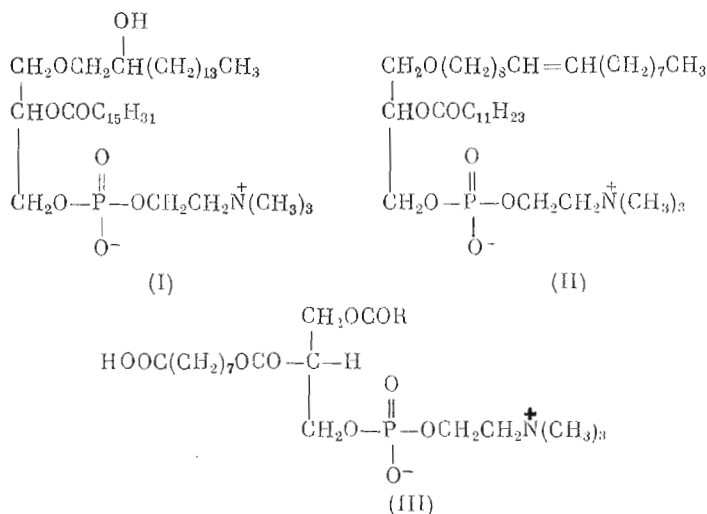
Описано получение биоспецифических сорбентов на органо-кремнеземной основе путем иммобилизации на них модифицированных фосфатидилхолинов с целью дальнейшего их использования для выделения белков, обладающих свойством к фосфолипидам.

В последнее время иммобилизованные биологически активные соединения, в частности ферменты, находят широкое применение в различных областях, например в производстве оптически активных аминокислот [1], при получении глюкозы [2] и др.

Внимание исследователей привлекают также биоспецифические сорбенты, несущие на себе низкомолекулярные иммобилизованные лиганды (аминокислоты, нуклеотиды, липиды). Сорбенты с иммобилизованными липидами могут быть использованы для мягкой адсорбционной иммобилизации ферментов [3], моделирования химических свойств биомембран, а также для аффинной хроматографии некоторых белков, обладающих свойством к липидам [4-6]. В подобных работах большие трудности состоят не только в получении необходимого лиганда, но и в ковалентном присоединении его к носителю. Такие работы проводились только на органических матрицах, причем количество иммобилизованного лиганда не оценивалось, и поэтому трудно судить об эффективности посадки. Лигандами служили моно- [7] и диолеилглицерин [8], *rac*-1-О-(8-карбоксогексил)-2-гексадецилглицеро-3-фосфохолин и 1,2-дигексадецил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин [4]. Присоединение осуществлялось по функциональной группе молекулы липида. Выделение фосфолипазы А₂ из змеиного яда на модифицированной сефарозе с ковалентно присоединенным по NH₂-группе фосфатидилэтаноломином не дало положительных результатов [4]. Для этих целей, по-видимому, более целесообразно применение в качестве лигандов фосфолипидов с функциональными группами в гидрофобной части молекулы (COOH, OH, NH₂).

В данном сообщении нами описан синтез биоспецифических сорбентов с использованием в качестве лигандов ранее синтезированных *rac*-1-О-(2-оксигексадецил)-2-пальмитонилглицеро-3-фосфохолина (I), *rac*-1-О-(9-

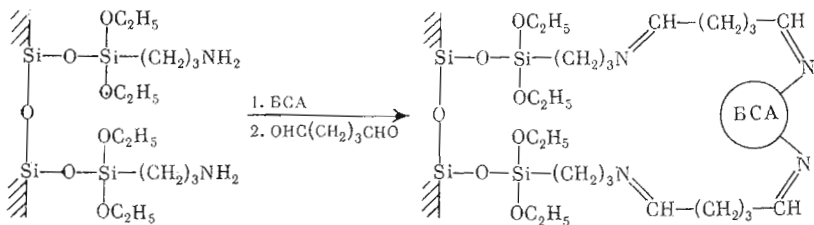
октадецил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолина (II) [9] и 1-О-ацил-2-(8-карбоксооктаноил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (III), полученного окислением яичного фосфатидилхолина [10].



Использование алкильных аналогов фосфолипидов (I) и (II) обусловлено стремлением повысить эффективность выделения таких белков, как липидпереносящий белок (ЛПБ) из гомогената бычьей печени, содержащего небольшое количество фосфолипазы, и фосфолипаза А₂ из змеиного яда, которая, как известно, обладает большей гидролитической активностью по отношению к фосфолипидам диацильного типа.

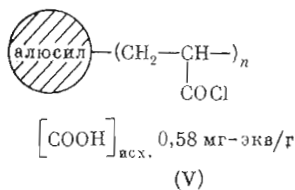
В качестве исходных носителей для получения биоспецифических сорбентов были выбраны органо-кремнеземные сорбенты на основе силохромов, так как возможность использования большинства типов сефарозы, обычно применяемых для аффинной хроматографии белков, для ковалентного связывания с липидами, одновременно содержащими функциональные группы как в гидрофобной, так и в полярной части молекулы (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и т. п.), вызывает сомнения. В этом случае необходимо применение различных защитных группировок с последующим снятием их на органической матрице, которая, как известно, может не выдержать подобных химических превращений. Ряд преимуществ, отмеченных для органо-кремнеземных сорбентов при иммобилизации на них ферментов и нуклеиновых кислот [11, 12], дает основание предположить, что эти носители могут быть использованы для таких целей.

Данная работа посвящена иммобилизации липидов на этих носителях. Широкому использованию таких сорбентов в биоспецифической хроматографии препятствовала недостаточная их стабильность в водных растворах, а также высокая неспецифическая сорбция белков. Для повышения устойчивости силохрома в водных средах проводилась обработка его солями алюминия [13], в результате растворимость его уменьшается в 10 и более раз. Для подавления неспецифической сорбции белков, основной причиной которой является развитая поверхность с множеством микротрещин и выступов, осуществлялось покрытие алюминированного силохрома (алюсила) органическими полимерами: полиакриловой кислотой, поли-β-оксиэтилметакрилатом. Введение аминогрупп на поверхность органо-кремнеземных сорбентов достигалось путем взаимодействия их с соответствующими аминами в присутствии конденсирующих агентов или при предварительном переводе этих сорбентов в форму хлорангидрида.

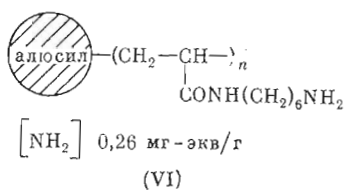


BSA-бычий сывороточный альбумин

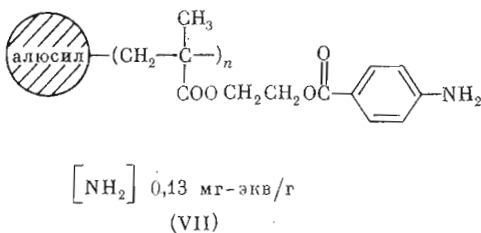
(IV)



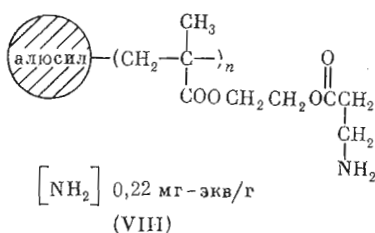
(V)



(VI)



(VII)



(VIII)

На сорбенте типа (IV) посадка фосфатидилхолина (II) осуществлялась за счет гидрофобного взаимодействия. Силохром предварительно обрабатывали γ -аминопропилтриэтоксисилоаном, что приводило к получению носителя с аминогруппами и дало возможность модифицировать его далее путем ковалентного присоединения бычьего сывороточного альбумина с помощью глутарового альдегида.

Альбумин образует прочный комплекс с фосфатидилхолином за счет гидрофобных взаимодействий [14], что должно обеспечить ориентацию определенной части липида полярной головкой наружу и способствовать более успешной сорбции белка (ЛПВ), имеющего связывающий центр, специфично взаимодействующий с полярной частью молекулы фосфолипида [15]. Кроме того, обработка аминоалкилсилохрома альбумином способствует уменьшению неспецифической сорбции белков за счет уменьшения свободной поверхности носителя (альбумин покрывает поверхность приблизительно на 18%).

На полученном сорбенте осуществлялась адсорбция фосфатидилхолина (II). Имобилизация фосфатидилхолина (I) была осуществлена на сорбенте типа (V). Фосфатидилхолин (III) был иммобилизован на сорбентах типа (VI)–(VIII) с использованием различных активирующих агентов: дициклогексилкарбодимида (ДЦК), циклогексилморфолинокарбодимида (ЦГМК), карбонилдиимидазола (КДИ).

При применении ДЦК связывание фосфатидилхолина (II) было небольшим; низкий выход в этом случае можно объяснить тем, что выпадающая в осадок дициклогексилмочевина забивает поры сорбента, что крайне затрудняет диффузию активированного лиганда к внутренней поверхности, содержащей большую часть функциональных групп. При использовании ЦГМК выходы реакций обычно сильно колеблются в зависимости от условий (рН, растворитель). Невысокий выход в данном случае, по-видимому, свидетельствует о том, что выбранные для проведения реакции условия не были оптимальными. Наилучшим способом иммобилизации фосфатидилхолина оказался метод с использованием КДИ в

диметилформамиде. Выходы в этой реакции достигали 10% и легко регулировались временем проведения реакции и соотношением реагентов.

Полученные сорбенты были опробованы при выделении ЛПБ из гомогената бычьей печени и фосфолипазы A_2 змеиного яда и показали положительные результаты*.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сорбента был использован силохром (ВНИИЛ, г. Ставрополь) с диаметром пор 1130 Å, $S_{уд}$ 34 м²/г. Обработку силохрома солями алюминия проводили по методу [13], нанесение полимера — по методу [16]. Концентрацию фосфолипида на сорбенте определяли по методу Аллена — Бартлета [17], используя спектрокалориметр «Srescol» с приставкой ЕКА 5 Aut. Минерализацию фосфора проводили 70% $HClO_4$, 20—30 мин при 200—300° С.

Сорбент типа (IV). К 10 г силохрома в 50 мл толуола добавляли 3,2 мл γ -аминопропилтриэтоксисилана. Реакционную массу перемешивали 10 ч при 140° С. Сорбент отфильтровывали, промывали 200 мл толуола, 100 мл ацетона, 200 мл воды и 100 мл ацетона, сушили в вакууме при 60—70° С. Далее к 2,0 г полученного аминоалкилсилохрома добавляли 20 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,2), содержащего 150 мг бычьего сывороточного альбумина, и перемешивали 4 ч при 18—20° С. К реакционной массе добавляли 5,0 мл 25% глутарового альдегида и перемешивали 1 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 500 мл воды и 100 мл этанола, сушили на фильтре. Количество адсорбированного белка, определенное по разности концентраций белка в растворе до и после адсорбции, составило 62,9 мг/г носителя. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [18].

Сорбент типа (V). К 5,0 г силохрома ($[COOH]$ 0,58 мг-экв/г) в 50 мл сухого хлороформа добавляли 0,5 мл диметилформамида и 2,4 мл $SOCl_2$. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 60° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 150 мл сухого хлороформа.

Сорбент типа (VI). К 5,0 г силохрома, покрытого полиакриловой кислотой (С 6,93%; $[COOH]$ = 0,92 мг-экв/г), в 50 мл сухого хлороформа добавляли 0,05 мл диметилформамида и 0,82 мл $SOCl_2$. Реакционную массу перемешивали 2 ч при 60—63° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 150 мл сухого хлороформа. Далее к сорбенту в 50 мл сухого хлороформа добавляли 5,34 г гексаметилендиамина, реакционную массу перемешивали 3 ч при 60° С. Сорбент отфильтровывали, промывали 500 мл воды, 50 мл ацетона. Сушили в вакууме при 40—60° С. $[NH_2]$ = 0,26 мг-экв/г (по результатам обратного титрования).

Сорбент типа (VII). К 5,0 г силохрома, покрытого поли- β -оксиэтилметакрилатом (С 1,42%), в 50 мл сухого хлороформа добавляли 5,0 г хлорангидрида *n*-нитробензойной кислоты и 5,8 мл триэтиламина. Реакционную массу перемешивали 3 ч при 60—65° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 200 мл хлороформа, 50 мл ацетона, 200 мл воды и 50 мл ацетона, сушили в вакууме при 40—60° С. Полученный сорбент суспендировали в 100 мл 10% пиридина, содержащего 4,0 г $Na_2S_2O_4$, перемешивали 1 ч при 100—120° С. Сорбент отфильтровывали, промывали 500 мл воды, 50 мл ацетона, сушили в вакууме при 40—60° С. $[NH_2]$ = 0,13 мг-экв/г.

Сорбент типа (VIII). К 8,0 г силохрома, покрытого поли- β -оксиэтилметакрилатом, в 100 мл сухого диоксиана добавляли 1,544 г *N*-*o*-нитрофенилтио- β -аланина и 1,648 г ДЦК. Реакционную массу перемешивали 4 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали и промывали горячим метанолом (5×50 мл), защитную группу удаляли обработкой смесью 6 н. HCl — $MeOH$,

* Результаты будут опубликованы особо. Выделение ЛПБ и фосфолипазы A_2 проводили в ИБХ им. М. И. Шемякина АН СССР.

15 : 100. Сорбент отфильтровывали, промывали 500 мл воды и 50 мл ацетона, сушили в вакууме при 40—60° С. $[\text{NH}_2] = 0,22$ мг-экв/г.

Иммобилизация гас-1-О-(2-оксигексадецил)-2-пальмитоилглицеро-3-фосфохолина (I) на сорбенте типа (V). К 5,0 г сорбента (V) в 20 мл сухого хлороформа добавляли 0,5 мл триэтиламина и 50 мг фосфатидилхолина (I). Реакционную массу перемешивали 24 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 200 мл сухого хлороформа, 100 мл метанола, 150 мл ацетона, сушили в вакууме при 40° С. Концентрация иммобилизованного фосфатидилхолина 8,06 мкмоль/г.

Иммобилизация гас-1-О-(9-октадецил)-2-лауроилглицеро-3-фосфохолина (II) на сорбенте типа (IV). Суспензию 0,6 г сорбента (IV) и 0,34 г фосфатидилхолина (II) в 6,0 мл бензола перемешивали 20 ч при 18—20° С. Далее сорбент отфильтровывали и промывали бензолом (300 мл), сушили на фильтре. Содержание липиды 3,0 мг/100 мг носителя.

Иммобилизация 1-О-ацил-2-(8-карбоксооктаноил)-sn-глицеро-3-фосфохолина (III) на сорбенте типа (VI). К 50 мг сорбента (VI) в 20 мл смеси тетрагидрофуран — вода, 1 : 10 (рН 7,0), добавляли 0,22 мкмоль фосфатидилхолина (III) и 2,2 мкмоль ЦГМК (рН 4,5). рН в смеси доводили до 5,0. Реакционную массу перемешивали 24 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 100 мл смеси тетрагидрофуран — вода (1 : 1), 50 мл метанола, 200 мл 1,0 М NaCl, 500 мл воды и 100 мл ацетона, затем сушили в вакууме при 40—60° С. Концентрация фосфатидилхолина 0,041 мкмоль/г.

Иммобилизация фосфатидилхолина (III) на сорбенте типа (VII). К 50 мг сорбента (VII) в 20 мл сухого тетрагидрофурана добавляли 0,62 мг фосфатидилхолина (III) и 0,906 мг ДЦК. Реакционную массу перемешивали 24 ч при 18—20° С. Полученный сорбент обрабатывали, как описано в предыдущем опыте. Концентрация фосфатидилхолина 0,25 мг/г (0,44 мкмоль/г).

Иммобилизация фосфатидилхолина (III) на сорбенте типа (VIII). К 4,0 г сорбента (VIII) в 50 мл сухого диметилформамида добавляли 45 мг фосфатидилхолина (III) и 310 мг КДИ, оставляли на 24 ч при 18—20° С. Сорбент отфильтровывали и промывали 50 мл диметилформамида, 100 мл метанола, 200 мл смеси хлороформ — метанол — вода (70 : 30 : 5), 2,0 л 1,0 М NaCl, 2,0 л воды и 100 мл ацетона, сушили в вакууме при 40—60° С. Концентрация фосфатидилхолина 1,9 мкмоль/г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tosa T., Mori T., Fuse T., Chibata I. (1969) *Agr. and Biol. Chem.*, **33**, 1047—1052.
2. Weetall H. H., Havewala N. B. (1972) *Enzyme Engineering* (Wingard L. B., ed.), pp. 241—266, Intersci. Publ., London — New York.
3. Подгорак О. М., Чухрай Е. С. (1966) *Ж. физ. химии*, **40**, 1665—1667.
4. Rock C. O., Snyder F. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 6564—6566.
5. Kramer R. M., Withlich C., Bollicr C., Uegami P. R., Zahler P. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **507**, 381—394.
6. Barsukov L. I., Dam C. W., Bergelson L. D., Muzia G. J., Wirtz K. W. A. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **513**, 198—204.
7. Colbeau A., Ngo-Tri H. (1977) *Biochimie*, **2**, 517—526.
8. Verine A., Guidicelli H., Boyer J. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **369**, 125—128.
9. Евстратова Н. Г., Василенко И. А., Попова Т. П., Серебрянникова Г. А., Евстигнеева Р. П. (1979) *Биоорган. химия*, **5**, 1140—1145.
10. Kates M. (1974) *J. Lipid. Res.*, **15**, 525—527.
11. Варламов В. П., Львова Т. Н., Вальковский Д. Г., Мокеев В. Я., Татарская Р. Н., Рогожин С. В. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 816—820.
12. Скрябин К. Г., Варламов В. П., Захарьев В. М., Рогожин С. В., Баев А. А. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 1416—1420.
13. Артемова А. А., Варламов В. П., Киселев А. В., Кустова Г. Л., Липкинд Б. А., Никитин Ю. С., Рогожин С. В., Фалина А. С. (1979) *Бюлл. изобр.*, № 36. Авт. свид. № 688431.
14. Jonas A. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1003—1008.
15. Kamp H. H., Wirtz K. W., Baer P. R., Slotboom A. J., Rosenthal A. F., Paltauf F., van Deenen L. L. M. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1310—1316.

16. Варламов В. П., Банникова Г. Е., Власов А. В., Гадас Б. Е., Цетлин Б. Л., Рогожин С. В. Положительное решение от 16.01.79 г. по заявке № 2513065/05 от 28.07.77 г.
17. Кейтс М. (1975) Техника липидологии, «Мир», М.
18. Методы в биохимии (1975) изд-во «Пяргале», Вильнюс.

Поступила в редакцию
30.I.1980

SYNTHESIS OF BIOSPECIFIC SUPPORTS FOR PROTEIN ISOLATION

EVSTRATOVA N. G., VASILENKO I. A., KONDRATYEVA N. Yu., SEREBRENNIKOVA G. A.,
EVSTIGNEEVA R. P., VARLAMOV V. P., SEMENOVA N. N., ROGOZHIN S. V.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;
Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

The synthesis of biospecific sorbents which involves immobilization of modified phosphatidylcholines on organo-silica supports is described. These sorbents are promising for the isolation of proteins having the affinity for phospholipids.