

УДК 612.017.1.612.112.9

С. Г. Чаилян

Специфическая сорбция смеси полисахаридов на жестких матрицах

(Представлено академиком А.А.Галояном 26/II 2004)

Анализ нуклеиновых кислот [1,2], их фрагментов, определение содержания их предшественников и продуктов метаболизма в клеточных экстрактах позволяют в некоторых случаях выявить ряд генетически обусловленных заболеваний, таких как синдром Лех Нихана, дефицит ферментов аденозин-дезаминазы, нуклеозид-фосфорилазы [3]. Данные, полученные при анализе нуклеиновых кислот, используются при терапии раковых заболеваний [4,5].

В литературе широко представлены методы выделения нуклеиновых кислот, в которых в основном используются катион-обменные или слабо анион-обменные хроматографические материалы. Эти методы часто включают в себя требования тщательного подбора величины рН, вида противоиона и его концентрации, объема элюата и содержания в нем метанола, требования по учету влияния температуры на время удерживания, степени набухания сорбента в целях достижения приемлемой эффективности для разделения исследуемой пробы. Все это, однако, приводит к увеличению продолжительности времени анализа и низкой селективности разделения.

С появлением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) удалось удовлетворительно решить многие задачи, связанные с выделением и очисткой нуклеиновых кислот и их фрагментов из клеточных экстрактов. Однако анализ методом редупликации нуклеиновых кислот (PCR) крайне затруднен из-за наличия в пробах примесей биоорганических соединений, в частности полисахаридов. Обзор литературных данных привел нас к предположению, что крайне эффективным способом сорбции полисахаридов может быть использование системы ВЭЖХ с колонками на основе жестких матриц с афинным лигандом на поверхности [6,7].

Целью исследований является создание колонок систем ВЭЖХ для выделения нуклеиновых кислот, ферментов из биомассы в свободном от полисахаридов гомогенном виде, для экспресс-анализа методом PCR.

В экспериментах были применены классические методы выделения белковых экстрактов - обезжиривание, гомогенизация, фильтрация, центрифугирование, лиофилизация [8-10].

В работе использовали жидкостный хроматограф высокого давления LDC Analytical, насос Biotronic BT 8100, сканирующий детектор (190-360 нм) Spectromonitor SM5000 и рефрактометрический детектор фирмы Кнауер. Хроматограммы обрабатывали с применением программного обеспечения SM5000 [11,12]. Сорбентом для работы послужил силикагель с размером частиц 5-7 мкм, удельной поверхностью $200 \text{ м}^2/\text{г}$, суммарным объемом пор $1.2 \text{ см}^3/\text{г}$ и диаметром пор 100 \AA , модифицированный октадецилхлорсиланом; на его поверхности

был сорбирован лектин.

Метод получения и очистки лектина представляет собой модификацию способа, основанного на аффинной сорбции лектина завязей пшеницы на геле яичного белка (овогеле).

Приготовление овогеля. Яичный белок гомогенизируют и доводят до pH 5.0 с помощью 1 н уксусной кислоты. Образовавшийся осадок удаляют центрифугированием. К прозрачному раствору белка добавляют глютаровый альдегид до конечной концентрации 1% и раствор оставляют на 3-5 ч при комнатной температуре. За это время образуется опалесцирующий гель. Его тщательно размельчают в 1%-ном растворе NaCl и промывают на сите этим же раствором от избытка глютарового альдегида. Для блокирования остатков альдегидных групп гранулы геля заливают 1 М раствором трис (гидроксиламинометан)-а и оставляют на 12 ч при -4° С. Затем к смеси добавляют глицин до 2% и оставляют еще на 12 ч. После этого гель тщательно промывают 1%-ным раствором NaCl, размельчают и с помощью сит отбирают фракцию частиц размером 50-200 мкм. Для хранения гранулы заливают 1%-ным раствором NaCl, содержащим 3% фенола. Фенол дубит гель и способствует его меньшему набуханию в гипотонических или кислых растворах, используемых для элюирования лектина. Перед употреблением гель отмывают от фенола и уравнивают 10 мМ фосфатным буфером с pH 7.2, содержащим 0.15 М NaCl.

Очистка лектина. 1000 г завязей пшеницы, обезжиренных петролейным эфиром, заливают пятью объемами дистиллированной воды и смесь подкисляют 5 н HCl до pH 3.0. Экстракцию проводят при комнатной температуре в течение 1 ч при периодическом перемешивании. Полученную суспензию центрифугируют при 600 об/мин в течение 15 мин и отбирают надосадочную

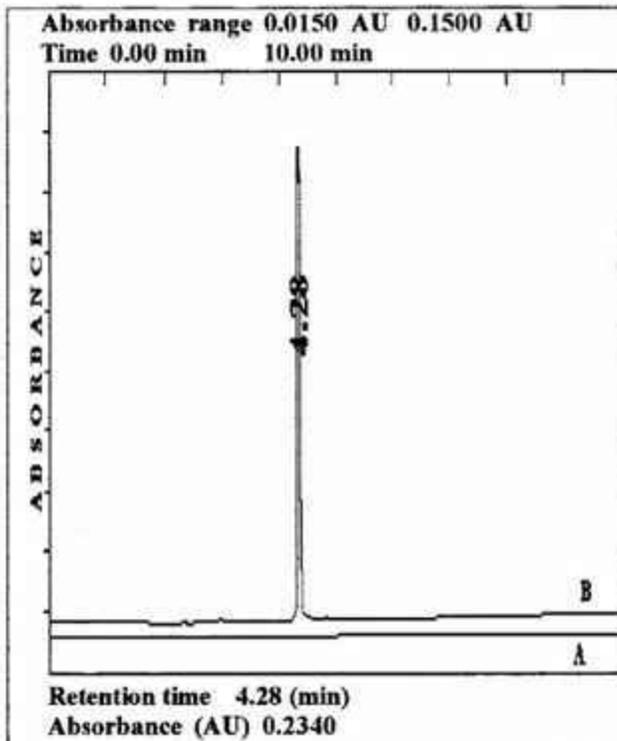


Рис.1

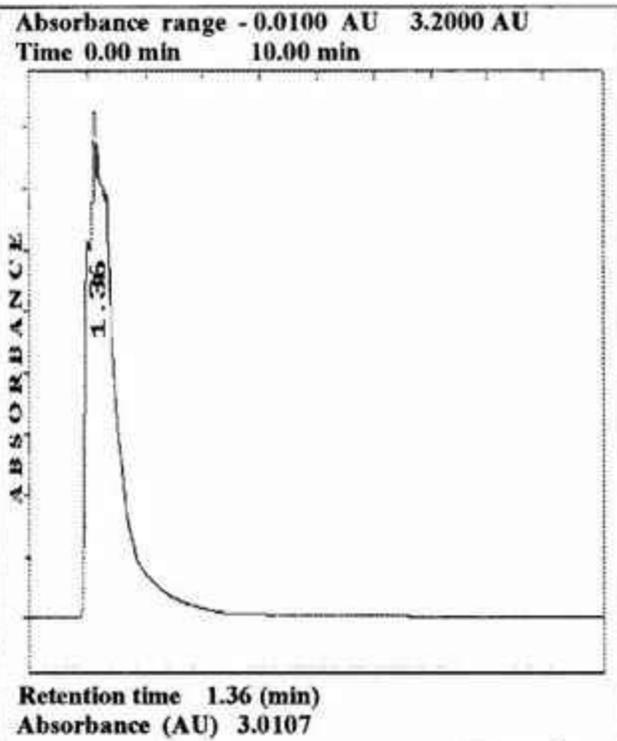


Рис.2

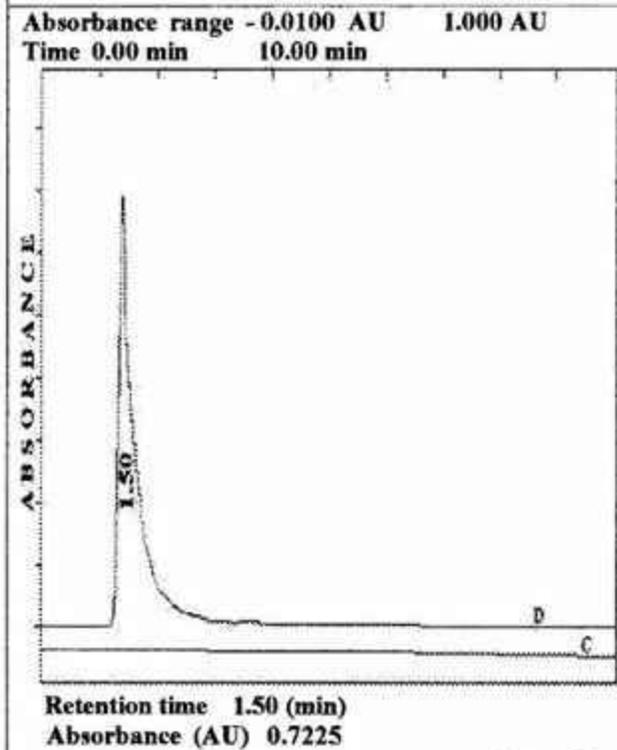


Рис.3

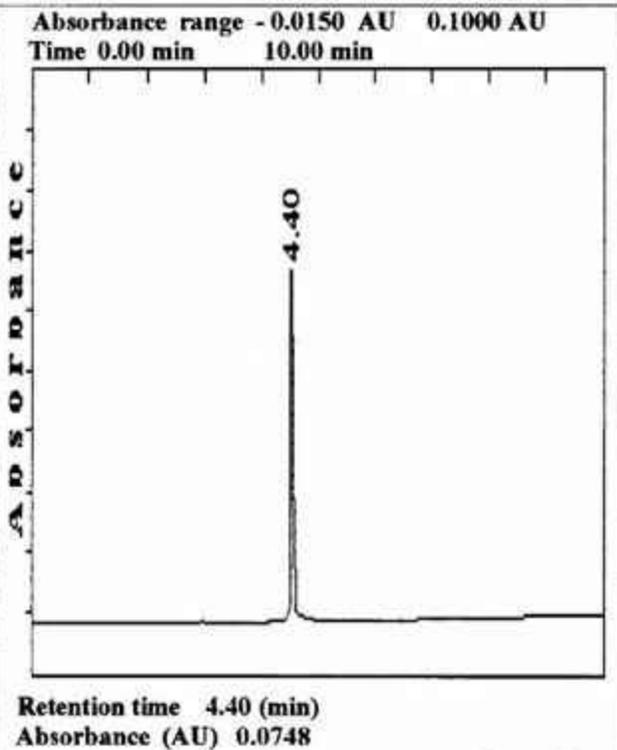


Рис.4

Рис.1. Хроматограммы: А - базовой линии после 2 ч стабилизации колонки Биосфер SI100 C₁₈ (250×4.6); элюент фосфатный буфер рН 6.8/ацетонитрил (90/10). Объемная скорость 1мл/мин; температура 25±1⁰С; обнаружение на UV при 200 нм; В - маточного раствора смеси полисахаридов на колонке Биосфер SI100 C₁₈ (250×4.6); элюент

фосфатный буфер рН 6.8/ацетонитрил (90/10). Объемная скорость 1мл/мин; температура $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; обнаружение на UV при 200 нм.

Рис.2. Хроматограмма маточного раствора лектина на колонке Биосфер SI100 C_{18} (250×4.6); элюент фосфатный буфер рН 6.8/ацетонитрил (90/10). Объемная скорость 1мл/мин; температура $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; обнаружение на UV при 280 нм.

Рис.3. Хроматограммы: D - маточного раствора лектина после 12 часов непрерывного прохождения через колонку Биосфер SI100 C_{18} (250×4.6); элюент фосфатный буфер рН 6.8/ацетонитрил (90/10). Объемная скорость 1мл/мин; температура $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; обнаружение на UV при 280 нм; С - базовой линии после 4 ч промывки колонки Биосфер SI100 C_{18} (250×4.6); элюент фосфатный буфер рН 6.8/ацетонитрил (90/10). Объемная скорость 1мл/мин; температура $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; обнаружение на UV при 280 нм.

Рис.4. Хроматограмма маточного раствора смеси полисахаридов после иммобилизации лектина на поверхности колонки Биосфер SI100 C_{18} (250×4.6); элюент фосфатный буфер рН 6.8/ацетонитрил (90/10); объемная скорость 1мл/мин; температура $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; обнаружение на UV при 200 нм.

жидкость. Осадок повторно суспендируют в 2500 мл, подкисляют до рН 3.0 и проводят дополнительную экстракцию в течение 30 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость объединяют с полученной ранее, нейтрализуют до рН 6.5-6.8 с помощью 10%-ного NaOH и образующийся осадок удаляют центрифугированием. Полученный прозрачный экстракт пропускают через колонку, заполненную овогелем и уравновешенную 0.05 М К-фосфатным буфером с рН 6.8 в течение 48 ч при 4°C . Объем колонки выбирают из расчета 100 мл на 1 г лектина (1 кг исходного сырья соответственно). После пропускания всего экстракта колонку промывают 3-4 объемами 0.05 М К-фосфатного буфера рН 6.8.

Адсорбированный лектин элюируют 1%-ной уксусной кислотой при комнатной температуре. В элюате определяли концентрацию белка (A_{280}) и титр гемагглютинации. Пик, соответствующий лектину, отбирали, а фракции с низким содержанием лектина (менее 0.5%) отбрасывали. Отобранный элюат нейтрализовали до рН 5.7 и оставляли для кристаллизации при комнатной температуре. Обычно кристаллы появляются через 1-2 ч. После появления кристаллов маточный раствор желтоватого цвета выдерживали 24 ч при 4°C . Кристаллы собирали, центрифугированием при 200-400 об/мин. Для возможно более полного удаления пигментов кристаллизацию проводили два раза. Далее выделенный лектин быстро замораживали, проводили леофильную сушку. Использованный метод существенно упрощает процесс получения лектина [12] и улучшает качество продукта.

При электрофорезе в 7.5%-ном полиакриламидном геле при рН 8.3 полученный препарат был представлен двумя полосами с содержанием основного вещества 90%. Полученный лектин агглютинировал эритроциты человека в титре 1:4096 независимо от группы крови. N-ацетил-D-глюкозамин угнетал активность лектина в минимальной концентрации 5.5 мг/мл. Для растворения препарата его навеску необходимо суспендировать в воде, подкислить в 0.1 н HCl до полного растворения белка, а затем быстро перевести в 0.05 М К-фосфатный буфер с рН 6.8. Для изучения сорбционных свойств лектина использовали водный раствор полисахаридов фирмы Aldrich с молекулярными весами 500, 5000, 30000 и 100000 в концентрации по 6 г каждого на 100 мл раствора, что составило 24 г /100 мл (стандартный раствор).

Проведены сравнительные исследования специфической сорбции полисахаридов на

полученной нами колонке. Эксперименты проводили в системе ВЭЖХ на колонке Биосфер Si100 C₁₈ (250×4.6 мм) при температуре 25±1⁰С. Колонка содержала 3.1 г сорбента. Колонку с силикагелем, модифицированным октадецилхлорсиланом, стабилизировали 0.05 М К-фосфатным буфером, рН 6.8/ацетонитрил (90/10), при скорости потока жидкости 1 мл/мин в течение 2 ч. Отклонение нулевой линии не превысило 0.01%, что свидетельствовало о равновесии системы. После чего на колонку наносили 50 мкл стандартного раствора смеси полисахаридов. Элюирование проводили 0.5 М К-фосфатным буфером, рН 6.8/ацетонитрил (90/10), при скорости потока жидкости 1 мл/мин. Выход пика фиксировали на UV детекторе SM5000 при длине волны 200 нм и рефрактометре фирмы Кнауер. Высота полученного хроматографического пика поглощения составила 0.2340 AU и для дальнейших расчетов была принята за единицу (рис.1). Лектин в количестве 100 мг растворили в 300 мл воды. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 280 нм, и она оказалась равной 3.0107 AU (рис.2). Полученный раствор лектина прокачивался по замкнутому циклу в течение 12 ч со скоростью 1 мл/мин через колонку, модифицированную октадецилхлорсиланом и предварительно уравновешенную в течение 2 ч в системе 0.05 М К-фосфатный буфер, рН 6.8/ацетонитрил (90/10). По истечении 12 ч оптическая плотность элюата снизилась до величины 0.7225 AU, что свидетельствует о сорбции 24 мг лектина на 3.1 г модифицированного силикагеля (рис.3). Дальнейшая промывка колонки в течение 4 ч не обнаружила смыва сорбированного лектина с поверхности колонки. После промывки колонки в течение 3 ч стабилизировали 0.05 М К-фосфатным буфером при рН 6.8 со скоростью потока 1 мл/мин. Далее пробу вводили в количестве 50 мкл стандартного раствора полисахаридов. Элюацию проводили 0.5 М К-фосфатным буфером, рН 6.8/ацетонитрил (90/10), со скоростью 1 мл/мин. Мы наблюдали уменьшение величины пика поглощения стандартного раствора до значения 0.0748 AU. По сравнению с контролем она уменьшилась на 30%, что свидетельствует о сорбции полисахаридов на поверхности сорбента - силикагеля, модифицированного октадецилхлорсиланом и сорбированного лектином на поверхности (рис.4).

Силикагель с размером частиц 5-7 мкм, удельной поверхностью 200 м²/г, суммарным объемом пор 1.2 см³ /г и диаметром пор 100Å был модифицирован октадецилхлорсиланом; в качестве аффинного лиганда был использован лектин. Лектин был выделен по модифицированной методике из проростков пшеницы. Предложенный метод позволил выделить лектин в кристаллическом виде с содержанием основного вещества 90%. Эксперименты по хроматографии контрольного раствора полисахаридов на колонке с силикагелем, модифицированным октадецилхлорсиланом, и сорбированным лектином на его поверхности в системе ВЭЖХ показали, что предложенная система эффективна для очистки растворов от полисахаридов. Удельная емкость полученного сорбента по контрольному раствору смеси полисахаридов составила 4 мг на 1 г сорбента.

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыяна НАН РА

Литература

1. *Hernanto A. R.* - Thesis. 1983. Tübingen University.
2. *Chakhmakcheva O. G., Efimov V. A., Ovchinnikov Yu. A.* - Nucleic Acids Symp. 1980. N 7. P 345.
3. *Boumahraz M., Davydov V. Ya., Kiselev A. V.* - J. Chromatographia. 1982. V. 15. P. 751.
4. *Yang M. T., Milligan L. P., Mathison G. W.* - J. Chromatographia. 1981. V. 209. P. 316-321.
5. *Orth P., Engelhardt H.* - Chromatographia. 1982. V. 15. P. 9-11.
6. *Hjebre A., Antonopoulos C. A., Classon B., Engfeldt B.* - J. Chromatographia. 1980. V. 202. P. 453-460.
7. *Kuo J. C., Yeung E. S.* - J. Chromatographia. 1981. V. 223. P. 321-323.
8. *Kainuma K., Nakakuki T., Ogawa T.* - J. Chromatographia. 1981. V. 212. P. 126-129.
9. *Daniel P. F., Lott I. T., McCluer R. H.*, In: Hawk G. L. (Ed.): Biological/ Biomedical Applications of Liquid Chromatography. Marcel Dekker. Inc. New York. 1981. P. 363.
10. *Hernanto A. R., Voelter W., Bauer H.*, In: Proceeding XIth International Carbohydrate Symposium. Vancouver. Canada. 1982.
11. *Geigert J., Hirano D. S., Neidleman S. L.* - J. Chromatographia. 1981. V. 206. P. 396-405.
12. *Луцик М.Д.* - Укр.хим.журн. 1984. Т. 56. N 4. С. 432-434.

Ա.Գ. Չափյան

Պոլիսախարիդների խառնուրդի սպեցիֆիկ սորբցիան կոշտ մատրիցաների վրա

Ստացված քրոմատագրման աշտարակը թույլ է տալիս անց կացնել կենսազանգվածի մաքրում պոլիսախարիդներից: Աշտարակը լցված է սիլիկագելով որը մոդիֆիկացված է օկտադեցիլքլորսիանով (մասնիկների չափսերը 5-7 μ կ, ծակոտիների ընդհանուր ծավալը կազմում է 1.2 սմ³/գ, տեսակարար մակերեսը՝ 200 մ²/գ, ծակոտիների միջին տրամագիծը՝ 100Å): Լեկտինի կապումը 100 մգ/300 մլ լուծույթի հաշվարկով ավելացման դեպքում կազմեց 4 մգ/գ սորբենտ:

Մակերեսի վրա պոլիսախարիդների սորբցիան կազմում է մոտավորապես 30%: