

Введение.

Принцип хроматографии, разработанный в 1903 г. русским ученым М. С. Цветом, основан на способности пигментов (или любых других окрашенных и неокрашенных веществ) специфически адсорбироваться на адсорбенте, заключенном в колонке.

В результате происходит разделение анализируемых веществ и их концентрирование в строго определенном слое адсорбента. Затем через колонку пропускают подходящие элюенты, которые ослабляют силы адсорбции и выносят с током раствора индивидуальные вещества. Последние последовательно собирают в коллекторе фракций (принцип сорбции-десорбции).

Чрезвычайно эффективным средством фракционирования белков из смеси оказалась колоночная хроматография с гидроксилapatитом, различными ионообменными смолами и производными целлюлозы в качестве носителей. При выделении и очистке белков используют четыре основных типа хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную и аффинную (хроматография по сродству) – в соответствии с разными физическими и химическими механизмами, лежащими в основе каждого из них. Хроматография широко применяется не только для выделения белков, но и для разделения множества других органических и неорганических веществ, входящих в состав живых организмов.

По своему существу аффинная хроматография – это особый тип адсорбционной хроматографии. А она суть есть следующее: неподвижная фаза представлена твердой поверхностью снаружи и внутри гранул сорбента – в их порах. В отличие же от таковой адсорбция здесь осуществляется за счет биоспецифического взаимодействия между молекулами, закрепленными на матрице, т.е. связанными в неподвижной фазе, и комплементарными к ним молекулами, подлежащими очистке или фракционированию, поступающими, а затем элюируемыми с подвижной фазой. Биоспецифическое взаимодействие отличается исключительной избирательностью, а зачастую и очень высокой степенью сродства между партнерами. Оно лежит в основе множества строго детерминированных процессов, протекающих в организме. В качестве примеров можно назвать взаимодействия между ферментами и их субстратами, кофакторами или ингибиторами, между гормонами и их рецепторами, между антигенами и специфическими для них антителами, между нуклеиновыми кислотами и специфическими белками, связывающимися с ними в процессе осуществления своих функций (полимеразами, нуклеазами, гистонами, регуляторными белками), а также между самими нуклеиновыми кислотами-матрицами и продуктами их транскрипции.

Любой из компонентов названных и им подобных биоспецифических пар можно надежно закрепить на матрице в качестве так называемого «лиганда». С его помощью второй партнер пары может быть извлечен из смеси другими, не комплементарными лиганду веществами и временно задержан на матрице в составе биоспецифического (аффинного) комплекса. Иногда это может быть не одно, а несколько родственных или схожих по своей структуре веществ, «узнающих» один и тот же

лиганд, например изоферменты или ряд ферментов, использующих один и тот же кофермент, различные виды антител к одному и тому же антигену и т.д.

После удаления посторонних примесей промывкой состав элюента можно изменить таким образом, чтобы ослабить силу всех биоспецифических взаимодействий. Равновесия адсорбции, первоначально очень сильно сдвинутых в сторону образования комплексов, могут измениться таким образом, что фракционируемые вещества начинают мигрировать по колонке с различной скоростью, что характерно для процесса динамической хроматографии. В случае варианта аффинной очистки одного вещества, избирательно сорбированного на матрице с закрепленным на ней специфическим лигандом, – нарушается биоспецифическая связь лиганда с веществом, что позволяет быстро вывести последнее из колонки или легко отмыть его с матрицы на фильтре, если аффинную очистку ведут в свободном растворе.

Аффинную связь вещества с сорбентом можно нарушить либо:

1. непосредственно, путем создания неблагоприятных для биоспецифического взаимодействия условий;
2. путем конкурентной аффинной элюции.

Биоспецифическое взаимодействие реализуется за счет тех же сил связи между молекулами: электростатического притяжения разноименно заряженных групп, водородных и ван-дер-ваальсовых сил, гидрофобного взаимодействия. Биоспецифичность определяется конформационным соответствием участков связывания, что приводит к суммированию различных взаимодействий, осуществляющихся одновременно в нескольких точках.

1. ослабление биоспецифических сил связи может быть достигнуто обычными приемами: изменением рН, увеличением ионной силы и температуры элюента, введением в его состав органических растворителей. К такому же эффекту могут приводить воздействия денатурирующих веществ, нарушающих само конформационное соответствие.

Высокая степень аффинного сродства в некоторых случаях может быть нарушена только путем использования столь жестких воздействий, что они могут привести к денатурации очищаемого вещества. Избежать этого можно используя

2. конкурентный вариант элюции. В том случае в состав элюента вводят растворенный лиганд, тоже обладающим биоспецифическим сродством к веществу (аффинная элюция). Им может быть точно такой лиганд, какой иммобилизован на матрице, или другой, например ингибитор фермента, в то время как с матрицей связан его кофактор или субстрат.
3. если же необходимо получить очищенное вещество, то задачу разрушения аффинного комплекса приходится решать уже в растворе, элюированном с сорбента (например лиганд с меньшей степенью сродства к веществу).

Из сказанного ясно, что главное преимущество аффинной хроматографии состоит в ее потенциально очень высокой избирательности, позволяющей извлекать из смеси биологических веществ компоненты, представленные в ничтожно малых относительных количествах, т.е. возможности достигать в одной операции колоссальной (иной раз в несколько тысяч раз) очистки искомого биологически активного вещества. Также большим плюсом является то, что ввиду избирательности сорбции и очень высокого значения коэффициента распределения сорбируемого

вещества (в пользу матрицы) есть возможность использовать большие объемы исходных препаратов и в ходе ступенчатой элюции осуществлять их эффективное концентрирование. А способ связывания биологически активного лиганда с матрицей обязан не только обеспечивать сохранение его активности, но и не создавать стерических препятствий для взаимодействия сорбируемого вещества с лигандом.

Хотя принцип аффинной хроматографии очень прост и нагляден, но необходимо разумно выбрать матрицу, найти способ щадящего и вместе с тем надежного и вполне определенного закрепления на ней соответствующего данной задаче лиганда. Во многих случаях эта задача решена или облегчена усилиями фирм, выпускающих аффинные сорбенты.

История вопроса

Макромолекулы, такие, как белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты, внутри своих индивидуальных групп отличаются по физико-химическим свойствам лишь незначительно; поэтому их выделение, основанное на различиях в этих свойствах, например, с помощью ионообменной хроматографии, гель-фильтрации или электрофореза сопряжено с известными трудностями и требует много времени. Вследствие этого в ходе выделения существенно падает их активность из-за денатурации, расщепления, ферментативного гидролиза и т. п. Одним из наиболее характерных свойств этих биологических макромолекул является их способность обратимо связывать другие вещества. Например, ферменты образуют комплексы с субстратами или ингибиторами, антитела – с антигенами (против которых получены), а нуклеиновые кислоты, такие, как информационная РНК, гибридизуются с комплементарными ДНК и т.д. Образование специфических диссоциирующих комплексов биологических макромолекул служит основой метода их очистки, известного как аффинная хроматография.

Однако термин «аффинная хроматография» вызывал много возражений. Делались попытки заменить его более точным: например, «биоспецифическая адсорбция» или «биоаффинная хроматография», в особенности, когда было найдено, что ряд сорбентов, в особенности такие, которые связываются с синтетическими ингибиторами своей гидрофобной углеводородной цепью, могут сорбировать макромолекулы в результате преимущественно гидрофобных взаимодействий. Использо-

ние комплексообразования биологических макромолекул, основанного на гидрофобных взаимодействиях, положило начало гидрофобной хроматографии. Однако во многих случаях провести четкую границу между биоспецифическим комплексом и комплексом, образующимся в результате действия неспецифических гидрофобных взаимодействий, не так просто, как могло бы показаться на первый взгляд.

Часто одно и то же вещество, привязанное к носителю, с одной группой макромолекул может образовывать биоспецифические комплексы, в то время как с другой оно может давать комплексы исключительно благодаря неспецифическим гидрофобным взаимодействиям, а в образовании связей с третьей группой макромолекул могут принимать участие оба типа взаимодействий. В качестве примера можно привести гексаметилендиамин. Это соединение, будучи привязанным к сефарозе, использовано Гендерсоном и др., а также Якубовским и Павелкевичем в качестве сорбента для гидрофобной хроматографии аминоксил-тРНК-синтетаз и L-гистидинолфосфат-амиотраксфераз. Торая и др. предложили его в качестве биоспецифического сорбента для аминоксидазы из *Aspergillus niger*, в то же время Восбек и др. выделяя с помощью того же сорбента аминоксипептидазы из *Streptomyces griseus*, не пришли к определенному заключению о типе связи, образующейся при специфической сорбции. Поэтому логически объяснимо, почему Якоби и Вильчек среди аффинных методов, т. е. методов биоспецифической сорбции, рассматривали не только аффинную хроматографию, но также гидрофобную хроматографию (Шальтиель), ковалентную хроматографию (Бламберг и Строминджер, Броклехурст и др.), аффинную элюцию (Хаар), аффинное изменение плотности (Баллах) и аффинный электрофорез (Хорейши и Коцоурек). Недавно термин «аффинная хроматография» был еще более расширен отнесением к нему металлохелатной аффинной хроматографии (Порат и др.) и матричной хроматографии, нашедшей применение при исследованиях взаимодействий на носителях со связанными олигонуклеотидами (Шотт и др.).

Из сказанного выше видно, что в настоящее время термин «аффинная хроматография» распространяется не только на методы, основанные на образовании комплексов в результате строго биоспецифических взаимодействий.

Напротив, этот термин стал настолько широким, что используется также и для обозначения метода выделения биологических макромолекул путем простой сорбции на специфическом сорбенте (который часто бывает даже одноразового употребления). По-видимому, этот термин не совсем точен, но сегодня он общепринят.

Идея методов разделения белков, основанная на сродстве молекул, которое обнаружено в биологических системах, известна несколько десятилетий (с тех пор, как стали привязывать ферменты к нерастворимым носителям). Нерастворимые гетерогенные катализаторы имеют определенные преимущества: легкость выделения из реакционной смеси, возможность осуществления непрерывного катализа и повышение стабильности ферментов. Тем не менее по ряду причин полного развития аффинная хроматография и связывание ферментов с нерастворимыми носителями достигли лишь в последние годы. Развитие обоих направлений началось с использования высокопористых гидрофильных носителей, главным образом агарозы, после разработки подходящих методов связывания (Аксеп и др., Порат и др.).

В основе принципа аффинной хроматографии лежит отличительная особенность биологически активных веществ образовывать стабильные, специфические и обратимые комплексы. Если иммобилизовать один из компонентов комплекса, то получится специфический сорбент для второго его компонента, при этом, разумеется, предполагается, что соблюдаются все условия, необходимые для образования этого комплекса. Связывающие участки иммобилизованных веществ должны сохранять хорошую стерическую доступность для второго участника комплекса даже после связывания с нерастворимым носителем и не должны деформироваться. Примерами первых специфических сорбентов, приготовленных путем ковалентного связывания с нерастворимым носителем, были иммобилизованные антигены (Кемпбелл и др.).

Методы, созданные для присоединения антигенов и антител к нерастворимым носителям, были сразу же применены для получения иммобилизованных ферментов. В то же время ранее предложенный азидный способ привязки ферментов к целлюлозе стал использоваться для приготовления иммуносорбентов.

Параллельное развитие обоих направлений, основанных на использовании

связывания биологически активных веществ с нерастворимыми носителями, наглядно демонстрируют названия первых обзорных статей: «Реакционноспособные полимеры и их использование для приготовления смол с антителами и ферментами» (Манеке), «Водонерастворимые производные ферментов, антигенов и антител» (Сильман и Качальский) и «Химия и использование производных целлюлозы для изучения биологических систем» (Великий и Витол). Оба направления продолжали развиваться параллельно и после открытия других более эффективных носителей и разработки методов связывания, позволяющих сохранять свойства иммобилизуемых веществ в растворе.

Такое параллельное развитие существенно способствовало созданию новой отрасли технологии — ферментной инженерии. Согласно Виньяру, последняя включает производство, выделение, очистку, иммобилизацию и использование ферментов в различного типа реакторах. Практическое использование ферментов стало возможным благодаря новейшим достижениям энзимологии, а именно: после выяснения структур и механизмов действия ряда ферментов, имеются большие возможности для практического применения иммобилизованных ферментов в анализе, медицине и промышленности. Упрощение процесса выделения ферментов с помощью аффинной хроматографии, по-видимому, может привести к получению недорогих ферментов в требуемых количествах.

Иммобилизация ферментов на подходящих носителях значительно расширяет сферы их применения, которые, кроме того, стали и экономически целесообразными. Исследование различных типов ферментативных реакторов создает условия для их практического применения.

Однако ферменты, связанные с нерастворимыми подложками, важны не только с практической точки зрения. Ферменты, присоединенные к нерастворимым подложкам, имеющим хорошо охарактеризованную поверхность, представляют собой простые модели для изучения влияния микроокружения на связывание субстрата, а также на общий ход катализа, что имеет несомненно и теоретический интерес. Поскольку большинство ферментов *in vivo* связаны с мембранами или находятся в виде каких-то других комплексов в естественном окружении, исследования в этом

направлении имеют особое значение.

Именно при изучении влияния микроокружения на специфические взаимодействия важную роль начинает играть метод аффинной хроматографии. Возможно, например, использовать колонку с иммобилизованным ингибитором и вытеснять специфически сорбируемый фермент растворами его ингибиторов в различных концентрациях. На основе объемов элюата могут быть рассчитаны константы диссоциации фермента как со связанным, так и с растворенным ингибитором. Если использовать тот же ингибитор для связывания на нерастворимой подложке и для элюирования специфически сорбированного фермента, то информацию о влиянии окружения на образование комплекса можно получить, основываясь на различиях, если таковые имеются, в величинах определяемых констант диссоциации. Поскольку специфические взаимодействия играют очень важную роль в большинстве процессов, протекающих в природе, разработка простого метода определения констант диссоциации комплексов несомненно имеет важное значение.

Аффинной хроматографии и связыванию ферментов с нерастворимыми носителями посвящено много обзорных статей.

Кроме того, вышли в свет труды симпозиума и два больших тома «Методы энзимологии»: «Аффинные методы» и «Иммобилизованные ферменты», а также две монографии по иммобилизованным ферментам и одна по аффинной хроматографии.

Аффинная хроматография (или, более точно, биоаффинная или биоспецифическая по сродству хроматография) основана на исключительной способности биологически активных веществ связывать специфически и обратимо другие вещества, называемые в общем случае лигандами или аффинными лигандами, или упрощенно аффинантами.

Если приготовить нерастворимый аффинант (обычно это делают путем ковалентной привязки к нерастворимой подложке) и раствор, содержащий биологически активные продукты, которые необходимо выделить, пропустить через колонку с этим аффинантом, то все соединения, которые в данных условиях эксперимента не обладают сродством к аффинанту, будут проходить не задерживаясь, а продукты, обнаруживающие сродство к нерастворимому аффинному лиганду, будут сорбиро-

ваться на колонке. Последние могут быть освобождены далее из комплекса с иммобилизованным лигандом, например, с помощью раствора растворимого аффинанта или путем изменения состава растворителя. Диссоциация комплекса часто может быть достигнута изменением рН, ионной силы или температуры либо с помощью специфических агентов, как это будет показано далее.

Согласно О'Карра и др., следует различать биоспецифическую десорбцию и небiosпецифическую десорбцию с помощью так называемых «деформирующих буферов», как показано схематически на рис. 1.

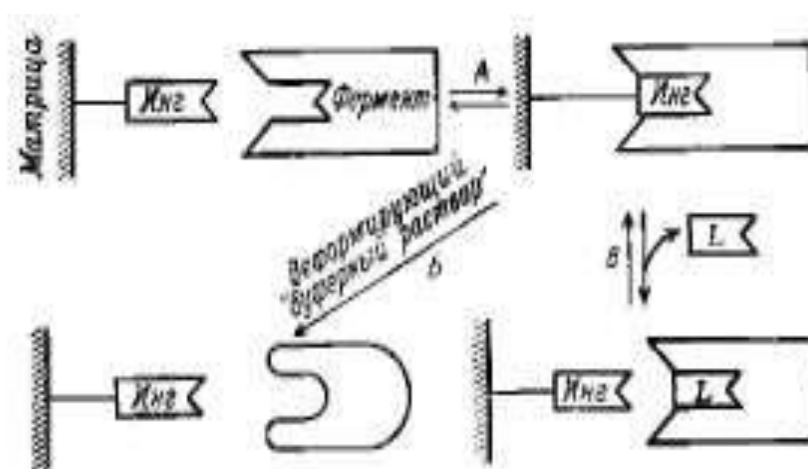


Рис.1. Схема биоспецифической адсорбции (А), элюирования «деформирующим» буферным раствором (Б) и биоспецифической элюции растворимым конкурентным лигандом (В).
Инг – иммобилизованный ингибитор; L – конкурентный лиганд

Аффинная хроматография как метод, по-видимому, впервые была применена Штаркенштайном в 1910 г. для выделения α -амилазы с помощью нерастворимого субстрата (крахмала). Кемпбелл и др. были, вероятно, первыми (1951 г.), в чьих работах этот принцип получил практическое приложение для выделения антител на колонке с целлюлозой с ковалентно присоединенным антигеном. Для выделения ферментов аффинная хроматография впервые была применена в 1953 г. Лерманом, который выделил тирозиназу на колонке с целлюлозой, эфирно связанной с остатками резорцина. В последующие годы аффинная хроматография использовалась весьма редко, что, очевидно, обусловлено свойствами известных в то время нерастворимых подложек, которые ограничивали возможности образования комплексов между выделяемыми продуктами и присоединенными аффинантами. На подложках

с гидрофобными или ионогенными группами часто наблюдалась неспецифическая сорбция.

Толчком к широкому развитию метода послужило открытие Поратом и сотр. присоединения аффинанта к агарозе, активированной бромцианом. Куатрскаяс и Аифинсек показали, что агароза (наиболее распространенная продажная форма сефарозы) обладает почти всеми характеристиками идеального носителя, В 1968 г. Куатреказас в др. успешно применили аффинную хроматографию для выделения нуклеазы, химотрипсина и карбоксипептидазы А и предложили термин «аффинная хроматография». Далее развитие метода шло в основном в направлении его применения для выделения ферментов, их ингибиторов, антител и антигенов, нуклеиновых кислот, транспортных и репрессорных белков, гормонов и их рецепторов и др.

Использование аффинной хроматографии тем не менее не ограничивается только выделением биологически активных веществ. Уже в 1960 г. Яги и др. описали определение небольших количеств антител с помощью нерастворимых носителей с привязанными антигенами. Имобилизованные олигомеры политимидиловой кислоты использовали Эдмондс и др. для количественного определения полиадениловой кислоты. Аффинная гель-фильтрация как микрометод при экспрессных определениях молекулярных масс дегидрогеназ основана на исключении последних из гелевой среды с варьируемым размером пор; метод описан Лоу и Дином. По своей сути аффинная хроматография — идеальным метод для изучения взаимодействий в биохимических процессах. Имобилизованная лейцил-тРНК-синтетаза использована как для выделения изолейцил-тРНК, так и для изучения взаимодействия белка с нуклеиновой кислотой. Взаимодействия пептидов с белками и нуклеотидов с аминокислотами и пептидами также изучены этим методом. Кроме того, метод применен для исследования механизмов ферментативных процессов и выяснения структур молекул. Аканума и сотр. применили его для изучения связывающего участка бычьей карбоксипептидазы В, исследуя комплексообразование с имобилизованы-ми субстратными аналогами основных и ароматических аминокислот. Используя аффинную хроматографию, Дилени и О'Карра показали, что оксалоацетат ингибирует лактатдегидрогеназу путем образования тройного непродуктивного комплекса с

комплексом фермент-NAD⁺, а не с комплексом фермент-NADH, как предполагалось первоначально. Аффинная хроматография оказалась весьма полезной при изучении кинетики активации трипсиногена. Молекулярная структура интерферонов фибробластов и лейкоцитов человека изучена с помощью аффинной хроматографии Янковским и др.

Для разделения изоферментов лактатдегидрогеназы Броделиус и Мосбах использовали сефарозу с присоединенными аналогами АМР; при элюировании растворами с возрастающей концентрацией NADH получены пять пиков изоферментов (рис. 2).

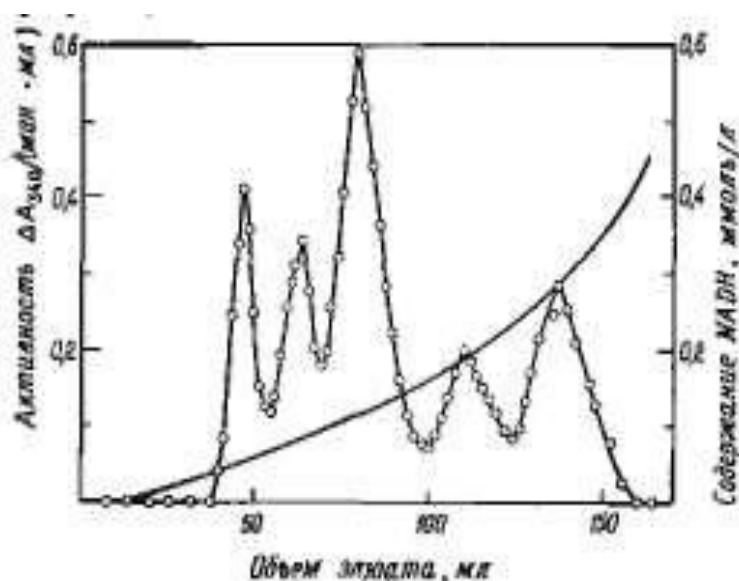


Рис.2. Элюирование изоферментов лактатдегидрогеназы вогнутым градиентом NADH.

Разделение достигается благодаря различиям в константах диссоциации $K_{\text{дисс}}$ двойного комплекса фермент — NADH. Позднее Броделиус и Мосбах аналогичным образом хроматографировали ряд лактатдегидрогеназ из различных источников, константы которых известны.

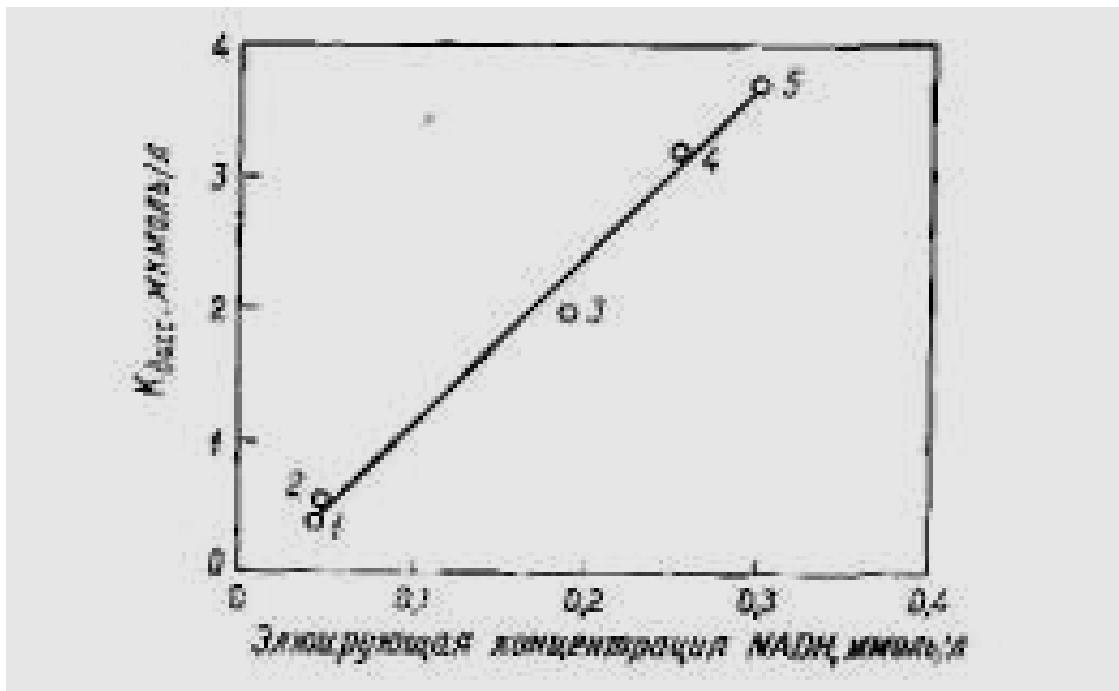


Рис.3. Зависимость константы диссоциации бинарных комплексов фермент-NADH.

Рис. 3 иллюстрирует прямую пропорциональность $K_{\text{дисс}}$ от элюирующей концентрации NADH. Линейность указывает, что в данном случае константы диссоциации комплексов фермент-NADH играют более важную роль, чем константы диссоциации комплексов фермента с иммобилизованным аффинным лигандом (AMP). Таким образом, появилась возможность определения констант диссоциации двойных комплексов фермента с NADH; метод основан на установлении элюирующих концентраций NADH. Не обнаружено различий в величинах $K_{\text{дисс}}$ при использовании как кристаллических, так и неочищенных препаратов ферментов. Другие белки, присутствующие в неочищенных препаратах, даже если они связывались колонкой, не влияли на картину элюирования. Это обстоятельство создает огромное преимущество таких определений по сравнению с обычными методами определения констант диссоциации, которые требуют не только чистых ферментов, но также и гомогенных изоферментов. Другим преимуществом является большая быстрота и расход очень небольших количеств фермента для каждого определения. Использование аффинной хроматографии для определения, например, констант ингибирования ферментов, по-видимому, весьма перспективно. Данные об объемах элюатов, содержащих фермент, на колонке с иммобилизованным ингибитором, полученные при использовании различных концентрация ингибитора в растворе, позволяют опреде-

лить константы ингибирования как для связанного ингибитора, так и для ингибитора в растворе. Большое преимущество этого метода состоит в том, что при использовании одного и того же ингибитора как для иммобилизации, так и для элюирования можно непосредственно сделать выводы о влиянии связей с носителем и природы носителя на изучаемое взаимодействие на основании совпадения или различий в определяемых величинах констант диссоциации. Следовательно, метод аффинной хроматографии открывает новые возможности не только для изучения взаимодействия биологически активных веществ, он перспективен также и для выяснения влияния микроокружения на образование этих комплексов.

Фазы аффинной хроматографии. Суть метода.

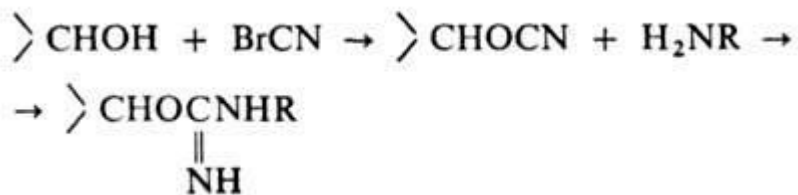
В аффинной хроматографии выделяют две фазы: подвижной фазой (элюентом) служит жидкость, неподвижной фазой может быть твердый сорбент. Главная особенность, которая обуславливает высокую эффективность этого метода, состоит в том, что разделение основано на различии не физико-химических признаков **молекулы** (заряда, формы и размера), а специфичности функциональных свойств, отличающих данный **фермент** от множества других **биополимеров**. Разделение в аффинной хроматографии обычно проводят на хроматографических колонках в две фазы (адсорбция и десорбция); иногда разделяемую смесь помещают в сосуд с сорбентом и выдерживают до полного связывания исследуемого компонента. Затем сорбент (в колонке или сосуде) промывают буферным раствором для удаления не связавшихся веществ, после чего десорбируют исследуемый компонент. Десорбция (элюция) последнего обычно достигается повышением ионной силы, изменением pH буферного р-ра или добавлением в него органического растворителя, что ослабляет взаимодействие лиганд - фермент. Более избирательна десорбция раствором лиганда.

Различают колоночную жидкостную хроматографию, в которой через колонку, заполненную неподвижной фазой, пропускают порцию разделяемой смеси веществ в потоке элюента (под давлением или под действием силы тяжести), и тонкослойную жидкостную хроматографию, в которой элюент перемещается под действием капиллярных сил по плоскому слою сорбента, нанесенного на стеклянную пластинку или металлическую фольгу, вдоль пористой полимерной пленки, по поверхности цилиндрической кварцевой или керамической палочки, по полоске хроматографической бумаги

Неподвижная фаза в аффинной хроматографии представляет собой специально получаемый сорбент, построенный обычно по схеме: носитель - соединяющее звено ("ножка") - специфический лиганд. Носителем служит чаще всего сефароза - производное агарозы, имеющее поперечные сшивки. Присоединение к ней лиганда или "ножки", содержащих, как правило, аминокгруппу, осуществляется после активации

сефарозы

бромцианом:



Содержание лиганда колеблется от 0,1 до 10 мкмоль на 1 г влажного сорбента. Сефароза, однако, малоустойчива к действию ряда химических веществ и микроорганизмов.

Основные требования к аффинной адсорбции

1. Лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало серьезных затруднений.
2. Удлиняющий мостик между матрицей и лигандом должен облегчать доступ белка к лиганду.
3. Неспецифическое взаимодействие не должно быть слишком сильным, чтобы сопутствующие белки не могли связаться с адсорбентом.
4. Связь лиганда с матрицей должна быть стабильна в условиях хроматографии и в процессе регенерации адсорбента.

Следует заметить, что аффинная адсорбционная хроматография является исключительным методом, если вся процедура уже тщательно отработана, однако создание необходимых адсорбентов может быть очень трудоемким процессом.

Более стабильны макропористые неорганические носители (кремнезем, или силикагель, стекло) и органические полимеры. Если лиганд присоединяется непосредственно к носителю, эффективность специфического взаимодействия с ферментом заметно снижается вследствие пространственных затруднений. "Ножка", как правило, устраняет стерические препятствия, отдаляя лиганд от носителя. Как и носитель, она должна быть инертной и не влиять на процессы в ходе аффинной хроматографии, чего, однако, не всегда удается достигнуть. Например, присоединение "ножки" по приведенной выше реакции приводит к образованию катионной группировки изомочевины, и сорбент приобретает свойства анионита. В качестве "ножки" используют обычно ди- и полиамины, ω -аминокислоты, пептиды, олигосахариды.

Лигандами могут служить такие субстраты как крахмал или гликоген, однако их превращение в ходе аффинной хроматографии, катализируемое разделяемым ферментом, постоянно изменяет свойства сорбента. Поэтому, как правило, применяют аналоги субстратов, устойчивые к дальнейшему превращению, т.е. ингибиторы ферментов. Так, для выделения протеиназ используют не расщепляемые ими пептиды D-аминокислот. Эффективны также природные ингибиторы ферментов, например, пепстатин - ингибитор аспартильных протеиназ. Иногда применяют лиганды, связывающие большие группы родственных ферментов (в частности, киназы и дегидрогеназы). Примеры таких "группоспецифических" лигандов - антрахиноновые красители, аналоги никотинамидаденин-динуклеотида. Известны лиганды (например, производные фенилборной кислоты), имитирующие при взаимодействии с

ферментом структуру переходного комплекса с субстратом. Такие лиганды эффективны при выделении сериновых гидролаз.

Подвижная фаза аффинной хроматографии должна элюировать анализируемые соединения с оптимальными значениями k' , обладать низкой вязкостью, обеспечивать необходимый уровень селективности, быть дешевой, нетоксичной, инертной, совместимой с методами детектирования (например, с УФ-детектором нельзя использовать в качестве элюента бензол). Обычно используют углеводороды (гексан, гептан, изооктан, циклогексан) с добавлением небольших количеств CHCl_3 , $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$, диизопропилового эфира. Если компоненты разделяемой смеси имеют близкие значения k' , хроматографируют одним элюентом (изократический режим), если отдельные компоненты смеси сильно удерживаются сорбентом, используют серию элюентов возрастающей силы (ступенчатое или непрерывное градиентное элюирование).

Аффинная хроматография представляет собой один из наиболее специфических методов выделения реакционноспособных соединений, в частности, ферментов, и даже таких надмолекулярных агрегатов, как вирусы. Разделение биологически активных веществ в этом варианте хроматографии основано на их специфическом взаимодействии с лигандами, ковалентно связанными с нерастворимым носителем (матрицей). Сорбентом в этом случае служит гель типа агарозы, к которому ковалентно присоединен подходящий лиганд, например субстрат фермента. Когда раствор, содержащий выделяемое вещество (скажем, фермент), пропускают через колонку с соответствующим образом приготовленным сорбентом, взаимодействие этого вещества с закрепленным на сорбенте лигандом (в данном случае фермента с его субстратом) приводит к его удерживанию и, следовательно, к концентрированию. Поскольку сорбция носит обратный характер, это вещество можно затем элюировать с колонки. Разделение по методу аффинной хроматографии может быть основано на различного рода специфических взаимодействиях, таких как связывание фермента с ингибитором, гормона с рецептором, антигена с антителом, а также гибридизация полинуклеотидов. Этот метод позволяет выделять даже целые клетки.

Аппаратура. Современный жидкостной хроматограф включает емкости для элюентов, насосы высокого давления, дозатор, хроматографическую колонку, детектор, регистрирующий прибор, систему управления и мат. обработки результатов.

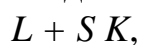
Элюенты подаются в насос через фильтр, задерживающий пылевые частицы (больше 0,2 мкм); иногда через элюенты пропускают небольшой ток гелия для удаления растворенного воздуха и предотвращения образования пузырьков в детекторе (особенно в случае водных и полярных элюентов). В аналитических хроматографах для подачи элюента в колонку используют поршневые насосы с системой обратной связи, позволяющие сглаживать пульсацию потока в пределах 1-2% и обеспечивать объемные скорости от 0,1 до 25 мл/мин при давлении до $\sim 3 \cdot 10^7$ Па. В микроколоночной хроматографии объемные скорости потока элюента ниже: 10-1000 мкл/мин. В случае градиентного элюирования используют несколько насосов, которые управляются программатором и подают в камеру смешения 2-3 компонента элюента, оставляя постоянной общую скорость потока. Для введения пробы в колонку, находящуюся под большим давлением, без остановки потока используют специальные

микродозировочные краны, связанные с петлей известного объема для исследуемой пробы р-ра. Разработаны дозировочные системы с автоматическим отбором и вводом пробы с помощью микродозировочных кранов или шприцов. Колонки для ВЭЖХ изготавливают чаще всего из нержавеющей стальной полированной трубки длиной 10-25 см и внутренним диаметром 3-5 мм. Используют также стеклянные колонки, помещенные в металлический кожух; в микроколоночной хроматографии - набивные металлические колонки с внутренним диаметром 1,0-1,5 мм, набивные стеклянные микроколоночки диаметром 70-150 мкм и полые капиллярные колонки диаметром 10-100 мкм; в препаративной - колонки диаметром от 2 до 10 см и более. Для равномерного и плотного заполнения колонок сорбентом используют суспензионный метод набивки. Суспензию готовят из сорбента и подходящей органической жидкости, которая подается под давлением до $5 \cdot 10^7$ Па в колонку. Для определения выходящих из колонки разделенных компонентов используют детекторы (см. *Детекторы хроматографические*). Для увеличения чувствительности детектора иногда применяют послеколоночную дериватизацию компонентов смеси. Для этого с потоком элюента вводят такие реагенты, которые, взаимодействуя с разделенными веществами, образуют производные с более выраженными свойствами, например, сильнее поглощают в УФ или видимой области спектра или обладают большей флуоресцирующей способностью и т. д. Иногда дериватизацию проводят до хроматографического анализа и разделяют производные, а не исходные вещества. Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводят с помощью самописца или мини-ЭВМ, которая также рассчитывает количеств. характеристики и, в некоторых случаях, качеств. состав смесей. Микропроцессор обеспечивает автоматический ввод пробы, изменение по заданной программе состава элюента при градиентном элюировании, поддержание температуры колонки

Механизм разделения в аффинной хроматографии

Схематически механизм разделения в аффинной хроматографии представлен на рис.4 Лиганд L фиксирован на матрице, целевое вещество S связывается с лигандом и вследствие этого извлекается из раствора. На стадии элюирования комплекс разрушается и целевое вещество вновь переходит в раствор.

Разделение основано на равновесной реакции:



где K – комплекс.

Взаимодействие вещество – лиганд должно быть специфическим и обратимым. Характеристикой обратимости процесса является константа диссоциации. Данные по константе диссоциации можно брать из литературных источников.

Лиганд должен иметь реакционноспособные функциональные группы, при помощи которых осуществляется его связь с матрицей, при этом должна сохраняться био-специфическая активность лиганда. Если лиганд имеет несколько таких групп, его иммобилизация должна проводиться с участием той из них, которая не входит в участок, взаимодействующий с целевым веществом.

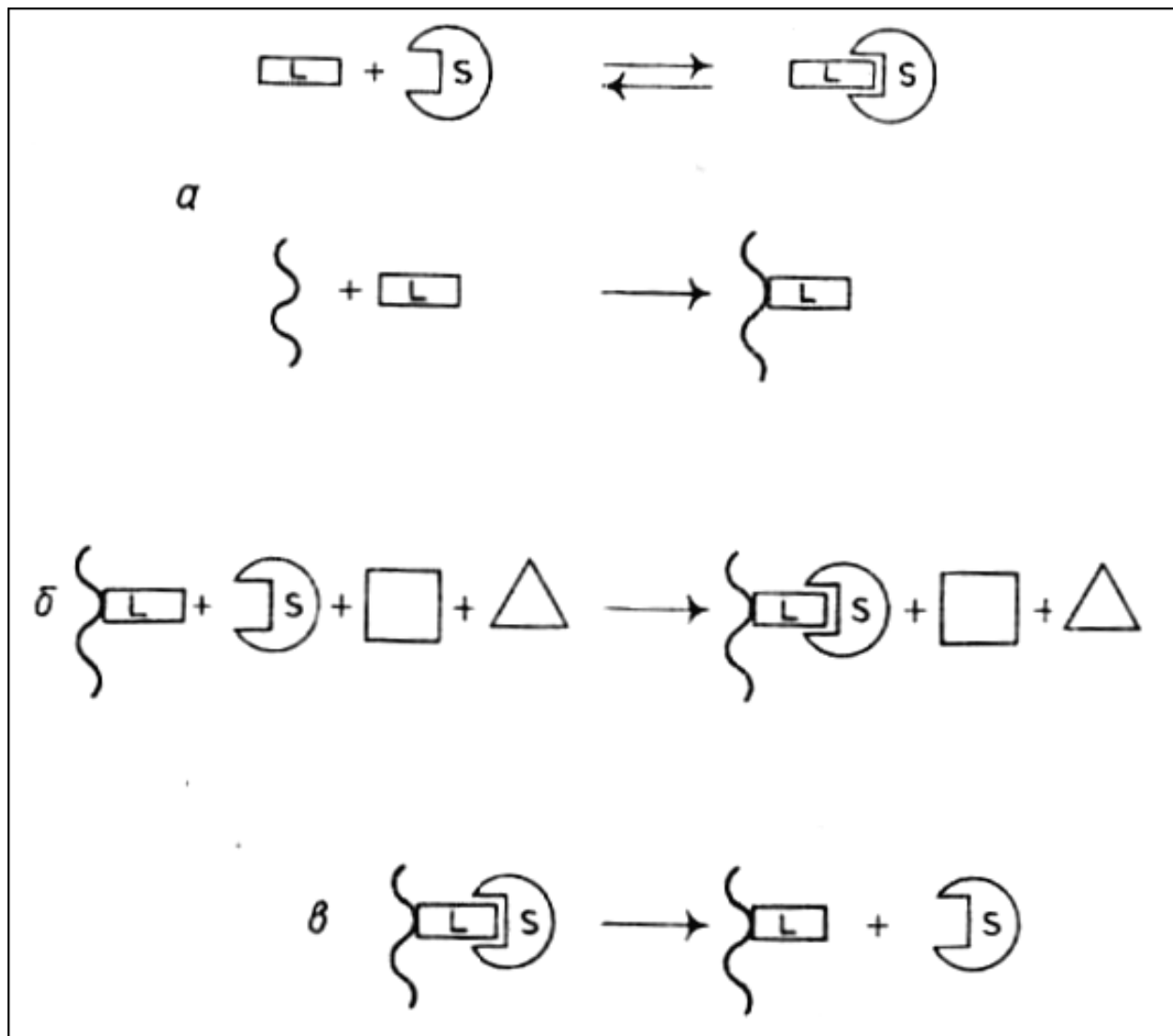


Рис. 4. Механизм разделения веществ в аффинной

хроматографии: *a* – иммобилизация лиганда (ковалентно); *б* – связывание целевого вещества (нековалентно) и удаление сопутствующих примесей; *в* – десорбция целевого вещества

Активные центры многих биологически активных веществ (например, ферментов) часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших молекул лигандов, непосредственно связанных с матрицей. Поэтому между матрицей и лигандом обычно встраивают дополнительный блок – «спейсер» (рис.5).

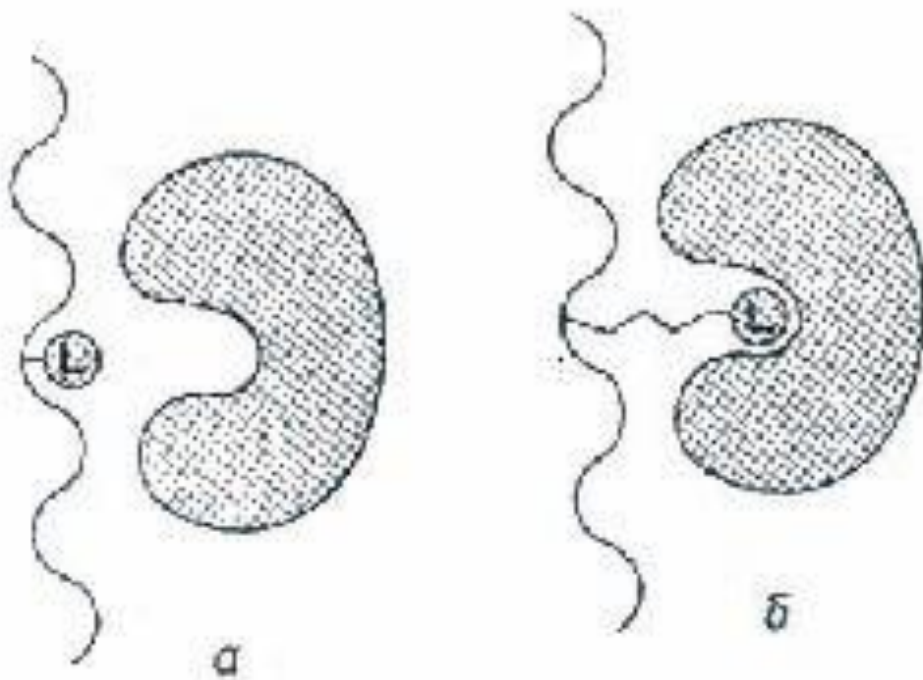


Рис. 5. Иллюстрация роли «спейсера»: *a* – лиганд фиксирован непосредственно на матрице и недоступен для целевого вещества; *б* – лиганд фиксирован через промежуточный «спейсер» и способен взаимодействовать с молекулой целевого вещества

В качестве матрицы используются гели агарозы или полиакриламида. Выпускаются материалы с различными реакционно способными группами, предназначенными для взаимодействия с лигандом. Схема реакции активации агарозы с помощью бромциана представлена на рис. 6а. На рис.6в приведена структурная формула активированной молекулы, готовой для связывания с лигандом. Выбор типа геля определяется типами функциональных групп лиганда.

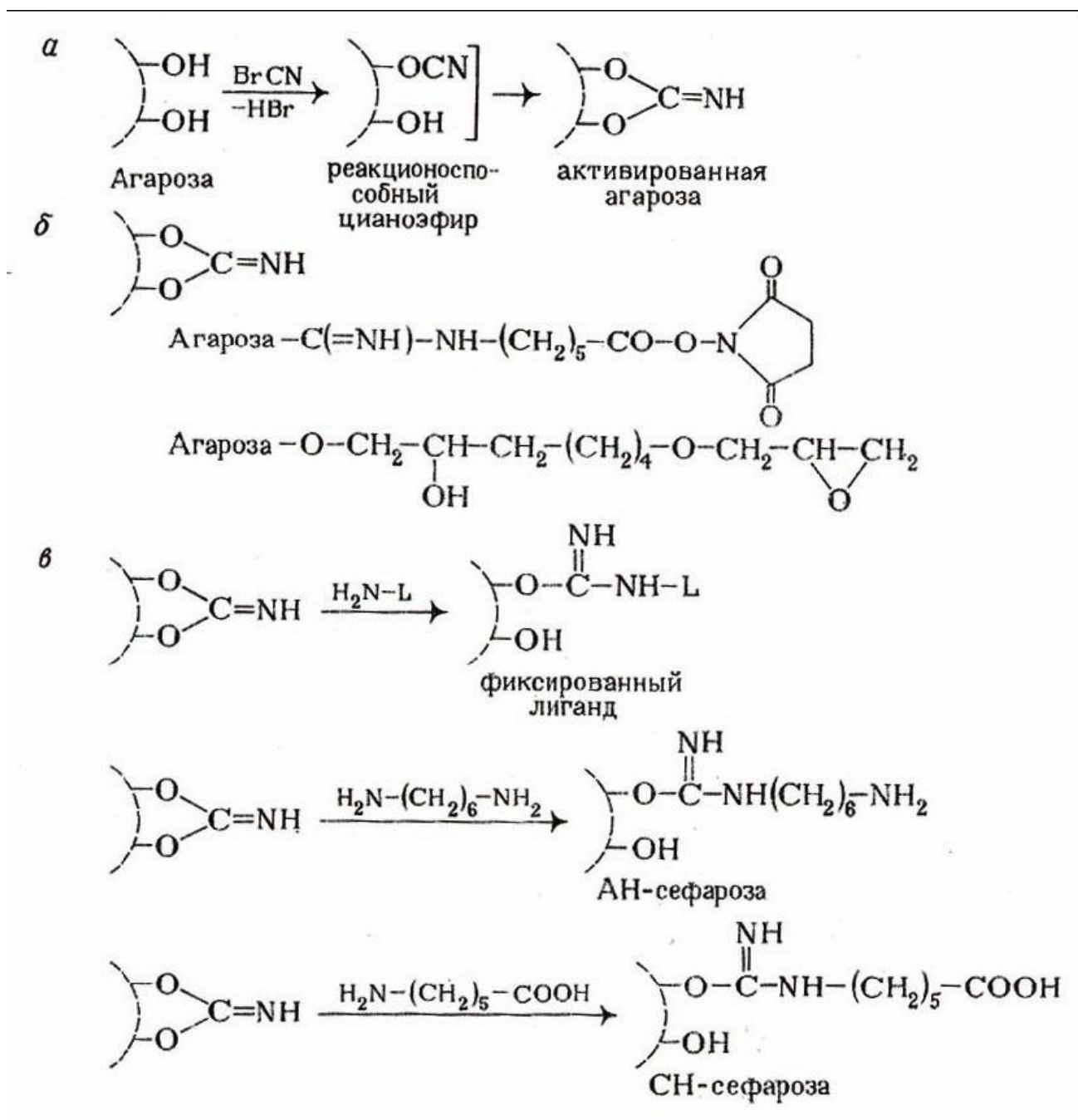


Рис. 6. Активация молекулы агарозы и конденсация ее с лигандами:

a – получение активированной молекулы агарозы;

б – молекула агарозы, подготовленная для непосредственной конденсации с лигандом;

в – конденсация активированной агарозы с лигандом или «спейсером», несущим амино- или карбоксигруппу

В таблице 1 приведены сочетания функциональных групп лигандов и матриц, по которым проводят реакцию иммобилизации.

Таблица 1

Возможные сочетания функциональных групп лигандов и матриц

Лиганды	Функциональные группы модифицированного	
	лиганда	носителя
Белки, пептиды	Амино-	Карбокси-, имидокарбонатная, эпокси-
Аминокислоты	Карбокси- Меркапто-	Амино- Пропил-тио, эпокси-
Полисахариды	Гидрокси- Карбокси-	Эпокси- Амино-
Полинуклеотиды	Амино-	Имидокарбонатная, пропил-тио
Коферменты, кофакторы	Амино-, карбокси-	Карбокси-, амино-, имидокарбонатная
Антибиотики, стероиды	Меркапто-, гидрокси-	Пропил-тио, эпокси-

Кроме того, известны матрицы, на которых лиганды могут быть иммобилизованы только с помощью конденсирующих агентов (в качестве конденсирующих агентов используются водорастворимые производные карбодиимида, например, *N*-этил-*N*-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид и др.). Аффинную хроматографию проводят в водных буферных растворах, подбирая оптимальные условия для каждого конкретного случая. Можно создать такие условия (значение рН раствора и концентрации соли), при которых взаимодействие целевого вещества с лигандом будет наиболее сильным.

Среди других методов выделения веществ аффинная хроматография занимает особое место, поскольку процесс идет крайне специфически с использованием биологической активности целевого вещества. Эта особенность позволяет концентрировать целевые вещества из больших объемов растворов.

Аффинная хроматография применяется для выделения следующих классов веществ: аналогов субстратов, ингибиторов, кофакторов (при этом роль лигандов играют ферменты; антигенов, вирусов, клеток (лиганды – антитела); полисахаридов, гликопротеинов, клеток (лиганды – лектины); гистонов, полимераз (лиганды – нуклеиновые кислоты); рецепторов, белков-переносчиков (гормоны, витамины); белков, специфически взаимодействующих с мембраной клетки, лектинов (лиганды – клетки).

Основные хроматографические величины и их определение. При разделении веществ с помощью жидкостной хроматографии могут применяться проывительный, фронтальный и вытеснительный варианты. Чаще всего используют проывительный вариант, при котором в колонку в потоке элюента вводят порцию

разделяемой смеси. Выход компонентов смеси из колонки регистрируется на хроматограмме в виде пиков (рис.7 а). Из хроматограммы определяют времена удерживания несорбирующегося (t_0) и разделенных компонентов (t_{R1} , t_{R2} и т. д.) и ширину оснований пиков (t_{w1} , t_{w2} и т. д.). Зная объемную скорость элюента w , вычисляют: мертвый объем колонки $V_m = t_0 \cdot w$; исправленный удерживаемый объем компонента $V'_R = (t_R - t_0)w = t'_R w$, где t'_R - исправленное время удерживания компонента; коэффициент емкости колонки по отношению к данному компоненту $k' = (t_R - t_0)/t_0 = V'_R/V_m$; эффективность колонки (характеризуется числом эквивалентных теоретических тарелок) $N = 16(t_R/t_w)^2$; коэффициент селективности $\alpha = t'_{R2}/t'_{R1} = V'_{R2}/V'_{R1} = k'_2/k'_1$ и разрешение $R_S = 2(t_{R2} - t_{R1})/(t_{w1} + t_{w2})$. Высота или площадь пиков характеризует концентрацию компонентов, а удерживаемые объемы - качественный состав смеси. Идентификацию компонентов обычно проводят по совпадению времен удерживания со стандартными веществами; используют также физико-химические или химические методы.

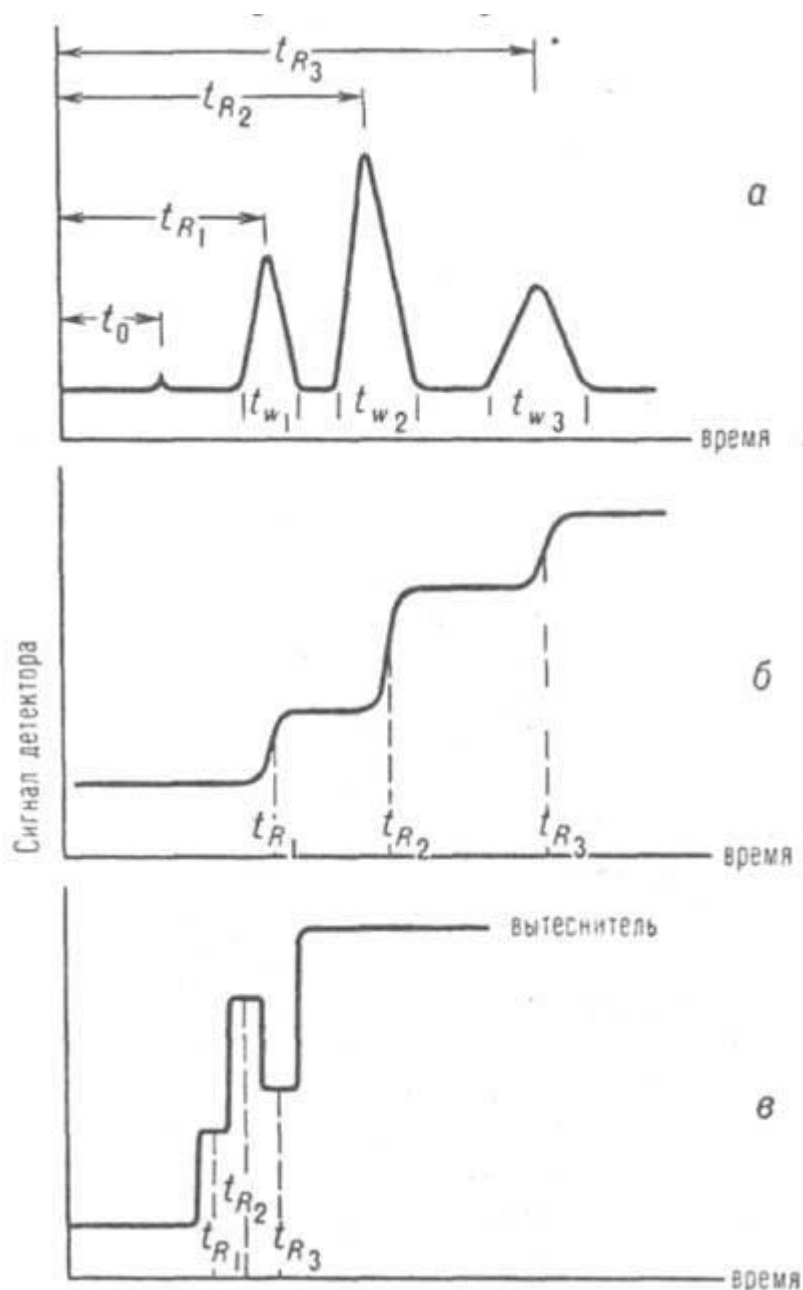


Рис.7 Варианты жидкостной хроматографии: а) проявительный; б) фронтальный; в) вытеснительный.

При фронтальном варианте через колонку непрерывно пропускают смесь разделяемых веществ, которая играет роль подвижной фазы. Хроматограмма в этом случае представляет собой ступени, высоты которых пропорциональны концентрациям компонентов; удерживаемые объемы определяют по времени удерживания компонентов (рис.7 б). При дифференцировании такой хроматограммы получают картину, как в проявительном варианте. В вытеснительном варианте компоненты смеси, введенной в колонку, вытесняются элюентом, который адсорбируется сильнее любого компонента. Порядок выхода компонентов определяется силой взаимодействия их с поверхностью сорбента (рис.7 в). Главный показатель, характеризующий жидкостную хроматографию, - разрешение R_S двух веществ, которое связано с основными хроматографическими величинами соотношением:

$$R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \sqrt{N}$$

Коэффициент емкости k' существенно влияет на величину R_S : при изменении k' от 0 до 10 (оптимальные пределы) R_S сильно возрастает. Значение k' определяется удельной поверхностью сорбента и его кол-вом в колонке, а также константой адсорбционного равновесия (константой Генри). Коэффициент селективности α определяется различием констант адсорбционного равновесия двух разделяемых компонентов. При увеличении α (от 1 до ~ 5) R_S резко возрастает, при дальнейшем увеличении α - меняется мало. Селективность колонок зависит от химической структуры поверхности сорбента, состава элюента и строения разделяемых соединений. Так как сорбция хроматографируемых веществ в жидкостной хроматографии определяется попарным взаимодействием трех основных компонентов системы - сорбента, разделяемых веществ и элюента, то изменение состава элюента - удобный способ оптимизации процесса разделения. Эффективность колонки зависит от размера частиц и структуры пор адсорбента, от равномерности набивки колонки, вязкости элюента и скорости массообмена. Удлинение колонки не всегда приводит к улучшению разделения, т. к. возрастает сопротивление колонки, увеличивается давление элюента на входе и время проведения опыта, снижается чувствительность и точность анализа из-за уширения пика анализируемого компонента. При $R_S > 1$ пики двух веществ на хроматограмме разделяются практически полностью, с ростом R_S увеличивается время разделения; при $R_S < 1$ - разделение неудовлетворительное. В препаративной хроматографии в связи с введением сравнительно больших количеств разделяемых веществ колонка работает с перегрузкой. При этом снижается коэффициент емкости, возрастает высота, эквивалентная теоретической тарелке, что приводит к уменьшению разрешения.

Сорбенты, используемые в аффинной хроматографии

В качестве сорбентов для аффинной хроматографии применяются гели на основе агарозы: сефароза 4В, сефароза CL, аффи-гель.

Внутренняя поверхность гранул геля *сефарозы 4В*, благодаря крупным порам, доступна как для молекул лигандов, так и для молекул целевых веществ. Матрица

имеет незначительную неспецифическую сорбцию. Частицы сефарозы мало сжимаемы, вследствие чего обеспечиваются хорошие гидродинамические свойства колонки.

Сефароза CL представляет собой ковалентно сшитые молекулы агарозы, устойчивые в органических растворителях (что существенно, например, при последующей иммобилизации лиганда). Сорбент устойчив при повышенной температуре и в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин-гидрохлорид). По сравнению с сефарозой 4В сшитая агароза обладает меньшей емкостью.

Аффи-гель – агарозный и полиакриламидный гель, модифицированный разнообразными функциональными группами. По сравнению с агарозными гелями сорбенты на основе полиакриламида имеют следующие преимущества: крайне незначительную неспецифическую сорбцию; биологическую инертность (устойчивы к действию ферментов); повышенную термическую и химическую устойчивость.

Пример применения аффинной хроматографии.

В настоящее время методы аффинной хроматографии широко применяются для исследования специфического связывания биологических макромолекул с природными лигандами. Клетки различных органов и тканей отличаются по характеру и спектру мембранных рецепторов. Наряду с одинаковыми по функциям рецепторами, которые необходимы для обеспечения жизни любой клетки, дифференцированная клетка обнаруживает тканеспецифические рецепторы, ответственные за связывание специфических лигандов. Мембранные рецепторы представляют собой сложные гликопротеины с молекулярной массой 90-250 кДа. Структура узнающей части рецептора, которая экспонирована во внешнюю среду для связывания с лигандом, в значительной степени подобна структуре варибельной части иммуноглобулинов, специфических к тому же лиганду. В ряде работ показано существование определенных белков на поверхности клеточных мембран, которые, взаимодействуя в качестве рецепторов с экстраклеточными олигонуклеотидами, участвуют в транспорте последних в клетку.

В литературе описан метод создания композиционных аффинных сорбентов на основе фрагментов клеточных мембран эритроцитов, лимфоцитов и гепатоцитов, иммобилизованных в матрицу полиакрилонитрила. Эти сорбенты проявляют высокую аффинность связывания своих природных белков-лигандов. Исследование связывания дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), и ее комплексов с белками с клеточными рецепторами, представляет актуальный интерес для понимания закономерности проникновения нуклеиновой кислоты и ее комплексов в клетку, а также для выяснения механизмов тканеспецифического действия эндогенных белков регуляторов.

Известно, что кора головного мозга является наиболее специфичной тканью по своим регуляторным функциям. В то же время, рецепторы клеток коры головного мозга обладают широкой перекрестной специфичностью по отношению к белкам регуляторам других систем организма, в частности, иммунной. Поэтому, в данной работе в

качестве функционального элемента для аффинной сорбции были использованы клеточные мембраны коры головного мозга крупного рогатого скота.

Известно, что в организме ДНК обладает функцией не только хранения генетической информации, но и исполняет роль полимера-носителя для целого ряда олигопептидов и белков. Нами было показано, что нуклеопротеиновые (НПК) комплексы ДНК-инсулин и ДНК-кортексин устойчивы в широком диапазоне ионной силы растворов и физиологической области рН. В данной работе методом аффинной хроматографии изучали связывание этих НПК с мембранами клеток коры головного мозга.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В качестве исследуемых препаратов использовали: раствор натриевой соли ДНК из селезенки крупного рогатого скота производства НПО "Биохимреактив" (Латвия), кристаллический инсулин производства завода медпрепаратов АО "Самсон" (Россия), кортексин - препарат, выделенный из коры головного мозга крупного рогатого скота, содержащий негликозилированные линейные пептиды. Эти пептиды проявляют нейротрофическую активность и их молекулярные массы не превышают 10 кДа. В работе исследовали комплексы ДНК с инсулином и кортексином, а также природные нуклеопротеиновые комплексы из мозга и печени крупного рогатого скота. Концентрацию ДНК в растворе определяли по поглощению в УФ-области при длине волны 260 нм. Расчет проводили по зависимости: 1 единица оптической плотности (ЕОП) соответствует концентрации нуклеиновой кислоты 0.05 мг/см³. Концентрацию белка определяли по калибровочным прямым и методу Лоури.

Метод получения сорбента

По аналогии с описанным в литературе методом проводили пространственную иммобилизацию лиофилизированных клеточных мембран мозговой ткани. Режим получения сорбента был выбран таким образом, при котором не происходит дегидратации клеточных мембран и их рецепторы при этом остаются свободными и доступными. В качестве связующего полимера использовали полиакрилонитрил марки "Нитрон" производства НПО "Нитрон" (Россия), содержащее 92,5 % акрилонитрила, 6 % метилметакрилата и 1,5 % 2,3-дикарбокси-1-пропена. 15 % раствор полимера получали растворением волокна в 50% водном растворе роданида натрия при нагреве до 80С. Перед работой роданид натрия перекристаллизовывали из воды при охлаждении. Лиофилизированный препарат клеточных мембран суспендировали в 50% роданиде натрия в концентрации 75 % по весу. Затем проводили смешение связующего полимера и аффинного компонента в объемном соотношении 5:1 при перемешивании. Осаждение сорбента проводили водой при охлаждении смеси до температуры 20С и интенсивном перемешивании.

После измельчения влажного осадка и многократной промывки дистиллированной водой для удаления следов роданида (контроль хлористым железом), получали аффинный сорбент со средним диаметром 300+/-100 мкм и специфическим объемом в набухшем состоянии 20.0+/-0.1 см³*г⁻¹.

Перед работой аффинный сорбент уравнивали фосфатным буфером pH 8.0 и загружали в колонки (30x1.4 см). Для установления равновесия промывали колонки 0.1 Н фосфатным буфером с добавленным NaCl до ионной силы 0.3 Н в течение 48 ч. Подача буфера осуществлялась насосом со скоростью 6 мл*ч⁻¹.

Аффинная хроматография

1 мл исследуемого раствора ДНК, белка или НПК наносили на колонку и элюировали 0.3 Н фосфатным буфером pH 8.0. Сбор фракций осуществляли с помощью коллектора фракций FCC 60. Измеряли оптическую плотность растворов на выходе из колонки и определяли концентрацию белков по методу Лоури. Коэффициент распределения вычисляли по уравнению:

$$k = (V - V_m) / V_s, (1)$$

где V - элюионный объем, соответствующий выходу ДНК, белка или НПК, см³;
V_m - объем задержки колонки, см³; V_s - объем стационарной фазы, см³.

Для регенерации аффинного сорбента использовали промывание колонок 6М мочевиной, при этом десорбировались неспецифически связанные примеси. Воспроизводимость экспериментов свидетельствует о том, что не происходит деструкции или денатурации иммобилизованных клеточных мембран.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Выбор методики получения сорбента можно обосновать тем, что упаковка и конформация мембранных рецепторов может быть нарушена при контактах с органическими растворителями, используемыми при химической иммобилизации. Поэтому для сохранения нативной конформации гликопротеинов мембран подобран режим получения композиционного сорбента, при котором все процессы происходят в водной среде. При этом рецепторы клеточных мембран остаются свободными и доступными даже для высокомолекулярных лигандов. Совместимость биоконпонентов и полимера, взаимное проникновение их структур и пространственная проницаемость сформировавшегося композиционного сорбента, представляет собой отдельную проблему на границе физической химии полимеров и гистологии.

В рамках данной работы аффинная хроматография служила для оценки селективности связывания свободных белков, свободной ДНК и нуклеопротеиновых комплексов с рецепторами клеточных мембран мозга. Кроме того, коэффициент распределения k был использован для сравнения селективности связывания природных и модельных НПК.

На рисунке 8 показаны выходные кривые аффинной хроматографии инсулина (а), не обладающего специфичностью связывания, и кортексина (б), который является специфическим мозговым белком. Положение пиков свидетельствует о том, что инсулин не взаимодействует с аффинным сорбентом и выходит с объемом задержки колонки, тогда как кортексин демонстрирует определенную степень связывания с иммобилизованными клеточными мембранами коры головного мозга. При этом пик кортексина значительно более размыт по сравнению с пиком инсулина, что может быть косвенным признаком неоднородности рецепторов, взаимодействующих с кортексином.

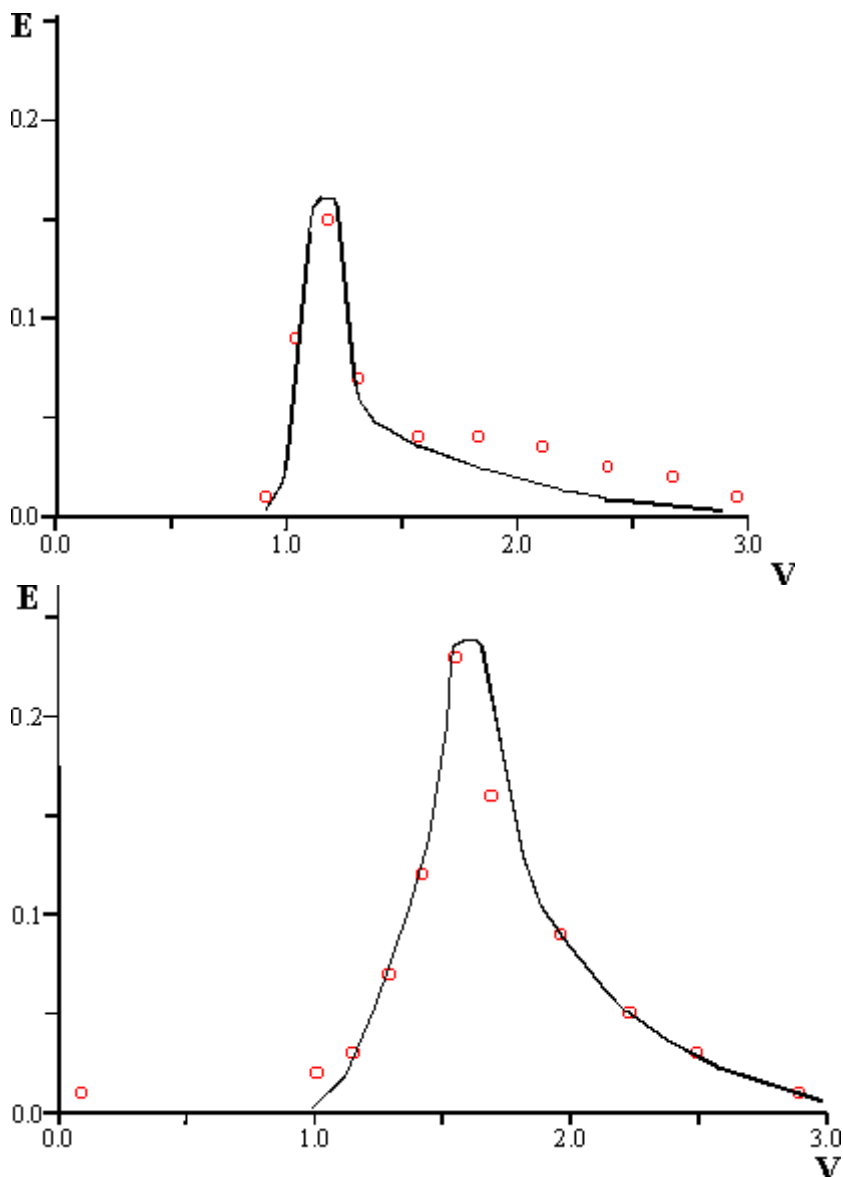


Рисунок 8. Выходная кривая после аффинной хроматографии (а) - кортексина (б) - инсулина. E - оптическая плотность при длине волны 280 нм, V - относительный объем выхода.

На рисунке 9 представлена аффинная хроматография нативной ДНК (а), модельного комплекса ДНК - кортексин (б) и природного НПК, выделенного из коры головного мозга крупного рогатого скота. Видно, что нативная ДНК обладает некоторым связыванием с использованным сорбентом. Это связано не только с неспецифическим

связыванием ДНК с полимерной матрицей, но с возможным взаимодействием ДНК с мембранными структурами. По-видимому, подобные взаимодействия лежат в основе проникновения сателлитных ДНК через клеточные и ядерные мембраны. НПК с кортексином связывается с аффинным сорбентом сильнее, чем свободная ДНК. Пик природного НПК мозга выходит позже, т.е. связывается прочнее, чем модельный нуклеопротеиновый комплекс ДНК-кортексин. По-видимому, природный НПК содержит не только пептиды, специфично связывающиеся с клеточными мембранами мозговой ткани, входящие в состав кортексина, но и другие регуляторные белки хроматина. Возможно, к ним относятся кислые фосфопротеины, содержащиеся в ядре клеток и выполняющие трофические функции.

В таблице 2 приведены значения коэффициентов распределения для исследованных белков и НПК, вычисленные по формуле (1). Анализ данных показывает, что при включении неспецифического белка инсулина в комплекс с ДНК повышается его степень связывания с клеточными мембранами. Это является определенным аргументом в пользу возможности использования комплексообразования неядерных белков с ДНК для транспорта таких белков в клетку, а возможно и в клеточное ядро.

Таблица 2. Значение коэффициентов распределения исследованных белков и НПК, полученные методом аффинной хроматографии

Система	Концентрация компонентов, мг*см-3	Коэффициент распределения k
Нативная ДНК	0.5	5.4+/-0.6
Инсулин	4.5	4.2+/-0.6
Кортексин	0.8	13.1+/-0.8
ДНК-инсулин	0.6/4.2	5.6+/-0.6
ДНК-кортексин	0.3/1.8	9.2+/-0.8
НПК мозга	10.0	14.4+/-0.8
НПК печени	10.0	8.8+/-0.8

При включении кортексина в комплекс с ДНК, уменьшается степень его связывания с клеточными мембранами. Наиболее вероятным объяснением этого факта является то, что нуклеопротеиновые комплексы имеют значительно большую молекулярную массу, чем лигандные белки, и сложную надмолекулярную структуру, в которой часть функциональных групп кортексина оказывается экранированной и не участвует в специфическом взаимодействии с рецепторами.

Сравнение констант распределения природных нуклеопротеиновых комплексов свидетельствует о том, что НПК мозга более селективно связывается с клеточными мембранами клеток мозга, чем НПК печени. По-видимому, это объясняет наличие

тканеспецифичности таких комплексов, показанной экспериментами в органотипической культуре ткани.

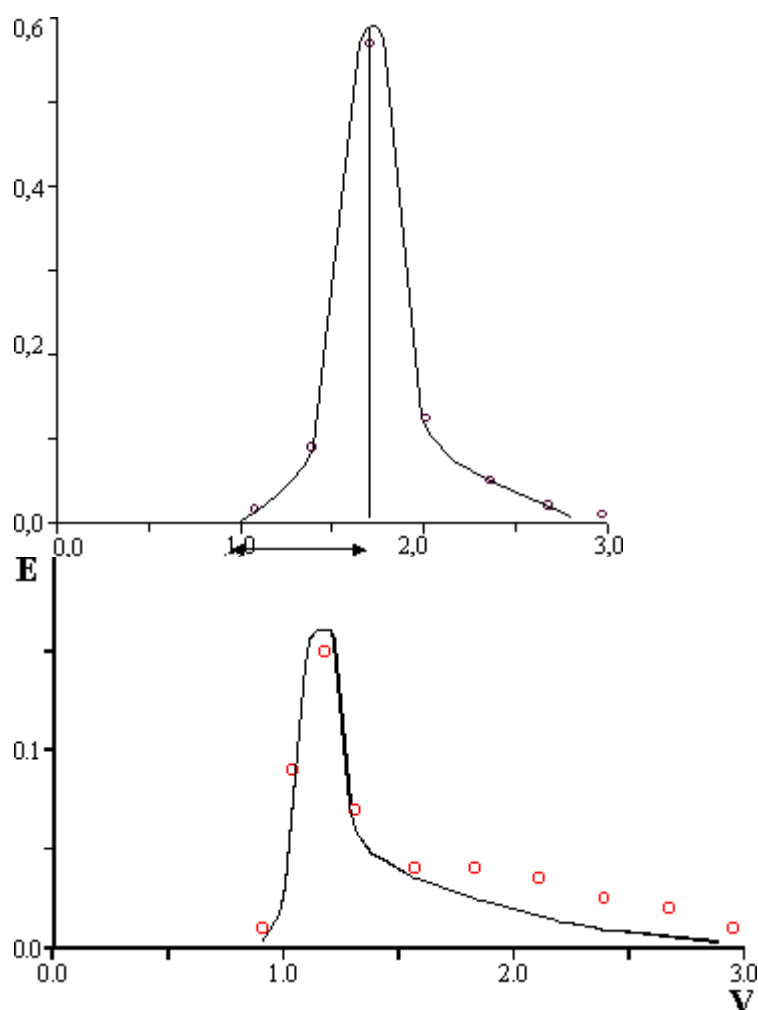


Рисунок 9. Аффинная хроматография: (А) - нативной ДНК, (Б) - модельного комплекса ДНК - кортексин, (В) - природного нуклеопротеинового комплекса из коры головного мозга крупного рогатого скота. E - оптическая плотность при 260 нм, V - относительный объем выхода.

ВЫВОДЫ

1. Методом инклюдирования в пористую матрицу полиакрилонитрила получен аффинный сорбент, содержащий клеточные мембраны коры головного мозга.
2. Методом аффинной хроматографии исследованы закономерности связывания нативной ДНК, инсулина, кортексина и их нуклеопротеиновых комплексов. Показано, что максимальной селективностью обладает кортексин. Нативная ДНК также обладает некоторой селективностью связывания с клеточными мембранами $k=5.4\pm 0.6$. При включении неспецифического белка инсулина в комплекс с ДНК, повышается его связывание с клеточными мембранами.

3. При исследовании природных нуклеопротеиновых комплексов из мозга и печени крупного рогатого скота показано, что они обладают различной селективностью связывания с клеточными мембранами, что является возможным объяснением тканеспецифичности этих комплексов.