Изв. АН Эстонии. Хим., 1991, **40**, № 1, 30—36
https://doi.org/10.3176/chem.1991.1.04

УДК 577.112. 083+543.544.6

Светлана ВИЛЬДЕ, Эльвира ЭББЕР**

ПОЛИБУФЕРЫ ДЛЯ ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЯ

Введение

Хроматофокусирование (ХФ) является довольно распространенным и эффективным методом разделения белков. Этот метод, предложенный Л. А. Э. Слайтерманом более 10 лет назад, нашел широкое применение и получил дальнейшее развитие [1].

Фирма «Pharmacia» (Швеция) предлагает набор реактивов для ХФ, в состав которого входят полибуферы-ионообменники (ПБИ) 9—4 и 11—8, полибуферы (ПБ) 7—4 и 9—6, а также для работы в шелочной области — амфолит-носитель (АН) «Фармалит» 9—11.

Ионообменный материал может быть многократно регенерирован, но ПБ — довольно дорогие реагенты и каждый раз расходуются в значительных количествах. Поэтому целью данной работы было совершенствование методов синтеза АН, пригодных для использования в качестве ПБ для ХФ, разработанных в нашей лаборатории.

Разделение белков методом ХФ может быть осуществлено двумя путями: либо непосредственным синтезом АН узкого диапазона pH, либо синтезом АН широкого диапазона pH (4—9, 3—10) с последующим фракционированием их на узкие фракции. Х. Свенссон разработал теоретические требования к структуре и свойствам АН [2]. Патент О. Вестерберга описывает присоединение к аминам ненасыщенных карбоновых кислот [3]. Н. Грубхофер и П. Погакар получили в 1973 г. патент на АН, имеющие в своем составе наряду с карбоксильными сульфоновые и фосфоновые группы [4].

В 1978 г. в продажу поступили АН нового «поколения» амфолитов Сёдерберга [5]. Синтез заключается в сополимеризации аминов, аминокислот и дипептидов с эпихлоргидрином. Подбирая соответствующим образом состав исходной смеси аминов и аминокислот, удается прямо получать серии амфолитов пяти узких диапазонов pH. В литературе описаны также способы получения АН в лабораторных условиях [6–8].

В нашей лаборатории разработана методика синтеза АН широкого диапазона pH (4—9) на основе модификации аминокислот этиленимином с последующим присоединением непредельных кислот [9].

В данной работе была поставлена цель улучшения качества элюента за счет расширения рабочего диапазона pH от 3 до 10.

Экспериментальная часть

Реактивы. Полиэтиленимин, синтезированный в нашей лаборатории [9], натриевая соль 1-хлор,2-гидроксипропилсульфокислоты, синтезированная в лабораторных условиях по методике [10], NaOH (ч. д. а., Реахим, Харьков), NH_4Cl (х. ч., Реахим), β-аланин («Reanal», BP), глицин («Reanal»), таурин («Reanal»), эпихлоргидрин (ч., Реахим), этилендиа-

* Eesti Teaduste Akadeemia Keemia Instituut (Институт химии Академии наук Эстонии). 200108 Tallinn, Akadeemia tee 15. Estonia.

мин (ч., Реахим), глицин-глицин («Reanal»), ε-аминокапроновая кислота (ЧСФР), глутаминовая и аспарагиновая кислоты («Reanal»), HCl (х. ч., Реахим). Для деления АН на узкие фракции применяли SB-Сферон 1000 (ЧСФР), для сорбции цветных компонентов — активированный уголь марки БАУ (Реахим). Очистку АН от хлорида натрия проводили на Молселекте Г-10 («Reanal»).

Элюенты для ХФ. В качестве ПБ для ХФ использовали 1%-ные водные растворы АН, синтезированные по методикам 1—4 (см. ниже). Для сравнения применяли ПБ 4—7 фирмы «Pharmacia».

Ионообменники. ПБИ 4—9 («Pharmacia»), буферирующий ионообменник, полученный путем модификации Сепарона HEMA 1000 («Tessek», ЧСФР) в лабораторных условиях (емкость 1,27 мг-экв/г).

Белки. Яичный белок, разбавленный элюентом 1 : 5 (по объему), пропущенный через стеклянный фильтр и отцентрифугированный при 3000 g; инвертаза, выделенная в Таллиннском техническом университете; миоглобин из спермы кита и миоглобин из скелетной мышцы лошади («Serva», ФРГ).

Буферы. Триэтаноламин (х. ч., Реахим), имидазол («Fluka», Швейцария), *трис*(гидроксиметил)аминометан («Reanal»). Растворы буферов перед употреблением дегазировали. Для промывания колонки использовали 1 М раствор NaCl (х. ч., Реахим).

Хроматографические колонки. Колонка 5×200 мм («Pharmacia»), заполненная ПБИ 4—9 («Pharmacia»); колонка 3,3×150 мм («Tessek»), заполненная модифицированным Сепароном HEMA 1000; самодельная стеклянная колонка 5×150 мм, снабженная адапторами со стеклотканью на концах.

Перед проведением ХФ колонку, заполненную ионообменником, уравновешивали стартовым буфером. Затем наносили модельный белок, растворенный в стартовом буфере, и проводили элюцию ПБ. Элюент готовили разбавлением АН нужного диапазона pH кипяченой бидистиллированной водой до 1%-ной концентрации. pH элюента доводили до нужного значения 1 М раствором HCl или CH_3COOH. После окончания ХФ колонку промывали 1 М раствором NaCl для удаления связанных с сорбентом компонентов.

Приборы и аппаратура. Для сбора фракций после хроматофореза использовали фракционосборник FCC 60 (Lab. Přistroje, ЧСФР), для элюции — перистальтический насос ПН-1 М (СССР). pH фракций измеряли на pH-метре OP-211/1 («Radelkis», ВР). ХФ проводили с использованием системы HPLC («Pharmacia»).

Синтез 1. В трехгорловую колбу, снабженную мешалкой, обратным холодильником, термометром и капилляром для продувания реакционной смеси аргоном, помещали 18,9 г полиэтиленимина и 20 мл дистиллированной воды. 0,25 М (49 г) натриевой соли 1-хлор,2-гидроксипропилсульфокислоты растворяли в 50 мл дистиллированной воды. Из делительной воронки добавляли в колбу раствор соли при постоянном перемешивании и продувании реакционной смеси аргоном, температуру реакционной смеси поддерживали около 80 °С с помощью термостатированной водяной бани. По окончании приливания реактива смесь нагревали еще в течение 8—10 ч до прекращения падения pH реакционной смеси. После завершения реакции NaCl удаляли гель-фильтрацией на Молселекте Г-10. Полученные АН широкого диапазона pH (3—10) фракционировали методом хроматофореза на SB-Сфероне 1000. Сорбент промывали 1 М раствором HCl для перевода катионообменника в H^+-форму. Затем колонку промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции эффлюента. Профиль градиента pH, полученный на выходе из колонки, представлен на рис. 1. Для удаления цветных компонентов, обусловливающих светло-желтый цвет АН и поглощение в УФ-области, полученный

реагент 3-кратно обрабатывали активированным углем БАУ при температуре 80 °С в атмосфере аргона. Концентрацию полученных амфолитов определяли весовым методом после высушивания фиксированного объема АН до постоянного веса при температуре 80 °С.

Синтез 2. В четырехгорловую колбу, снабженную мешалкой, обратным холодильником, термометром, pH-метром и капилляром для продувания колбы аргоном, помещали 18,9 г полиэтиленимина и 20 мл дистиллированной воды. 0,1 М натриевой соли 1-хлор,2-гидроксипропилсульфокислоты и 0,1 М (9,45 г) монохлоруксусной кислоты растворяли в 50 мл дистиллированной воды; готовили 40 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Колбу с содержимым нагревали при постоянном перемешивании и продувании аргоном, из делительных воронок по каплям добавляли приготовленные растворы. Закончив приливание реагентов, проводили реакцию при 80 °С до прекращения изменения pH реакционной смеси. Дальнейшую обработку АН проводили аналогично синтезу 1. Получен АН, образующий градиент 3—10 ед. pH (см. рис. 1).

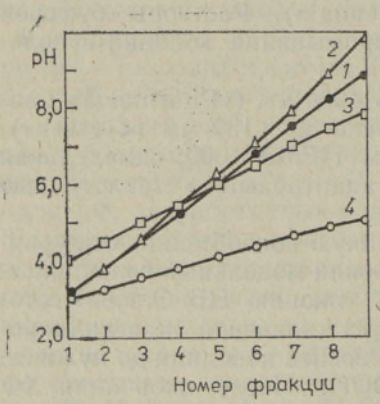

Рис. 1. Формирование градиента pH в процессе фракционирования амфолитов-носителей, синтезированных по методикам 1 (*1*), 2 (*2*), 3 (*3*) и 4 (*4*). Условия. Колонка с SB-Сфероном 1000, 17×330 мм; наносили 30 мл 20%-ных амфолитов в H+-форме; элюент — 0,5 М раствор NaOH; скорость элюции — 60 мл/ч; отбор фракций — через 10 мин.

Синтез 3. В трехгорловую колбу, снабженную мешалкой, обратным холодильником, термометром и капилляром для продувания колбы аргоном, помещали 0,1 М (6 г) этилендиамина, разбавленного 10 мл дистиллированной воды, и раствор смеси аминокислот: β-аланина 0,2 М (9,8 г), 0,15 М (11,3 г) глицина, 0,05 М (6,6 г) глицин-глицина и 0,1 М (12,5 г) таурина в 40 мл дистиллированной воды. 0,5 М (20 г) NaOH растворяли в 25 мл дистиллированной воды. Из делительных воронок в реакционную колбу по каплям приливали раствор щелочи и эпихлоргидрина при постоянном перемешивании и продувании реакционной смеси аргоном, нагревали до 80 °С. Реакцию считали завершенной по установлении постоянного значения pH реакционной смеси. Дальнейшая обработка АН аналогична синтезу 1. Градиент pH, формируемый АН, 4—8 ед. (см. рис. 1).

Синтез 4. В трехгорловую колбу, снабженную мешалкой, обратным холодильником, термометром и капилляром для продувания колбы аргоном, помещали 0,04 М (2,14 г) NH_4Cl, растворенного в 10 мл дистиллированной воды, 0,11 М (14,4 г) ε-аминокапроновой кислоты, 0,08 М (7,12 г) β-аланина, 0,03 М (2,25 г) глицина, 0,06 М (7,92 г) глицин-глицина, 0,06 М (8,82 г) *d, l*-глутаминовой кислоты, 0,07 М (9,31 г) *d, l*-аспарагиновой кислоты, 0,14 М (9,8 г) таурина в виде суспензии в 100 мл дистиллированной воды. При постоянном перемешивании и продувании реакционной смеси аргоном смесь нагревали и из делительных воронок

по каплям добавляли 0,05 М (46,25 г) эпихлоргидрина и 0,54 М (21,6 г) гидроксида натрия в виде 10%-ного водного раствора. Реакцию проводили при 80 °С до просветления раствора. Дальнейшая обработка АН аналогична синтезу 1. В результате получили фракцию АН в интервале 3—5 ед. pH (см. рис. 1).

Результаты и обсуждение

Описанные способы синтеза, проведенные в лабораторных условиях, не представляют особых сложностей для воспроизведения. В синтезах 1 и 2 химизм реакций, протекающих по аминогруппе, может быть описан следующими уравнениями:

$$>NH+ClCH_2—CH(OH)—CH_2—SO_3Na \rightarrow$$

$$\rightarrow >N—CH_2—CH(OH)—CH_2—SO_3Na+NaCl+H_2O,$$

$$>NH+ClCH_2COOH+NaOH \rightarrow >N—CH_2—COOH+NaCl.$$

В синтезах 3 и 4 происходит реакция сополимеризации аминов и аминокислот с эпихлоргидрином. Образующиеся АН аналогичны по своей структуре полученным путем модификации полиэтиленполиаминов.

Результаты синтезов 1 и 2 свидетельствуют о том, что использование для синтеза натриевой соли 1-хлор,2-гидроксипропилсульфокислоты позволяет расширить рабочий диапазон pH в кислую область на единицу за счет введения в молекулу АН сульфогруппы. Синтезированные таким способом АН широкого диапазона необходимо фракционировать для получения качественного разделения белков методом ХФ. Узкие фракции были получены методом хроматофореза [10] на сильном катионообменнике SB-Сфероне 1000. Это определяет основное отличие элюентов-ПБ от обычных АН узких диапазонов pH. АН, предназначенные для изоэлектрофокусирования белков, сами подлежат фракционированию в электрическом поле по их изоэлектрическим точкам. АН, предназначенные для элюирования белков на ионообменных смолах, фракционируют по их сродству к ионообменнику.

Непосредственно узкие фракции АН были получены в синтезах 3 и 4, являющихся разновидностями синтеза [5], но отличающихся от последнего введением сульфогруппы в состав АН. Они имеют низкую оптическую плотность при 280 нм, что позволяет детектировать белки спектрофотометрически ($E^{1\%}_{1\,см} D_{280} \leqslant 0{,}05$ опт. ед.), и равномерную буферную емкость во всем рабочем диапазоне pH, что является необходимым условием для формирования линейного градиента pH на колонке. Эти АН были опробованы для работы в качестве ПБ для ХФ на ПБИ 4—9. Модельной белковой смесью для ХФ в диапазоне 4—7 служил куриный яичный белок, для сравнения проводили аналогичный опыт с применением в качестве элюента ПБ 4—7. Сравнение результатов разделения яичного белка в интервале pH 4—7 на ПБИ 4—9 с использованием фирменного и синтезированного нами по методике 3 ПБ свидетельствует о хорошем качестве последнего (рис. 2, А, Б).

Хорошее разделение получено при использовании смеси двух миоглобинов (рис. 3) с использованием в качестве элюента АН, синтезированных по методике 2. На хроматограмме получилось два четко разделенных пика.

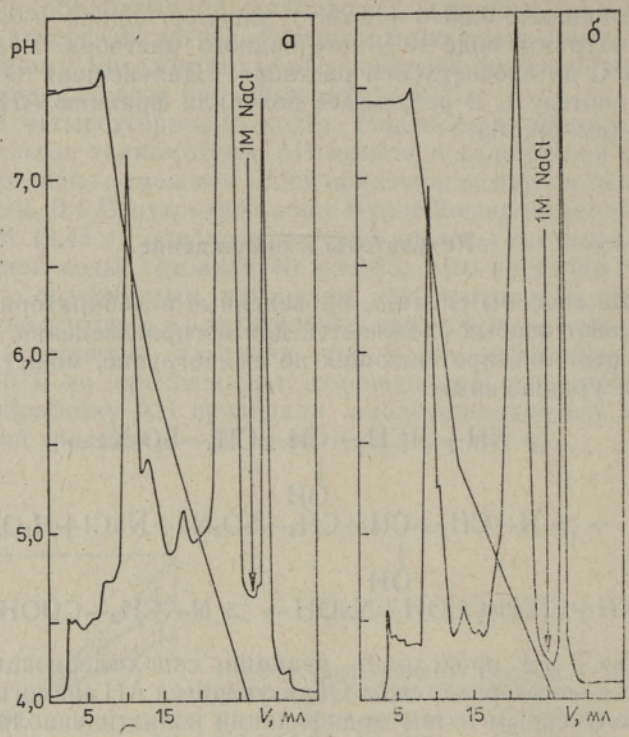

Рис. 2. Разделение яичного белка с использованием двух полибуферов — синтезированного нами по методике 3 (а) и фирменного («Pharmacia», Швеция) (б).
Условия. Колонка 5×150 мм с полибуфером-ионообменником 4—9; стартовый буфер — 25 мм имидазол—HCl; pH 7,5; образец — 0,5 мл элюирующего буфера, содержащего 0,1 мл куриного белка; pH элюента-полибуфера доведен 1 М HCl до 4; скорость элюции — 0,5 мл/мин.

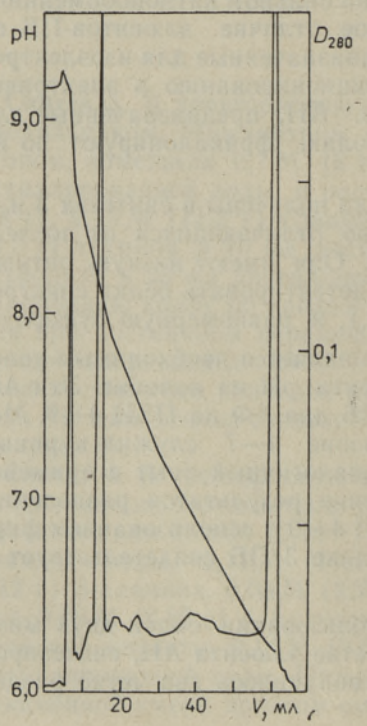

Рис. 3. Хроматофокусирование смеси миоглобина из спермы кита и миоглобина из скелетной мышцы лощади на колонке с полибуфером-ионообменником 4—9.
Условия. Колонка 5×200 мм; стартовый буфер — 25 мМ триэтаноламин—CH_3COOH; pH 9,2; образец — 0,5 мл стартового буфера, содержащего 2 мг смеси миоглобинов; элюент — 1%-ный раствор полибуфера, синтезированного по методике 2 и доведенного CH_3COOH до pH4; скорость элюции — 0,5 мл/мин.

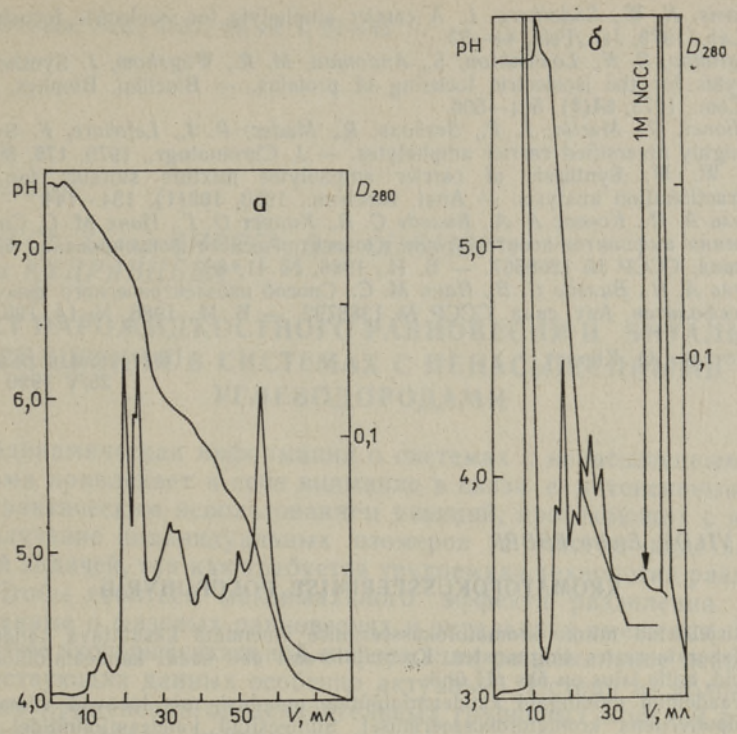

Рис. 4. Хроматофокусирование инвертазы на колонке с буферирующим ионообменником, синтезированным на основе Сепарона НЕМА 1000 в диапазоне pH 4—7 (а) и 3—6 (б).

Условия. Колонка 3,3×150 мм; образец — 0,5 мл полибуфера с концентрацией инвертазы 4 мг/мл; скорость элюции — 0,5 мл/мин; стартовые буферы — 25 мМ имидазол—HCl, pH 7,5 (а) и 25 мМ гистидин—HCl, pH 5,8 (б); элюенты — 1%-ный водный раствор полибуфера, синтезированного по методике 1 и доведенного HCl до pH 4 (а), а также синтезированного по методике 4 и доведенного HCl до pH 3 (б).

При ХФ инвертазы с использованием в качестве полибуфера АН, синтезированных по методике 1, ионообменником служил сорбент, синтезированный на основе Сепарона НЕМА 1000. Некоторая нелинейность градиента свидетельствует о пониженной буферной емкости ионообменника в интервале pH 6—6,5.

Разделение инвертазы в области pH 4—7 и в кислой области (рис. 4, А, Б) с использованием модифицированного в лабораторных условиях сорбента дает обнадеживающие результаты на дальнейшее комплексное применение ПБ и ПБИ, синтезированных в нашей лаборатории.

Таким образом, пользуясь данными методиками, можно получать АН, пригодные для использования в качестве ПБ для проведения ХФ белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sluyterman, L. A. E., Kooistra, C.* Ten years of chromatofocusing: A discussion. — J. Chromatogr., 1989, **470**, 317—326.
2. *Swensson, H.* Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. — Acta Chem. Scand., 1961, **15**, 325—341.
3. *Vesterberg, O.* Method of isoelectric fractionation. Patent USA 3, 485, 736 (23. Dec. 1969).
4. *Grubhofer, N., Pogacar, P.* Ampholytes for focusing electroforesis. Patent USA 3, 770, 603 (Nov. 1973).

5. *Williams, K. W., Söderberg, L.* A carrier ampholyte for isoelectric focusing. — Int. Lab., 1979, Jan./Feb., 44—53.
6. *Vinogradov, S. N., Lowenkron, S., Andonian, M. R., Wagshow, J.* Synthetic ampholytes for the isoelectric focusing of proteins. — Biochim. Biophys. Acta. Res. Com., 1973, **54(2)**, 501—506.
7. *Charlionet, R., Martin, J. P., Sesboue, R., Madec, P. J., Lefebvre, F.* Synthesis of highly diversified carrier ampholytes. — J. Chromatogr., 1979, **176**, 89—101.
8. *Just, W. W.* Synthesis of carrier ampholytes mixture suitable for isoelectric fractionation analysis. — Anal. Biochem., 1980, **102(1)**, 134—144.
9. *Мурель А. П., Конгас А. А., Вильде С. В., Киррет О. Г., Панк М. С.* Способ получения амфолитов-носителей для изоэлектрического фокусирования белков. Авт. свид. СССР № 1268567. — Б. И., 1986, № 41, 88.
10. *Мурель А. П., Вильде С. В., Панк М. С.* Способ изоэлектрического фокусирования амфолитов. Авт. свид. СССР № 1388792. — Б. И., 1988, № 14, 199.

Представил О. Киррет

Поступила в редакцию
25/V 1990

Svetlana VILDE, Elvira EBBER

KROMATOFOKUSSEERIMISE POLÜPUHVRID

On kirjeldatud mitme kromatofokusseerimise eluendina kasutatava kandeamfolüüdi sünteesi laboratoorsetes tingimustes. Kromatoforeesi abil saadi kandeamfolüüdist kitsad fraktsioonid, mille laius on üks pH ühik.

On vaadeldud mõningaid kandeamfolüütide omadusi, mis lubavad viimaseid kasutada polüpuhvritena kromatofokusseerimisel. Sünteesitud kandeamfolüütidel on madal optiline tihedus 280 nm juures, see võimaldab spektrofotomeetriliselt detekteerida valke.

Mudelvalgusegude (munavalge, müoglobiinid, invertaas) lahutamine näitas, et kandeamfolüüte võib edukalt kasutada kromatofokusseerimise eluendina.

Svetlana VILDE and Elvira EBBER

POLYBUFFERS FOR CHROMATOFOCUSING

Some synthesis of carrier-ampholytes used as eluent-polybuffers in chromatofocusing have been described. Narrow fractions of the ampholytes with one pH unit width have been obtained by chromatophoretic separation.

Some properties of polybuffers for chromatofocusing have been discussed. The synthesized carrier ampholytes have low optical density at 280 nm that enables to detect proteins spectrophotometrically.

Separation of test protein mixtures (egg white, myoglobins, invertaze) demonstrates that synthesized carrier ampholytes are an efficient eluent in chromatofocusing.