Реферат на тему:

**Использование аффинной хроматографии**

## Активированные матрицы и спейсеры

Твердым основанием для аффинной матрицы чаще всего служат хорошо известные нам 4% или 6% сефароза, иногда химически скрепленная (CL-сефароза), а в некоторых специальных случаях (см. ниже) и целлюлоза.

Имеется множество способов химической активации как самих матриц, так и удаленных от матрицы концов спейсеров. Такая активация необходима для обеспечения простоты "посадки" на них лиганда (в условиях биохимической лаборатории).

Здесь нецелесообразно рассматривать все это множество способов, тем более, что большинство из них требует более серьезного знания органической химии, чем дает средняя школа. (Интересующимся и лучше подготовленным читателям я могу рекомендовать свою книгу "Хроматография белков и нуклеиновых кислот" ("Наука", 1985)).

Тем не менее, для иллюстрации подхода к проблеме опишу в общих чертах один простейший и ранее других предложенный вариант (впрочем, используемый до сих пор).

В нем активация полисахаридной матрицы, несущей на себе множество свободных ОН-групп, производится путем обработки ее бромцианом (BrCN). В результате получают (в сильно щелочной среде) прочно сидящие на нитях сефарозы химически активные группы имидокарбоната, согласно реакции. Эти электрофильные группы "охотно" образуют ковалентные связи с нуклеофильными группами лиганда.

Так например, лиганд, имеющий свободную аминогруппу, может связаться с актированной таким образом матрицей через остаток изомочевины.

Возможны еще два варианта протекания этой реакции (с выделением аммиака), но оба они приводят к тому же конечному результату: лиганд (или спейсер с аминогруппой на конце) химически прочно связывается с матрицей.

Безусловным недостатком описанного метода активации матрицы следует назвать ядовитость бромциана и токсичность некоторых побочных продуктов реакции (в том числе и НВг), содержащихся в промывных водах после активации сефарозы.

В качестве спейсеров обычно используют либо 1,6 диаминогексан,, либо 6-аминокапроновую кислоту. Таким образом на свободном конце спейсера оказывается аминогруппа или карбоксил. Присоединение к нему лиганда также требует специальной химической реакции.

Поэтому фирма "Pharmacia" выпускает готовые матрицы, в которых спейсер (6-аминокапроновая кислота) активирован этерификацией концевого карбоксила N-оксисукцинимидом.

Присоединение лиганда по аминогруппе происходит в мягких условиях, в течение одного часа, что очень важно для лабильных лигандов. N-оксисукцинимид отщепляется и на его место надежной пептидной связью присоединяется лиганд.

## Лиганды

Великое множество лигандов, описанных в научной литературе, можно разбить на две главных категории. Это лиганды с *индивидуальной специфичностью* и лиганды с *групповой специфичностью,* В качестве индивидуальных лигандов могут выступать ферменты, а также субстраты или ингибиторы соответствующих ферментативных реакций (для очистки ферментов).

Использование в целях очистки аффинной пары фермент-субстрат предполагает такие условия хроматографического процесса, когда фермент не может осуществить каталитический акт преобразования субстрата, а только связывается с ним в фермент-субстратный комплекс. (Например в отсутствие необходимого второго субстрата, соответствующих ионов или при неблагоприятном значении рН).

С другой стороны, важный раздел биохимии, особенно в прикладном аспекте, составляет конструирование обменников с закрепленными ферментами, на этот раз ведущими катализ в условиях, когда его продукты легко отделяются от ферментов.

Эти продукты вытекают из колонки или остаются в супернатанте после проведения ферментативной реакции в объеме взвеси, из которой матрица с закрепленным на ней ферментом затем удаляется в осадок.

Естественно, что в этих случаях в окружении иммобилизованного фермента создаются условия не только связывания субстрата, но и катализа соответствующей реакции.

Очевидное преимущество ферментов, закрепленных на хроматографической матрице, заключается в простой возможности многократного использования этих ферментов, поскольку они автоматически освобождаются из смеси с продуктами реакции.

Так же, как ферменты, белки-рецепторы могут служить лигандами для связывания и очистки гормонов и других низкомолекулярных эффекторов. Транспортные белки плазмы крови и белки - переносчики клеточных мембран - для очистки своих низкомолекулярных партнеров.

Белки - регуляторы и участники процессов матричного синтеза, используемые в качестве лигандов, позволяют решать задачи по вычленению регуляторных и других особых участков нуклеиновых кислот. То же относится к системам выработки и транспорта энергии.

Разумеется, все участники названных здесь биоспецифических пар могут меняться ролями - те, что были иммобилизованы, могут стать объектом аффинной очистки. Весьма продуктивным оказалось и создание иммуносорбентов, обладающих сродством к определенным антигенам.

*Лиганды с групповой специфичностью* обладают сродством к целой группе веществ. К примеру, "кофермент А" участвует во многих ферментативных реакциях. Закрепленный на аффинной матрице, он может обеспечивать очистку любого из соответствующих ферментов. В тех случаях, когда в исходном препарате имеется только один из них, очистка будет не хуже, чем при использовании лигандов с индивидуальной специфичностью. Иногда групповая специфичность некоторых опытным путем отобранных лигандов не имеет даже четкого объяснения этой их способности.

Например, кислый аминополисахарид гепарин (М>10 000) известен в качестве антикоагулянта крови. Но кроме того он нашел применение в биохимии как конкурентный ингибитор рибонуклеаз. Это его качество, по-видимому, отражает определенное сходство полимера с РНК.

Поэтому гепарин может быть использован в качестве лиганда для ряда белков, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами: полимераз, растриктаз, обратной транскриптазы, факторов инициации белкового синтеза и других.

В качестве лигандов могут выступать и сами нуклеиновые кислоты*.* Есть способы химического закрепления их на активированных матрицах.

Но чаще ДНК и РНК, используя их нитевую структуру, закрепляют на матрицах нековалентно: либо заплавляют в 4%-ную агарозу в процессе ее затвердевания из расплавленного состояния, либо "запутывают" между нитями набухшей в воде целлюлозы - при ее высыхании.

На отобранных путем клонирования и закрепленных в аффинной матрице фрагментах ДНК, содержащих определенный ген, можно задерживать и очищать соответствующую этому гену иРНК.

Синтезированную в лабораторных условиях полиуридиловую кислоту (поли У) длиной в сотню мономеров уридина можно ковалентно фиксировать на BrCN-активированной сефарозе.

Затем, благодаря наличию у большинства иРНК высших организмов более или менее длинного полиаденилового "хвоста", выделять суммарную фракцию иРНК из смеси со всеми остальными РНК клеточного лизата. Относительно короткие цепочки (10-20 нуклеотидов) *олиго-дезокситимидиловой кислоты* (олиго дТ) закрепляют через концевой 5'-фосфат на матрице волокнистой целлюлозы.

На таком лиганде можно так же, как в предыдущем случае, через хвостовую поли А закрепить определенную иРНК. Затем с помощью обратной транскриптазы, для которой олиго дТ будет служить праймером, синтезировать по этой иРНК двунитевую к ДНК, которая в этом случае остается связанной с матрицей и сама может выступать в качестве лиганда.

На этом ограничим перечень возможных лигандов, далеко не исчерпав их список, и в заключение краткого очерка аффинной хроматографии рассмотрим три простых примера: два с индивидуальной специфичностью и один - с групповой.

## Некоторые примеры использования аффинной хроматографии

Пример 1. *Очистка фермента карбоксипептидазы А из мышцы крысы* (Bodwell, Meyer, 1981).

На BrCN-активированную сефарозу 4В сажали белковый ингибитор карбоксипептидазы А, выделенный из картофеля. Фракцию гомогената мышцы, экстрагированную между 0,4М КС1 и 2М NaCI в нейтральном буфере, дополнительно очищали осаждением сульфатом аммония и сажали на аффинную колонку с ингибитором, уравновешенную тем же 2М NaCI в нейтральном буфере, затем промывали таким же раствором. Элюцию фермента вели тоже 2М NaCI, но в 0,01М Na2CO3 при рН 11,2.

Отрыв фермента от ингибитора происходил за счет сильного защелачивания элюента. Примесные белки выходили при промывке, а фермент элюировался острым пиком после смены буфера

Эффективность очистки на этом этапе можно оценить сопоставляя площади под двумя пиками, обозначенными пунктиром.

## Иммунная система

Конечно же, мы не будем пытаться глубоко проникнуть в обширную область медицинской иммунологии. Коснемся только тех возможностей, которые использование иммунохимического подхода предоставляет для исследования биополимеров.

Однако для того, чтобы представить себе с чем мы будем иметь дело, необходимо, хотя бы поверхностно, познакомиться с механизмом выработки иммунитета, а также со специфическими клетками крови и молекулами его реализующими.

Широко распространенное понятие иммунитета до недавнего времени ограничивалось представлением о том, что речь идет о системе, обеспечивающей длительную неуязвимость человека для возбудителей болезней, которыми он однажды переболел хотя бы в самой легкой форме (прививка). Это тоже верно.

Но не будь у нас иммунной системы, то смертность от самых "пустяковых" на сегодняшний взгляд болезней была бы чудовищной. Человечество это по-настоящему поняло, когда столкнулось с вирусом СПИД, который атакует именно иммунную систему.

В наш организм из воздуха и пищи ежедневно проникают миллионы болезнетворных микробов и вирусов. Их всех встречает не знающее ни сна, ни отдыха "войско" иммунной защиты. Так что это за войско?

Люди, чуть знакомые с вопросом, говорят, что иммунная система вырабатывает некие "антитела", которые то ли убивают вторгшиеся микроорганизмы, то ли облепляют их, обезвреживают и вместе с собой выводят из организма.

Все это не совсем так. "Непрошенных пришельцев" уничтожают специальные крупные клетки - *фагоциты. "*Узнав" чужеродную клетку или вирус, они буквально "заглатывают" их. Наружная мембрана фагоцита образует углубление, наподобие мешочка, которое обволакивает "чужеземца". Потом горловина мешочка смыкается, оболочка фагоцита восстанавливается и "враг" оказывается в его цитоплазме. Здесь он подвергается атаке разнообразных литических ферментов, разрушающих сначала оболочку, а потом и сердцевину злокозненной жертвы.

В крови фагоциты называют *гранулоцитами.* Они входят в состав белых кровяных клеток - *лейкоцитов"* Фагоциты, оседающие в тканях тела, именуются *макрофагами,* В обоих случаях фагоцит должен в первую очередь "узнать" чужака. Вот здесь-то роль разведчиков и "наводчиков" выполняют особого рода белковые молекулы, именуемые *антителами"* Откуда они берутся и как узнают "противника"?

Вообще-то говоря, его в первую очередь "узнают" (с помощью антител) другие белые кровяные клетки - *лимфоциты.* Это - довольно мелкие клетки. До момента своей встречи с инфекцией лимфоциты не делятся и могут циркулировать в крови месяцы и годы. Большие скопления лимфоцитов находятся в лимфатических узлах и особенно в селезенке, через которую проходит вся кровь.

Встретившись с инфицирующим или просто посторонним агентом, оказавшимся в крови (их объединяют общим термином *антигены)* и "узнав" его, лимфоциты преображаются. Ускоряются процессы метаболизма, увеличиваются размеры, возобновляется синтез ДНК. Затем следует деление. В условиях острых инфекций один лимфоцит дает сотни тысяч клеток-потомков и все они сохраняют способность "узнавать" тот же самый антиген. Часть этих потомков так и останутся в крови, формируя *иммунитет* ("иммунологическую память").

Число "разведчиков", получивших приметы этого антигена, таким образом резко возрастает. В следующий раз, когда он попадет в кровь, то не успеет размножиться, как будет опознан. Но что же дальше? Как лимфоциты сообщают об опасности фагоцитам? И как, все-таки, они сами "узнают" антигены?

Только часть активированных первичной встречей с антигеном лимфоцитов размножается для создания иммунитета. Другая их часть претерпевает иную метаморфозу. Увеличивается объем цитоплазмы, ядро оттесняется в сторону, разрастается ретикулярная система. В рибосомах начинается интенсивный синтез особых белков - тех самых "наводчиков", которых мы выше назвали антителами.

Через аппарат Гольджи они выбрасываются наружу. Прошедшее эту метаморфозу лимфоциты, которых теперь именуют плазмацитами секретируют до двух тысяч антител в секунду. Часть их поступает прямо в кровь, а часть остается в лимфатических узлах, где оседают *плазмациты.* Все антитела, синтезируемые в потомках первого дозорного лимфоцита сохраняют способность узнавания того антигена, встреча с которым стимулировала всю цепь трансформаций.

Ну а первый лимфоцит, как он "узнал" антиген? Да при помощи тех же антител, которые в количестве примерно *ста тысяч* покрывали его поверхность. Получается замкнутый круг. Выходит дело, что узнающие данный антиген антитела существовали еще до его появления. Его ждали! Для того, чтобы "узнать" именно его и его потомков (если он способен размножаться), прилепиться к их поверхностям и тем самым пометить как цели для атаки фагоцитов.

Но откуда взялась первоначальная информация о структуре еще не появившегося в организме антигена? Большинство ученых считает, что все огромное множество вариантов такой информации, - заложены исходно, наследственным путем в таком же множестве изначальных лимфоцитов, быть может, как результат соответствующих "знакомств" в предыдущих поколениях животного или человека. (Некоторые ученые, напротив, полагают, что *все* иммунные ответы формируются в течение жизни человека под влиянием вторгающихся антигенов.

Они подчеркивают, что в первые месяцы жизни новорожденного, у него иммунная система еще не работает)

Попробуем оценить первую версию, оперируя некоторыми цифрами. Зададимся сперва вопросом: что же "узнают" антитела на поверхности антигена.

Ввиду возможного разнообразия природы и происхождения антигенов, скорее всего какую-то пространственную конфигурацию, которая может строиться из любого материала: из нескольких молекул аминокислот, липидов, Сахаров, нуклеотидов и даже из органических молекул не животного происхождения. Но эта конфигурация, ввиду избирательности связывания антитела с антигеном, должна быть непростой.

Вместе с тем, число заметно различающихся пространственных комбинаций органических молекул не безгранично, так как природа химических связей между молекулами накладывает свои ограничения. Предположим, что это число для всех возможных естественных (бактерии, вирусы, белки, нуклеиновые кислоты и др.) и искусственных антигенов имеет величину порядка десятка миллионов (~107). Известно, что число лимфоцитов, содержащихся в организме человека ~1012.

Это означает, что число "разведчиков", изначально располагающих "приметами" каждого возможного антигена ~105. Это не так уж много по сравнению с общим числом лимфоцитов. Если "интервент" остается одиночкой, то вероятность встречи со "своим разведчиком" у него ничтожно мала. Но тогда от него и никакого ощутимого вреда быть не может.

Однако, как это всегда бывает, если в организм проникают одновременно многие тысячи одинаковых антигенов, то вероятность встречи соответственно возрастает. Особенно, если эти антигены суть болезнетворные микроорганизмы, которые начинают в нем быстро размножаться.

Тут уже ситуация меняется радикально, и вскоре "роковая встреча" становится неизбежной. Немедленно начинается массовая наработка антител нужной специфичности. Их размножение вступает в конкурентную борьбу с размножением "пришельцев".

Если антитела быстро выиграют эту гонку, то сумеют пометить собою всю "армию вторжения" и все ее солдаты будут уничтожены фагоцитами обоих типов прежде, чем появятся явные признаки заболевания. Такие явления происходят в нашем организме повседневно. Очевидно, что для фагоцитов безразлична природа антигена.

Они "узнают" только факт наличия на его поверхности антител любой специфичности. (Попутно заметим, что в случае вторжения более крупных антигенов, чем фагоциты, для уничтожения "врага" мобилизуются совсем другие средства - серия белков, так называемого *комплемента,* впрочем, направляемая тем же антителом. Мы эти средства рассматривать не будем - в биохимических методах исследования они применения не нашли)

Если же размножение бактерий или вирусов опережает наработку специфических антител, то болезнь развивается. В борьбу вступают другие средства защиты, например, повышение температуры тела, тормозящее это размножение... Наконец, на помощь организму привлекаются лекарства или лекарственные травы, которые животные умеют находить.

В случае повторного вторжения патогенных микроорганизмов, их уже ожидает многомиллионная армия специфических антител и лимфоцитов, созданная иммунитетом. Начальные условия для описанной выше "гонки размножений" оказываются явно в пользу защитников организма...

Подсчитано, что в крови человека свободно циркулируют и постоянно обновляются около 1019 антител.1012 лимфоцитов несут на себе 1017 антител. Значит в 100 раз большее их количество находится "в свободном поиске" противника. Значительная их часть - носители иммунитета.

В ответ на введение в кровь подопытного животного (обычно кролика) некоего антигена, например, чужеродного белка (это действие именуется *иммунизацией* кролика), в его организме, в течение определенного времени будут вырабатываться в большом количестве *специфические антитела,* способные "узнавать" только этот белок.

И мы теперь знаем, что "узнавание" означает прочную связь этих антител с молекулами соответствующего антигена и только с ними одними. Все остальные антитела разнообразной специфичности, содержащиеся в так называемой *иммунной антисыворотке животного,* наш белок не смогут "заметить". Точно так же, как антитела, выработанные в ответ на иммунизацию кролика определенным белком-антигеном, ни с какими другими белками связаться не могут.

## Литература

1. Довгяло О.П., Федоренко Н.М. Ишемическая болезнь сердца. - М.: Медицина, - 1986.
2. Долгов В.В. Морфо-функциональная характеристика эндотелия сосудистой стенки в норме и при атеросклерозе. Автореф. Док. дис. - М. - 1985.
3. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Чукичев А.В., Колесников А.Л. Роль нейтрофилов в регуляции иммунной реактивности и репаративных реакций повреждения ткани. // Вестник Росс. Акад. мед. наук. - 2000. N 2. - C. - 14-19.