

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
НА ПОЛИМЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННОМ СОРБЕНТЕ**

Л. Г. МАНГАСАРЯН

Ереванский государственный университет

Поступило 27 I 2006

Рассмотрены вопросы иммобилизации бычьего сывороточного альбумина на поверхности гибридного полимерно-минерального сорбента на основе широкопористого силикагеля и полиакриламидного геля, активированного глутаровым альдегидом. Активирование сорбента глутаровым альдегидом и иммобилизация белка осуществлены непосредственно в хроматографической колонке.

Рис. 3, библиографических ссылок 19.

Одним из условий разделения и очистки многих биологически активных веществ является применение таких сорбентов и носителей, которые обладают однородной и сравнительно инертной поверхностью. Известно, что силанольные группы на поверхности кремнеземных сорбентов и носителей являются причиной так называемого «силанольного взаимодействия» [1-4]. Именно на таких группах происходит необратимая сорбция различных веществ [4-6]. Указанный недостаток кремнеземных матриц может быть устранен модифицированием их поверхности различными полимерами [7]. Наличие жёсткой кремнеземной матрицы позволяет использовать такие системы в режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Связанные белковые фазы широко используются для анализа биологически активных веществ. В частности, иммобилизованные бычий сывороточный альбумин (БСА) [8] и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) используются для разделения оптических изомеров аминокислот и ряда лекарственных препаратов [9]. Несмотря на то, что все белки оптически активны, лишь некоторые из них характеризуются стереоселективностью по отношению к различным объектам [10-13].

Анализ биологически активных соединений, взятых из различных биологических жидкостей (моча, кровь), лекарственных средств и др. в режиме ВЭЖХ,

сопряжен с проблемами, связанными с эксплуатацией хроматографических колонок. В настоящее время для увеличения продолжительности эксплуатации (времени жизни – life time) колонок используют так называемые «среды ограниченного доступа» (restricted access media – RAM). Последние призваны предотвращать проникновение в хроматографическую колонку, в первую очередь, белковых молекул [14-17]. БСА, иммобилизованный на силикагеле с C_{18} -группами, также может служить RAM-системой [18].

Уэстон и Аврамес [19] разработали метод прямого связывания аффинных лигандов полиакриламидными гелями с помощью глутарового альдегида, который, находясь в избытке одной из своих альдегидных групп, реагирует со свободными амидными группами полиакриламидного геля. Остающаяся свободной вторая альдегидная группа затем реагирует с аминогруппой аффинного лиганда, вводимого в процессе последующей реакции связывания. Таким образом, обеспечивается прочная связь между носителем и аффинным лигандом.

Целью настоящей работы является изучение вопросов иммобилизации непосредственно в хроматографической колонке, заполненной гибридным полимерно-минеральным сорбентом из силикагеля и полиакриламидного геля (ПААГ).

Экспериментальная часть

В качестве матрицы для иммобилизации БСА использовали широкопористые силикагели (размер частиц 7,5 мкм, удельная поверхность $S_{уд.} = 80 \text{ м}^2/\text{г}$, средний диаметр пор 50 нм и сорбционный объем пор 1,0 $\text{см}^3/\text{г}$), полученные на основе микросферического силикагеля (МС) собственного приготовления (пористые характеристики: $d_{ср.} = 10 \text{ нм}$, $S_{уд.} = 240 \text{ м}^2/\text{г}$, $V_s = 1,0 \text{ см}^3/\text{г}$) путем гидротермальной обработки (ГО) при pH 8,0, $T = 200^\circ\text{C}$ в течение 4 ч.

Нанесение ПААГ на поверхность МС. Модификация поверхности силикагеля проведена с помощью полиакриламида. Полимерный слой был сформирован на поверхности частиц в водной среде, содержащей акриламид (соотношение акриламид : N,N'-бисакриламид = 10:1 по массе), в присутствии персульфата аммония (5,0 масс. % от общей массы мономеров) в качестве инициатора полимеризации и активатора – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (TEMED) при комнатной температуре. Количество нанесенного на поверхность полиакриламидного геля определяли гравиметрически по разности масс сорбента до и после выжигания полимера. Содержание нанесенного полимерного геля составляло 17,5% от массы силикагеля.

Упаковка и тестирование хроматографической колонки. Упаковку хроматографической колонки размером 150 x 4,6 мм осуществляли из водной суспензии полученного сорбента на специальном упаковочном стенде

(производство фирмы Alltech, USA). Хроматографические исследования проводили с использованием жидкостного хроматографа фирмы «Waters».

Тестирование колонки проводили пиридинсодержащей тестовой смесью. Пик пиридина выходит практически с мертвым объемом, и это свидетельствует об отсутствии силанольных групп на поверхности, поскольку в противном случае из-за химического взаимодействия с силанольными группами пик пиридина будет задерживаться.

Активация поверхности полимерной составляющей сорбента глутаровым альдегидом. Для активации поверхности полимерно-минерального сорбента глутаровым альдегидом использована методика, изложенная в [5]. Процесс проводили непосредственно в хроматографической колонке. Для этого в течение 3-4 ч со скоростью 1 мл/мин через колонку осуществляли циркуляцию 50 мл 25% (рН 7,0) водного раствора глутарового альдегида. Далее колонку промывали дистиллированной водой, после чего – 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,0) для удаления глутарового альдегида, не связанного с поверхностью матрицы. Ход промывки контролировали хроматографически. Объем израсходованного фосфатного буфера составлял 10 колоночных объемов.

Пористые характеристики сорбентов определяли методом Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) на приборе «Accusorb 2300E (USA)». В качестве адсорбата использовали азот.

Сорбция БСА на поверхности сорбента. Сорбцию БСА на поверхности активированных кремнеземно-полимерных матриц проводили непосредственно в хроматографической колонке.

Иммобилизация БСА в колонке имеет следующие преимущества: быстротечность процесса (весь процесс посадки белка осуществляется в течение 30-40 мин); одновременно в колонке производится промывка сорбента; существенно уменьшается расход требуемых для иммобилизации реагентов.

Раствор БСА в калий-фосфатном буфере (0,1 М; рН 7,0) прокачивали через колонку со скоростью 1 мл/мин. На выходе из колонки непрерывно отбирали пробы (по 2,0 мл) для контроля содержания БСА.

Поскольку внеколоночный объем составлял примерно 2,0 мл, то первую порцию вытекающего раствора не анализировали. После пропускания заданного количества раствора белка колонку промывали тем же буфером для удаления физически адсорбированного, химически не связанного с поверхностью матрицы белка.

На рис. 1 представлены изотермы адсорбции (ИА) азота на поверхности широкопористого силикагеля (кр. 1), силикагеля, модифицированного ПААГ (кр. 2), и сорбента с полимерным слоем ПААГ на поверхности полученной системы, активированным глутаровым альдегидом (кр. 3). Из рис. 1 следует, что после нанесения на поверхность силикагеля полимерного слоя из ПААГ и его активирования глутаровым альдегидом наблюдается уширение петли гистерезиса ИА в сторону и больших, и малых значений P/P_s по сравнению с исходным силикагелем. Уширение петли гистерезиса в сторону меньших

значений P/P_s , по всей видимости, – результат образования новых более мелких пор, не характерных для исходного МС. Это свидетельствует о том, что полимерный слой на поверхности имеет собственную пористость.

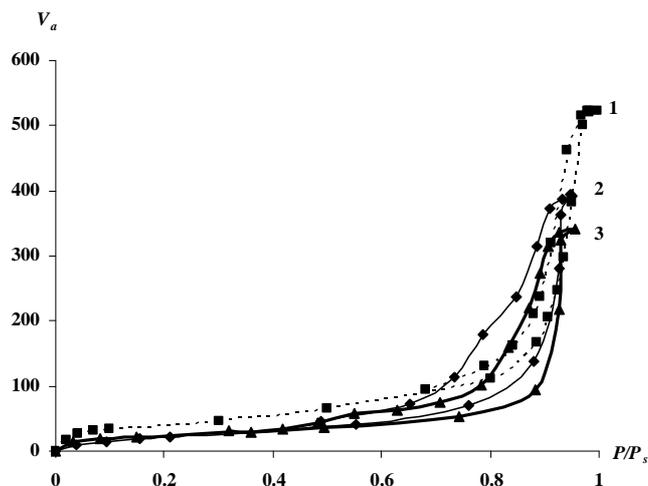


Рис. 1. Изотермы адсорбции азота на поверхности широкопористого силикагеля (1), силикагеля, модифицированного ПААГ (2), и сорбента с полимерным слоем из ПААГ, активированным глутаровым альдегидом (3).

После активирования поверхности ПААГ глутаровым альдегидом наблюдается некоторое сужение петли гистерезиса, что можно объяснить сшиванием отдельных полимерных цепочек на поверхности полимерного покрытия. Определение толщины полимерного покрытия из кривых десорбции (для определения распределения пор по размерам и среднего диаметра пор используется кривая десорбции ИА) некорректно, поскольку кривые десорбции образцов с полимерным покрытием из ПААГ до и после активирования глутаровым альдегидом сильно отличаются.

После промывки и уравнивания колонки в нее со скоростью 1 мл/мин подавали растворы БСА двух различных концентраций: 6,3 и 4,8 мг/мл.

На рис. 2 представлена зависимость концентрации белкового раствора от объема раствора белка, нанесенного на хроматографическую колонку. Исходные концентрации растворов БСА показаны горизонтальными линиями. Для построения этой зависимости сначала строили градуировочную кривую. В пределах указанных концентраций (4,8 и 6,3 мг/мл) белка наблюдается линейная зависимость концентрации белка от высоты пика. На основе раствора с концентрацией 6,3 мг/мл разбавлением был приготовлен ряд белковых растворов с определенными концентрациями и получены пики в УФ области (280 нм). При этом насос напрямую соединяли с детектором и проводили ввод указанных растворов (по 10 мкл) в инжектор хроматографической системы. Для каждого образца проводили по три параллельных измерения, определяя среднюю высоту пиков. Изменения концентрации белка в растворах, выходящих из колонки, и в промывных элюентах были определены с помощью

градуировочной кривой. Как следует из представленных на рис. 2 кр. 1 и 2, после подачи 32 мл раствора БСА наблюдается насыщение активированной матрицы белком, а концентрация белка в вытекающем растворе стремится к исходной концентрации подаваемых растворов. С этого момента подачу белкового раствора прекращали, а вместо него с той же скоростью подавали фосфатный буфер (с концентрацией 50 мМ) для удаления с поверхности сорбента белка, не связанного с ней. Промывку продолжали до установления равновесного состояния, при котором концентрация БСА стремится к нулю.

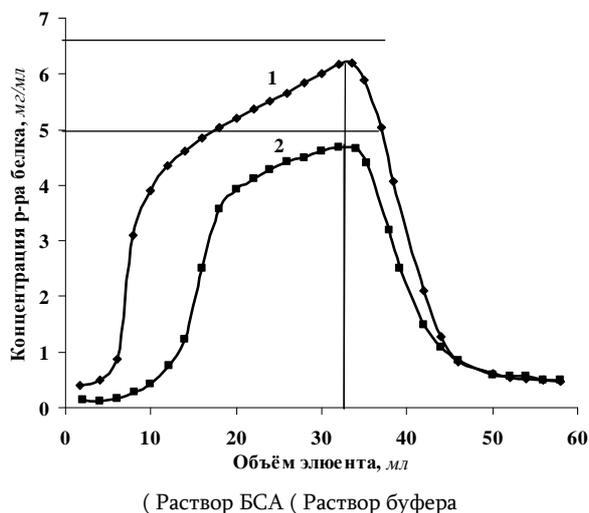
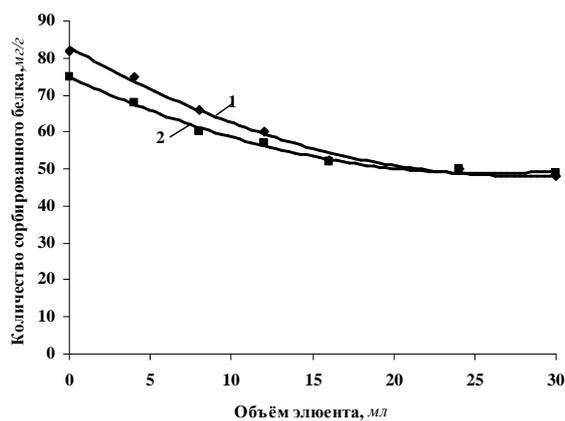
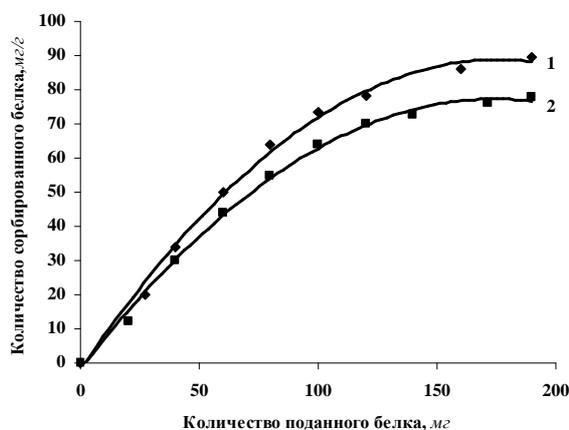


Рис. 2. Концентрация БСА на выходе из колонки в зависимости от объемов поданного раствора БСА и промывного раствора буфера.

Из рис. 2. следует также, что при использовании белкового раствора со сравнительно низкой концентрацией (4,8 мг/мл) практически первые порции подаваемого белка адсорбируются, и если процесс насыщения сорбента белком при использовании белкового раствора со сравнительно большей концентрацией (6,3 мг/мл) начинается уже после подачи 6,0 мл указанного раствора (кр. 1), то в первом случае процесс насыщения начинается после подачи 12,0 мл раствора. При использовании концентрированных растворов кривая насыщения не начинается с нуля, и избыток белка выходит из колонки в виде раствора с концентрацией 0,5 мг/мл. При использовании раствора с меньшим содержанием белка насыщение сорбента белком начинается практически с нулевого значения.



а



б

Рис. 3. а – Количество сорбированного в колонке белка в зависимости от количества поданного белка и объема промывного раствора: 1) 6,7 мг/мл БСА; 2) 5,0 мг/мл БСА, б – Количество сорбированного в колонке белка (на 1,0 г сорбента) в зависимости от количества поданного белка и объема промывного раствора: 1) 6,3 мг/мл БСА; 2) 4,8 мг/мл БСА.

Кривые, представленные на рис. 3, дают более наглядную картину процесса иммобилизации БСА на поверхности полученного полимерно-минерального сорбента. По мере увеличения количества поданного в колонку белка происходит постепенное насыщение колонки (сорбента) белком. После промывки колонок фосфатным буфером наблюдается снижение содержания белка до некоторого равновесного значения, соответствующего 47-49 мг БСА на 1,0 г сорбента. Очевидно, это количество белка ковалентно связано с поверхностью активированного сорбента. Таким образом, показана возможность нанесения полимерного слоя полиакриламидного геля на поверхность широкопористого микросферического силикагеля, в результате чего удастся блокировать все силанольные группы, вследствие чего связывание белковых

систем осуществляется только за счет активированного глутаровым альдегидом полиакриламидного геля.

Показана возможность ковалентного связывания БСА на поверхности полученного полимерно-минерального сорбента, активированного глутаровым альдегидом, непосредственно в хроматографической колонке, из чего можно сделать заключение о целесообразности создания новых РАМ-систем на основе такого сорбента.

ՑԼԻ ՇԻՃՈՒԿԻ ԱԼԲՈՒՄԻՆԻ ԻՍՈՔԻԼԱՑՈՒՄԸ ՊՈԼԻՄԵՐՈՎ ՍՈՐԲԵՆՏԻ ՍՈՐԲԵՆՏԻ ՎՐԱ

Լ. Գ. ՄԱՆԳԱՍԱՐՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է ցլի շիճուկի ալբումինի իմոբիլացումը գլուտարային ալդեհիդով ակտիվացված լայնածակոտկեն սիլիկաժելի և պոլիակրիլամիդային ժելի հիման վրա ստացված հիբրիդային հանքապոլիմերային սորբենտի մակերևույթին: Սորբենտի ակտիվացումը գլուտարային ալդեհիդով և սպիտակուցի իմոբիլացումը իրականացվել են անմիջականորեն քրոմատոգրաֆիական աշտարակում: Ցույց է տրվել, որ պոլիակրիլամիդային ժելի նստեցմամբ հնարավոր է ակտիվացված սիլանոլային խմբերի էկրանացումը, այսինքն սպիտակուցային համակարգի իմոբիլացումը տեղի է ունենում միայն գլուտարային ալդեհիդով պոլիակրիլամիդային ժելի ակտիվացման հաշվին:

BOVINE SERUM ALBUMIN IMMOBILIZATION ON THE POLYMER-MODIFIED SORBENT

L. G. MANGASARYAN

An immobilization of the bovine serum albumin on the surface of the hybrid mineral-polymer sorbent obtained on the base of the wideporous silica and polyacrylamide gel and activated by means of the glutaric aldehyde has been studied. An activation of the sorbent by glutaric aldehyde and the immobilization of the albumin were realized immediately in the chromatographic column. It has been shown that it is possible to provide an efficient screening of silanol groups by means of the acrylamide gel deposition, i.e. the immobilization of the protein system takes place solely by means of the glutaric aldehyde owing to the polyacrylamide gel activation.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии / под ред. Г.В. Лисичкина М., Химия, 1986, 248 с.
- [2] *Majors R.E.* // LC-GC International, April, 1998, p.7.
- [3] *Majors R.E.* // LC-GC International, April, 1997, p.220.
- [4] Keystone Scientific Catalogue, 2000, 150 p.
- [5] *Туркова Я.* Аффинная хроматография. М., Мир, 1982, 471 с.
- [6] Аффинная хроматография. Методы. М., Мир, 1988, 278 с.
- [7] *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., Наука, 1985, 536 с.

- [8] *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.* // J. Chromatogr., 1983, v.264, p.63.
- [9] *Domenici E., Bertucci C., Salvadori P.* // Chromatographia, 1990, v.29, No.3/4, p.170.
- [10] *Yochio O., Ryo A.* // J. Liquid Chromatogr., 1987, v.10. p.1613.
- [11] *Wallwort D.M., Lee J.T.* Chiral bioanalysis. Chapt. 5, I.D. Wilson (Ed.), Bio-analytical Separations Handbook of Analytical Separations. v.4, Elsevier Sci., 2003,
- [12] *Andrisano V., Gotti R., Recenati M.* // J. Chromatogr. B, 2002, v.768, p.137.
- [13] *Fitos I., Visy J., Simoyi M.* J. Biochem. Biophys Methods, 2002, v.54, p.71.
- [14] *Keski-Hynnala H., Raanna K., Forsberg M.* // J. Chromatogr. B, 2001, v.759, p.227.
- [15] *Brunetto M.R., Morales A.R., Galignani M.* // Talanta, 2003, v.59, p.913.
- [16] *Brunetto M.R., Obando M.A., Fernandez A.* // Talanta, 2002, v.58, p.535.
- [17] *Schafer C., Lubda D.* // J. Chromatogr. A, 2001, v.909, p.73.
- [18] *Cass Q.B., Gomes R.F.* // J. Chromatogr. A, 2003, v.987, p.235.
- [19] *Waston D.D., Avrames S.* // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, v.45. p.1574.