

УДК 577.112.083+543.544.6

Марет ПАНК, А. МУРЕЛЬ, Светлана ВИЛЬДЕ, О. КИРРЕТ,
А. ШИШОВ

АМФОЛЕНТ — СМЕСЬ НОВЫХ АМФОЛИТОВ-НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЯ И ДРУГИХ МЕТОДОВ СОЗДАНИЯ ГРАДИЕНТОВ pH

Из современных методов для разделения белковых смесей наиболее популярным является изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ). В случае ИЭФ разделение белков происходит под действием электрического поля в градиенте pH, создаваемом амфолитами-носителями.

Менее десяти лет тому назад Л. А. Слайтерман с сотрудниками предложили новый метод фокусирования белковых молекул, получивший название хроматофокусирование (ХФ) [1-4]. Этот способ, являющийся альтернативным методу препаративного ИЭФ, не нуждается в действии электрического поля. В современной биохимии метод ХФ завоевывает все большее признание благодаря наличию существенных преимуществ по сравнению с ИЭФ: во-первых, отпадает потребность в специальном высоковольтном источнике питания, во-вторых, не возникает проблем с охлаждением, часто лимитирующим возможности препаративного ИЭФ.

Разделение белков методом ХФ происходит в градиенте pH, создаваемом амфолитами-носителями на колонке, заполненной ионообменником, т. е. в данном случае генератором градиента pH является сама колонка.

Как метод ИЭФ, так и метод ХФ требуют для создания градиента pH значительных количеств довольно дорогих амфолитов-носителей, поэтому проблема получения новых, дешевых и доступных амфолитов-носителей остается актуальной.

Фокусирование белковых зон при ХФ обусловлено образованием внутреннего градиента pH на ионообменнике, и поэтому хроматографические пики выходят в узких интервалах pH. Ширина выходящих белковых зон зависит от величины потенциала Доннана, т. е. от разницы в величинах заряда ионообменника и элюирующего буфера, от наклона градиента $pH\left(\frac{dpH}{dV}\right)$ и от буферной емкости белка вблизи его изоэлектрической точки [1]. Первые два параметра определяются свойствами ионообменника и элюента. Ионообменники фирмы «Pharmacia» (Швеция), разработанные специально для ХФ, имеют высокую и равномерную буферную емкость (30—40 мкг-экв/ед. pH/мл) во всем рабочем диапазоне pH, т. е. их заряд по мере проведения процесса увеличивается. Что касается свойств элюента, то из фронтального механизма процесса [5] следует, что решающим фактором в разделении белков методом ХФ является правильно подобранный состав элюирующей смеси. Разделение идет тем лучше, чем ближе изоэлектрические точки (pI) амфолитов-носителей к pI разделяемых белков. Наличие в элюенте большого количества компонентов с pI выше, чем pI разделяемого белка, ухудшает

качество разделения на анионообменных смолах из-за увеличения ионной силы элюента, так как при фронтальной хроматографии, когда в колонку непрерывно поступает смесь амфолитов, на выходе из колонки в чистом изоионном виде появляются лишь первые, наиболее «быстрые» компоненты. По мере развития градиента рН смесь амфолитов-носителей в эффлюенте все более обогащается различными компонентами. Соответственно, при использовании катионообменной смолы следует подбирать смеси амфолитов таким образом, чтобы они содержали как можно меньшее число компонентов с pI ниже, чем у наиболее кислого белка разделяемой смеси. Следовательно, использование широких градиентов рН приводит к снижению разрешающей способности метода из-за увеличения ионной силы элюента по мере развития градиента рН.

Фирма «Pharmacia», пионер производства материалов для ХФ, не рекомендует проводить разделение в диапазонах рН, превышающих три единицы рН [6].

Наклон и профиль градиента рН определяются концентрацией и соотношением различных по pI амфолитов в элюенте и емкостью ионообменного материала колонки. Пологий градиент рН, который достигается при использовании разбавленных элюентов, позволяет улучшить разрешающую способность метода относительно белков, обладающих близкими изоэлектрическими точками.

Получение узких фракций амфолитов-носителей необходимо для высококачественного разделения белков методом ХФ. Существует два подхода к решению этой задачи: либо синтез узких фракций амфолитов [7], либо разделение амфолитов-носителей широкого диапазона рН на более узкие фракции методом ИЭФ [8]. В первом случае получают фракции шириной не менее двух единиц рН, во втором — требуется специальное высоковольтное оборудование.

Нами предложен новый метод для разделения амфолитов-носителей на узкие фракции — т. н. хроматофорез. В данном случае градиент рН создается амфолитами на сильном ионообменнике и вытесняется из колонки при помощи иона, имеющего наибольшее сродство к ионообменнику. Таким путем удастся получать узкие фракции амфолитов, вплоть до десятых долей единицы рН [5]. Фракционирование амфолитной смеси методом хроматофореза на колонке, заполненной SP-сефадексом С-25, изображено на рис. 1.

Смеси амфолитов широкого диапазона рН могут быть получены различными способами [7-9]. Нами разработан синтез амфолитов-носителей, пригодных как для ИЭФ, так и для ХФ, заключающийся в модификации аминокислот этиленимином с последующим присоединением непредельных кислот [10]. Полученные таким методом амфолиты-носители имеют низкую оптическую плотность при 280 нм, что позволяет детектировать белки спектрофотометрически ($A_{280}^{1\%} \simeq 0,05$ опт. ед.).

К настоящему времени экспериментальной химической лабораторией рыболовецкого колхоза «Хийу калур» уже выпущена опытная партия амфолитов широкого и узкого диапазонов рН по вышеописанной методике под названием «Амфолент».

Мы проводили разделение модельных белковых смесей с использованием Амфолента в различных диапазонах рН. Например, на ионообменнике ПБИ 118 с Амфолентом широкого диапазона рН была разделена смесь следующего состава: бычий цитохром *c*, рибонуклеаза А и лошадиный миоглобин (рис. 2). Параллельные опыты, проведенные с амфолитами фирмы «Serva» (ФРГ) и «Pharmacia», показали, что полибуфер фирмы «Serva» дает сравнимые с Амфолентом результаты, тогда как полибуфер фирмы «Pharmacia» продемонстрировал при высоких значениях рН несколько худшее разделение цитохрома *c*.

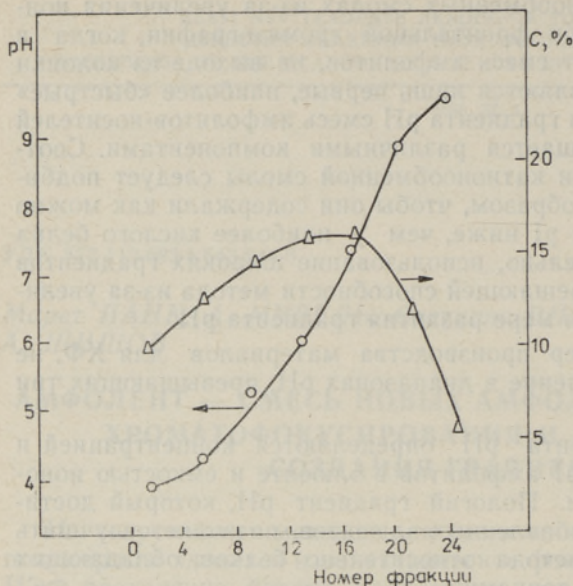


Рис. 1. Фракционирование Амфолента pH 9—4 на колонке с SP-сефадексом C-25, 2,7×51 см. На колонку в H⁺-форме нанесено 100 мл 20%-ной амфолитной смеси. Элюент — 1 М NH₄OH. Объем фракций — 5 мл.

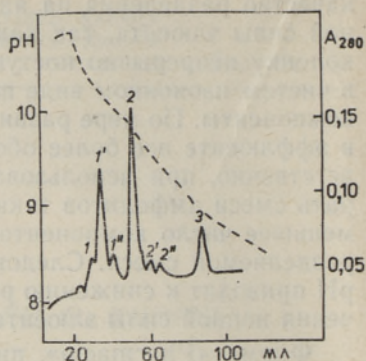
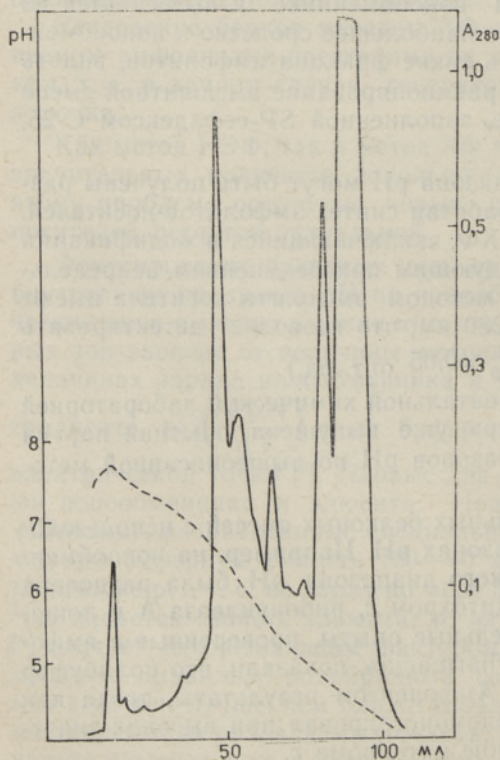


Рис. 2. Хроматофокусирование 2 мг цитохрома *c* (1), 4 мг рибонуклеазы А (2) и 1 мг гемоглобина (3) на колонке с ПБИ 118, 0,9×26 см. Условия: стартовый буфер — 0,025 М триэтиламин (ТЭА)-HCl, pH 10,8—10,6; элюент — 0,8%-ный раствор Амфолента (широкого диапазона pH) + ТЭА, pH 7,1. Скорость элюции — 20 мл/ч.

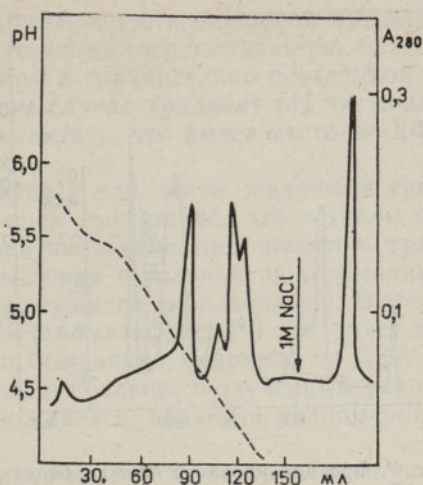
Для фракционирования модельной белковой смеси в диапазоне pH 7—4 мы использовали различные ионообменники в сочетании с Амфолентом узких диапазонов pH. Модельной белковой смесью служил куриный яичный белок и его фракции.



Сравнение результатов разделения яичного белка в интервале pH 7—4 (рис. 3) с аналогичными данными, сообщенными фирмой «Pharmacia» [6], показывает, что с помощью Амфолента удастся выявить все основные пики даже в концентрированном элюенте. Необходимо учесть также и тот факт, что длина колонки, использованной нами, была почти вдвое меньше, чем в эксперименте [6].

Рис. 3. Хроматофокусирование яичного белка на колонке с ПБИ 94, 1,1×14 см. Условия: стартовый буфер — 0,025 М имидазол-HCl, pH 7,5; образец — 3 мл элюирующего буфера, содержащего 0,6 мл куриного яичного белка; элюент — Амфолент pH 7—4 (емкость — 13 мкмоль/ед. pH/мл) + HCl, pH 4,0. Скорость элюции — 15 мл/ч.

Рис. 4. Хроматофокусирование овоальбумина на колонке с ПБИ 94, $1,1 \times 14$ см. Условия: стартовый буфер — 0,025 М гистидин-НСl, pH 5,7; образец — часть фракций, полученных из опыта (рис. 3) и содержащих два последних пика (7 мл); элюент — фракционированный Амфолент pH 6—4 (емкость — 4 мкмоль/ед. pH/мл) + HCl, pH 4,0. Скорость элюции — 30 мл/ч.



При повторном ХФ на фирменном ионообменнике ПБИ разбавленными растворами Амфолента в диапазоне pH 5,7—4,0 фракций овоальбумина, полученных в диапазоне pH 7—4, было достигнуто разделение изоформ овоальбумина (рис. 4) (pI изоформ овоальбумина: 4,75, 4,65, 4,58 и 3,2, 10,8, 50,4% соответственно от общего яичного белка [1]), но овоальбумин A₁ с pI 4,58 (последний пик) частично задерживался на ионообменнике и вымывался полностью только 1 М NaCl.

С подобной же трудностью мы столкнулись, используя в качестве ионообменника тетраэтиленпентамин (ТЭПА)-агарозу собственного приготовления, которая имела достаточно равномерную, но невысокую буферную емкость (8 мк-экв/ед. pH/мл) в диапазоне pH 10—3. Разделение яичного белка на данном ионообменнике следует считать обнадеживающим, хотя и уступающим разделению на фирменных сорбентах типа ПБИ. По всей видимости, малая буферная емкость ионообменника является причиной размыва последних пиков. Кроме того, необходимость использования очень разбавленных растворов амфолитов вызывает

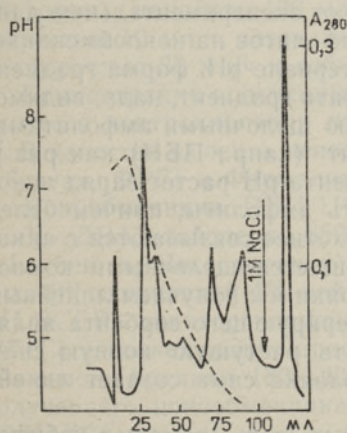


Рис. 5. Хроматофокусирование яичного белка на тетраэтиленпентамин-агарозе, $1,1 \times 10$ см. Условия: стартовый буфер — 0,025 М имидазол-НСl, pH 7,5; образец — 1 мл элюирующего буфера, содержащего 0,2 мл яичного белка; элюент — Амфолент pH 7—4 (емкость — 2 мкмоль/ед. pH/мл) + HCl, pH 4,0. Скорость элюции — 30 мл/ч.

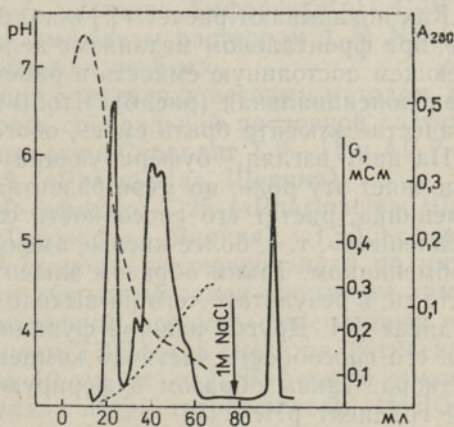


Рис. 6. Фракционирование яичного белка на ДЭАЭ-тойоперле 650 М, $1,1 \times 11$ см. Условия: стартовый буфер — 0,025 М имидазол-НСl, pH 7,2; образец — 3 мл стартового буфера, содержащего 0,6 мл куриного яичного белка; элюент — 0,1%-ный раствор Амфолента (pH 7—4) + HCl, pH 3,5; скорость элюции — 26 мл/ч. A₂₈₀ — сплошная линия, pH — разрывная линия, электропроводность G — пунктир. Здесь и на рис. 7, 8.

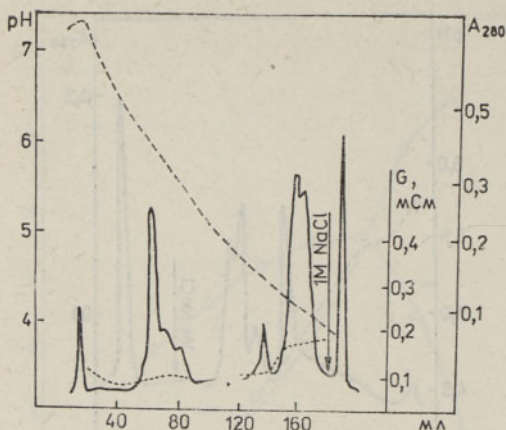


Рис. 7. Фракционирование яичного белка на ДЭАЭ-тойоперле 650 М (семихроматофокусирование). Элюент — градиент рН создавали при помощи 0,1%-ного Амфолента узких диапазонов рН: 7—6, 6—5 и 5—4 по 50 мл, рН последней смеси доводили до 4,0 концентрированной HCl. Остальные условия см. в подписи к рис. 6.

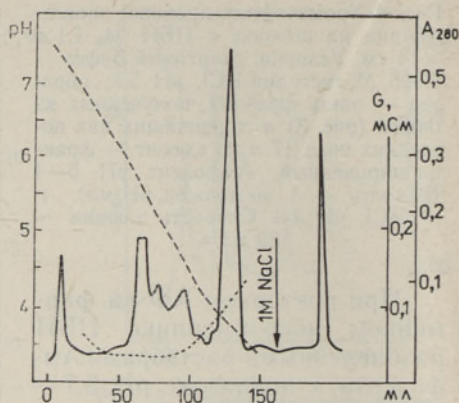


Рис. 8. Фракционирование яичного белка на ДЭАЭ-тойоперле 650 М (хроматофорез-элюция). Элюент — смесь Амфолента рН 7—3,5, пропущенная через колонку с ТЭАЭ-сфероном (см. экспериментальную часть). Остальные условия см. в подписи к рис. 6.

сильное отставание белков от своих pI , причем овоальбумин (pI 4,7) частично задерживается на ионообменнике (рис. 5).

Таким образом, первые экспериментальные данные использования Амфолента в качестве элюента ХФ подтверждают его пригодность для создания линейного градиента рН на буферирующих ионообменниках, специально созданных для ХФ.

Каковы пути создания линейного градиента рН на обычных, небуферирующих ионообменниках (напр., на ДЭАЭ-тойоперле)?

Как показывают расчеты [5] и подтверждают экспериментальные данные, при фронтальном механизме деления амфолитов на ионообменнике, имеющем постоянную емкость в рабочем интервале рН, форма градиента экспоненциальная (рис. 6). Чтобы выпрямить градиент, надо, видимо, в качестве элюента брать смесь, обогащенную щелочными амфолитами.

На наш взгляд, буферирующий сорбент (напр., ПБИ) как раз и выполняет эту роль: по мере развития градиента рН растет заряд ионообменника, растет его способность связывать амфолиты, причем более «медленные», т. е. более кислые амфолиты, охотнее связываются с анионообменником. Таким образом элюент обогащается щелочными компонентами, в результате чего на выходе из колонки мы получаем линейный градиент рН. Другой важной функцией буферирующего сорбента является его способность частично компенсировать растущую ионную силу раствора. Таким образом буферирующая колонка сама создает линейный градиент рН.

Другим подходом к решению вопроса может стать «помощь» небуферирующей колонке в создании градиента, т. е. поочередная подача на колонку амфолитов, которые уже частично поделены на узкие фракции рН. Так, в проспекте фирмы «Serva» описано разделение белков на ДЭАЭ-ионообменнике в градиенте рН 10,5—3,0 [12]. В колонку последовательно подавались растворы амфолитов более узких диапазонов. Полученный градиент при этом имел ступенчатую форму и состоял из двух линейных участков 9,0—6,0 и 6,0—2,0, соединенных между собой горизонтальным отрезком. Чтобы избежать горизонтальных участков на градиенте (продолжительность эксперимента!), мы использовали градиентные смесители (один или несколько), в которые загружали амфолиты

узких диапазонов рН. В таком случае возможность смещения амфолитов с различными изоэлектрическими точками ограничивается, благодаря чему и ионная сила остается низкой и сравнительно постоянной в течение всего градиента (рис. 7). В этом случае градиент рН частично создается вне колонки, поэтому можно считать, что имеет место не ХФ, а полу- или семихроматофокусирование.

Очевидно, чем уже фракции амфолитов и чем шире желаемый градиент, тем больше требуется градиентных смесителей, что технически довольно трудноосуществимо. В таком случае в качестве генератора градиента рН может быть использована колонка с сильным ионообменником, на котором сорбированы амфолиты нужного диапазона рН. Вытесняемый из первой колонки градиент рН (хроматофорез [5]) поступает во вторую колонку, где на подходящем ионообменнике, например на ДЭАЭ-носителе, сорбирована исследуемая смесь белков. Полученный таким образом плавный градиент рН сопровождается низкой и равномерной ионной силой (рис. 8).

Таким образом, для разделения белков по их изоэлектрическим точкам в градиенте рН имеется несколько способов. К настоящему времени широко используется только один из них — ХФ, при котором градиент создается смесью амфолитов на буферирующих ионообменниках. Два других, семихроматофокусирование и хроматофорез—рН-градиентное элюирование, требует еще уточнений для конкретных случаев. Во всех трех способах для создания рН-градиента необходимы амфолиты разных диапазонов рН, для чего вполне пригоден Амфолент.

Экспериментальная часть

Элюенты для ХФ. Амфолент — продукт экспериментальной химической лаборатории рыболовецкого колхоза «Хийу калур» — использовался непосредственно или после фракционирования на более узкие фракции методом хроматофореза. Хроматофорез проводили следующим образом: на колонку, заполненную SP-сефадексом С-25 ($V=300$ мл в H^+ -форме), наносили 100 мл 20%-ного раствора Амфолента рН 4—9 со скоростью 10 мл/ч, затем вытесняли амфолиты раствором 1 М NH_4OH со скоростью 30 мл/ч и собирали фракции по 5 мл.

Концентрации полученных фракций определяли весовым методом. рН процесса контролировали при помощи специальной проточной системы [5]. В качестве элюента использовали также Сервалит Т 9—11 и АГ 7—9 («Serva», ФРГ) и Фармалит 8—10,5 («Pharmacia», Швеция).

Ионообменники. ПБИ 118, 94, SP-сефадекс С-25 («Pharmacia», Швеция), ДЭАЭ-тойоперл 650 М («Toyosada», Япония), ТЭАЭ-сферон («Lachema», Чехословакия), ТЭПА-агароза, синтезированная по методике [13] активацией 4%-ной агарозы (Опытный завод Института химии АН ЭССР) эпихлоргидрином (технический продукт, перегнанный при 117°C) с последующим присоединением ТЭПА (из смеси полиэтиленполиаминов, фракция 180—200°C при 10 мм рт. ст.). Буферную емкость полученного ионообменника определяли путем титрования 0,1 М HCl в 0,2 М KCl .

Белки. Лошадиный миоглобин («Serva», ФРГ), бычий цитохром с и рибонуклеаза А («Sigma», США), яичный белок, разбавленный элюентом 1:5 (по объему), отфильтрованный через стеклянный фильтр и отцентрифугированный при 3000 g.

Растворы буферов. Триэтиламин (ТЭА) и имидазол («Fluca», Швейцария), гистидин («Reanal», Венгрия), растворы перед употреблением дегазировали.

Хроматографические колонки. К 9/30 («Pharmacia») и колонка конструкции А. Полокайнена, размером 1,1×20 см, снабженная адапторами со стеклотканью на концах [14].

При ХФ колонку, заполненную ионообменником, уравнивали стартовым буфером. Затем через колонку пропускали несколько миллилитров элюирующего буфера, после чего вводили образец и продолжали элюцию. Элюент готовили разбавлением исходных растворов амфолитов подходящего диапазона рН кипяченым бидистиллятом до необходимых концентраций. рН элюента доводили до нужного значения при помощи концентрированной HCl или ТЭА.

При фракционировании белковой смеси на ДЭАЭ-ионообменнике в градиенте рН элюирование белка проводили либо смесью амфолитов широкого диапазона рН, либо градиентом, составленным из амфолитов узких диапазонов, либо градиентом рН, полученным хроматофорезом. В последнем случае 2 мл 20%-ного Амфолента рН 7—3,5 сорбировали на колонке с ТЭАЭ-сфероном (0,8×15,0 см) в ОН⁻-форме. Градиент рН, вытесняемый 10 мМ HCl, поступал в колонку с ДЭАЭ-тойоферлом. Оптическую плотность выходящего из колонки элюента измеряли при 280 нм на «Uvicord II» или «Uvicord S», фракции собирали при помощи коллектора «Ultracrac II» или «Ultracrac 7000», скорость элюции устанавливали с помощью перистальтического насоса «Perplex 2138» или «Multiperplex 2115» (LKB, Швеция). рН фракций измеряли на рН-метре РНМ 64 («Radiometer», Дания), проводимость — на кондуктометре ОК-102/1 («Radelkis», Венгрия), константа ячейки измерения — 1,3 см⁻¹.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sluyterman, L. A., Elgersma, G. Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. I. General principles. — J. Chromatogr., 1978, 150, 17—30.
2. Sluyterman, L. A., Wijdenes, J. Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. II. Experimental verification. — J. Chromatogr., 1978, 150, 31—44.
3. Sluyterman, L. A., Wijdenes, J. Chromatofocusing. III. The properties of a DEAE-agarose anion exchanger and its suitability for protein separations. — J. Chromatogr., 1981, 206, 429—440.
4. Sluyterman, L. A., Wijdenes, J. Chromatofocusing. IV. Properties of an agarose polyethyleneimine ion exchanger and its suitability for protein separation. — J. Chromatogr., 1981, 206, 441—447.
5. Murel, A., Vilde, S., Pank, M., Shevchuk, I., Kirret, O. Chromatophoresis: a new approach to the theory and practice of chromatofocusing. I. General principles. — J. Chromatogr., 1985, 347, 325—334; II. Experimental verification. — J. Chromatogr., 1986, 362, 101—112.
6. Хроматофокусирование полибуфером на ПБИ. (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция). Uppsala.
7. Just, V. V. Synthesis of carrier ampholytes for isoelectric focusing. — Meth. Enzymol., 1983, 91, 281—298.
8. Vesterberg, G. Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes. — Acta Chem. Scand., 1969, 23, N 8, 2653—2666.
9. Söderberg, L., Buckley, D., Hagström, G., Bergström, J. The chemical properties of pharmalyte. — Prot. Biol. Fluids, 1980, 27, 687—691.
10. Мурель А. П., Конгас А. А., Вильде С. В., Киррет О. Г., Панк М. С. Способ получения амфолитов-носителей для изоэлектрического фокусирования белков. — Открытия, изобретения, 1986, № 41, 88, авт. свид. СССР № 1268567.
11. Rhodes, M. B., Azari, P. R., Feeney, R. E. Analysis, fractionation and purification of egg white proteins with cellulose cation exchanger. — J. Biol. Chem., 1958, 230, N 1, 399—408.
12. Тонкие биохимикаты. (Serva, ФРГ), 1984/85, LC 32—33.
13. Porath, J., Fornstedt, N. Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion-exchangers. — J. Chromatogr., 1970, 51, N 3, 479—489.
14. Полокйнен А. Разборная колонка для жидкостной хроматографии. — Лабор. дело, 1981, вып. 11, 702—703.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
1/VI 1987

Всесоюзный научно-исследовательский
институт особыхистых биопрепаратов
(Ленинград)

**AMFOLENT — UUTE KANDEAMFOLÜÜTIDE SEGU
KROMATOFOKUSSEERIMISEKS JA TEISTEKS pH-GRADIENDI
MOODUSTAMISE MEETODITEKS**

On vaadeldud mõningaid kalurikolhoosi «Hiiu Kalur» eksperimentaallaboratooriumi poolt toodetud uute kandeamfolüütide — «Amfolent» — omadusi.

Amfolent omab madalat optilist tihedust 280 nm juures, see võimaldab spektrofotomeetriliselt detekteerida valke. Kromatoforeesi meetodil saadi Amfolendist kitsad fraktsioonid, laius üks pH ühik. Mudelvalgusegude (tsütokroom *c*, munavalge, ovaalbumiin) lahutamine näitas, et Amfolenti võib edukalt kasutada kromatofokuseerimise eluendina.

Arutletakse võimaluste üle valkude elueerimiseks pehmeteltioonvahetajatelt amfolüütsegude abil loodud pH-gradiendis. Lisaks kromatofokuseerimisele pakutakse selleks kaht uut meetodit, mis tagavad madala ja ühtlase ioonse jõu pH-gradiendi laias vahemikus. Esimese meetodi puhul (semikromatofokuseerimisel) kasutatakse gradientsega-jat kitsaste kandeamfolüütide segamiseks. Teise meetodi puhul (kromatoforees—elueerimine) desorbeeritakse valgud pehmetlioonvahetajalt pH-gradiendis, mis on moodustunud amfolüütide abil kromatoforeesiga tugevalioonvahetajal.

Maret PANK, A. MUREL, Svetlana VILDE, O. KIRRET, A. SHISHOV

**AMPHOLENT — A MIXTURE OF NEW CARRIER AMPHOLYTES
IN CHROMATOFOCUSING AND OTHER METHODS FOR CREATING
THE pH GRADIENTS**

Some properties of the Ampholent — new carrier ampholytes (product of the experimental laboratory of the "Hiiu Kalur" fishery, Tallinn) have been discussed. The Ampholent has low optical density at 280 nm that enables to detect proteins spectrophotometrically. Narrow fractions of the ampholytes with one pH unit width have been obtained by chromatophoretic separation. Separation of test protein mixtures (cytochrome *c*, egg white, ovalbumin) demonstrates that the Ampholent is an efficient eluent in chromatofocusing. Several ways of pH gradient protein elution with amphoteric eluents on weak ion exchangers are discussed. In addition to chromatofocusing two new methods are introduced to provide low and even ionic strength during pH gradient evolution. One method (semichromatofocusing) employs elution with gradient mixer charged with different narrow pH range ampholytes. In another approach (CHPH-elution) proteins are desorbed in pH gradient from the weak ion exchanger column whereas the eluent is the effluent from a strong ion exchanger column where ampholytes array themselves in the pH gradient via chromatophoretic process.