



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.112:543.544

doi: 10.17308/sorpchrom.2025.25/13415

Отечественный хроматограф низкого давления для разделения белков

Виктор Семенович Карасев^{1,2}, Рушан Ахметович Андержанов¹,
Андрей Юрьевич Кирьянов², Юрий Анатольевич Каламбет^{1,3},
Иван Никитич Зоров⁴, Сергей Михайлович Староверов^{2,4}✉,
Алексей Константинович Буряк¹

¹Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фrumкина РАН, Москва, Россия

²АО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия

³ООО «Амперсенд», Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, staroverov@bcmst.ru✉

Аннотация. Работа посвящена изучению возможностей нового отечественного лабораторного хроматографа низкого давления, предназначенного для разделения и препаративного выделения белков различными хроматографическими методами.

Оборудование обеспечивает работу в изократическом и градиентном режимах с использованием ультрафиолетового и кондуктометрического детекторов. Наличие встроенного коллектора фракций на базе переключающего крана позволяет собирать не только целевую фракцию, но и реализовать циклическую программу наработки вещества с промежуточной регенерацией хроматографической колонки. Ввод образца может быть осуществлен инжектором или через насос по отдельной линии. Управление оборудованием и регистрация полученных данных осуществляется отечественным программным комплексом «Мультихром Аксиома».

Проведенные исследования показали, что прибор позволяет реализовать все основные методы разделения белков: ионообменную, гидрофобную, аффинную и эксклюзионную хроматографию, продемонстрированы области использования оборудования в зависимости от вида хроматографического разделения и размеров используемых колонок.

Ключевые слова: хроматограф низкого давления, хроматография белков, ионообменная хроматография, гидрофобная хроматография, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография.

Благодарности: работа выполняется при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ по развитию отечественного научного приборостроения, шифр темы: «Хроматограф» (соглашение от 17 января 2024 г. №075-03-2024-414 с дополнительным соглашением от 31 июля 2024 г. # 075-03-2024-41412).

Для цитирования: Карасев В.С., Андержанов Р.А., Кирьянов А.Ю., Каламбет Ю.А., Зоров И.Н., Староверов С.М., Буряк А.К. Отечественный хроматограф низкого давления для разделения белков// *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2025. Т. 25, № 5. С. 651-663. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13415>

Original article

Low-pressure chromatograph for protein separation

Victor S. Karasev^{1,2}, Rushan A. Anderzhanov¹, Andrey Yu. Kiryanov²,
Yuri A. Kalambet^{1,3}, Ivan N. Zorov⁴, Sergey M. Staroverov^{2,4}✉, Aleksey K. Buryak¹

¹Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Moscow, Russian Federation

²JSC BioChemMac ST, Moscow, Russian Federation, staroverov@bcmst.ru✉

³LLC Ampersand, Moscow, Russian Federation

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The paper is devoted to the study of the capabilities of a new domestic laboratory low-pressure chromatograph designed for the separation and preparative isolation of proteins by various chromatographic

methods. The equipment operates in isocratic and gradient modes using ultraviolet and conductometric detectors. A built-in fraction collector with a changing valve makes it possible both to collect a target fraction and to run a cyclic program for the production of the substance with intermediate regeneration of the chromatographic column. The sample can be either injected or pumped in using a separate line. The domestic software package Multichrom Axioma is used to control the equipment and to record data.

The conducted study showed that the device allows implementing all the main methods of protein separation: ion exchange, hydrophobic, affinity, and size-exclusion chromatography. The paper demonstrates the scope of use of the equipment depending on the type of chromatographic separation and the size of the used columns.

Keywords: low-pressure chromatograph, protein chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, affinity chromatography, size exclusion chromatography.

Acknowledgments: the work is carried out with the financial support of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation for the development of domestic scientific instrumentation, the cipher of the topic: Chromatograph (Agreement dated January 17, 2024 No. 075-03-2024-414 with additional agreement dated July 31, 2024 No. 075-03-2024-41412).

For citation: Karasev V.S., Anderzhanov R.A., Kiryanov A.Yu., Kalambet Yu.A., Zorov I.N., Staroverov S.M., Buryak A.K. Low-pressure chromatograph for protein separation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2025. 25(5): 651-663. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2025.25/13415>

Введение

Работа посвящена изучению возможностей нового отечественного лабораторного хроматографа низкого давления, предназначенного для разделения и препаративного выделения белков различными хроматографическими методами.

Оборудование обеспечивает работу в изократическом и градиентном режимах с использованием ультрафиолетового и кондуктометрического детекторов. Наличие встроенного коллектора фракций на базе переключающего крана позволяет собирать не только целевую фракцию, но и реализовать циклическую программу наработки вещества с промежуточной регенерацией хроматографической колонки. Ввод образца может быть осуществлен инжектором или через насос по отдельной линии. Управление оборудованием и регистрация полученных данных осуществляется отечественным программным комплексом «Мультихром Аксиома».

Экспериментальная часть

Растворители, реагенты и стандартные образцы. Экспериментальные исследования проводили с использованием следующих реактивов: фосфат натрия (Acros organics, Бельгия), Бис-Трис (Sigma, Австралия), ЭДТА (Panreac, Испания),

натрий лимоннокислый, кислота уксусная, хлорид натрия, сульфат аммония, гидроксид натрия, фосфорная кислота, соляная кислота, никель хлористый (ч.д.а., Россия), имидазол (для синтеза, Россия). Деионизированную воду получали с помощью системы водоподготовки Milli-Q (Millipore, США). Подвижные фазы и рабочие растворы готовили растворением необходимых навесок в деионизованной воде, с последующей фильтрацией через 0.2 мкм фильтр и дегазацией.

Оборудование. Взвешивания сухих реагентов проводили на весах “CAS MWP” (Cas corporation, Южная Корея). Для измерения pH использовали иономер «Эксперт-pH» (Эконикс Эксперт, Россия), для дозирования жидкостей использовали автоматические дозаторы 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (LABMATE, Польша). Для качественного анализа белковых смесей использовали электрофорез в денатурирующих условиях (ячейка Mini-PROTEAN Tetra, источник питания PowerPac Basic300V (Bio-Rad Laboratories, США). Для измерения электропроводности использовали кондуктометр «Эксперт-002» (Эконикс-Эксперт, Россия).

Разделение белков при низком давлении проводили с использованием макета

Таблица 1. Основные характеристики сорбентов

Table 1. Main characteristics of the sorbents

№	Наименование сорбента, носитель	Лиганд	Размер, мкм	Диапазон pH	Макс. давл., эксплуатации, бар
1	Protein A 6FF (Galak), агароза	Protein A	60 - 90	2-12	3
2	Ni NTA 6FF (Galak), агароза, 6%	Ni-NTA	90	3-12	5
3	Biokal Q SepFast HighRes Plus (Bio- kal), агароза+декстран	$N^+(CH_3)_3$	20 - 50	3-12	3
4	Helios 30 Q (LT Biotech), PS/DVB	$N^+(CH_3)_3$	30	2-12	40
5	Source 15Q (Cytiva), PS/DVB	$N^+(CH_3)_3$	15	2-12	40
6	Uni HR Butyl-30S, (Nanomicro), метакрилат	Butyl	35	2-12	8
7	Superdex 75 Prep, (Cytiva), агароза	-	47	3-12	4

хроматографической системы с условным названием Аксиома Дебют. В качестве сравнения при проведении ионообменной хроматографии белков использовали хроматографическую систему высокого давления АКТА Purifier (Cytiva, Швеция), включающую два насоса высокого давления P900, градиент-миксер на стороне высокого давления, фотометрический и кондуктометрический детекторы, узел ввода пробы и коллектор фракций. Сорбционные материалы и их характеристики представлены в таблице 1.

Аффинная хроматография. Аффинную хроматографию с сорбентом с иммобилизованным Protein A проводили в Tris-HCl буферных системах. Металл-хелатную на сорбенте с никелем - в фосфатных буферных системах, ступенчатое элюирование осуществляли с использованием растворов имидазола с концентрациями 20 и 400 мМ. Использовали колонки размером 7.3×25 мм объемом 1 см³. Скорости потока 1-2 см³/мин.

Ионообменная хроматография. Хроматографию проводили при стартовом pH 6.7 в 20 мМ буфере Бис-Трис/HCl, элюирование осуществляли в градиенте хлорида натрия от 0 до 400 мМ при потоках 1-2 см³/мин на колонках размером 7.3×25 мм объемом 1 см³ (носитель Helios 30 Q) и 10×100 мм объемом 8 см³ (носители Biokal Q и Source 15Q).

Гидрофобная хроматография. Хроматографию проводили на колонке размером 24×150 мм (65 см³) в условиях холодной комнаты при температуре 4-6°C. Стартовая концентрация сульфата аммония – 1.5М, pH 6,0. Элюирование осуществляли путем снижения содержания сульфата аммония ступенчатым градиентом при потоке 9 см³/мин.

Эксклюзионная хроматография. Эксклюзионную хроматографию проводили в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0 с добавлением 200 мМ NaCl на колонке размером 8×500 мм при потоке 0.4 см³/мин.

Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография. ВЭЖХ-анализ проводили на хроматографе Wellchrom (Кнауер, Германия) с детектированием при длине волны 220 нм и термостатированием при 30°C, петля 20 мкл. Использовали колонку 4×150 мм с сорбентом Диасфер 300-S4, 6 мкм. Поток – 1 см³/мин. Градиентное элюирование осуществляли с элюентами А (0.1% раствор трифторуксусной кислоты в воде) и В (0.1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле) по следующей программе: 0-12 мин – 20-50%B; 12-16 мин – 50%B; 16-17 мин – 50-70%B; 17-20 мин – 70%B; 20-21 мин – 70-20%B; 21-30 мин – 20%B. Поток – 1 см³/мин.

Обсуждение результатов

Хроматографическая очистка природных и рекомбинантных белков является

важнейшей стадией при изучения биохимических и каталитических свойств ферментов, антител, функциональных полипептидов, при производстве современных высокоочищенных фармацевтических препаратов для таргетной терапии, производства диагностикумов, чистых белков для аналитического и технического применения.

Благодаря развитию биотехнологий, в последние годы в клинической практике используется все больше подобных лекарственных средств, включающих цитокины [1] (интерфероны, эритропоэтины, колониобразующие факторы), гормоны [2, 3] (инсулины, соматотропин, группа половых гормонов), коагулянты, в том числе факторы свертывания крови [4], ингибиторы протеинкиназ, моноклональные антитела, вакцины, антибиотики и бактериофаги [5].

Белковая молекула, произведенная в чужеродной клетке-хозяине, может быть получена с примесями, в том числе с фрагментами ДНК клетки-хозяина, ее белками, полисахаридами и эндотоксинами. Применение препаратов с указанными контаминациями чревато серьезными осложнениями в области иммунопатологии [6]. Недостаточная чистота целевых белковых молекул может значительно снизить эффективность применения препарата при использовании в медицинской или технической сферах, или исказить результаты анализа при использовании белков или ферментов в составе диагностических или аналитических систем.

Практически во всех случаях требуется одна или несколько стадий очистки для достижения требований Фармакопеи по содержанию примесей, причем именно хроматографическая очистка, зачастую, обеспечивает быстрое и наиболее эффективное удаление нежелательных примесей с получением белкового препарата заданной чистоты. Это же относится и к препаратам, полученным из природных источников, например, из

плазмы крови. В случае получения свободного от вирусов, высокоочищенного иммуноглобулина, технология включает три стадии хроматографической очистки разными методами [7]. Выделение ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы из культуральной жидкости соответствующих микроорганизмов в чистом виде, необходимых для количественного определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях включает 2-3 стадии хроматографического разделения [8]. Проведение направленной белковой инженерии ферментов невозможно без эффективных методов их выделения и изучения свойств [9].

Методы хроматографической очистки белков различаются по требованиям к химической природе сорбентов, их структурно-геометрическим характеристикам, а также условиям проведения процесса. В большинстве случаев используют сорбенты на основе мягких гелей, работающих при низких давлениях, что обеспечивает возможность использовать хроматографы низкого давления на основе перистальтических насосов. Важным моментом является устойчивость матрицы сорбента к щелочным значениям pH, которые применяются для отмывки сильно сорбируемых примесей и восстановления функциональности сорбента. Поэтому использование хроматографических матриц на полимерной или полисахаридной основе является приоритетным решением при проведении выделения белков из различных природных источников.

Разработанная хроматографическая система позволяет решить большинство задач, встречающихся в процессе очистки и выделения целевых белков, не прибегая к использованию более дорогих хроматографических систем высокого давления. В конструкции прибора и обслуживающего программного обеспечения на основе ПО Мультихром реализованы многолетний опыт и наработки коллектива разработчиков в области аналити

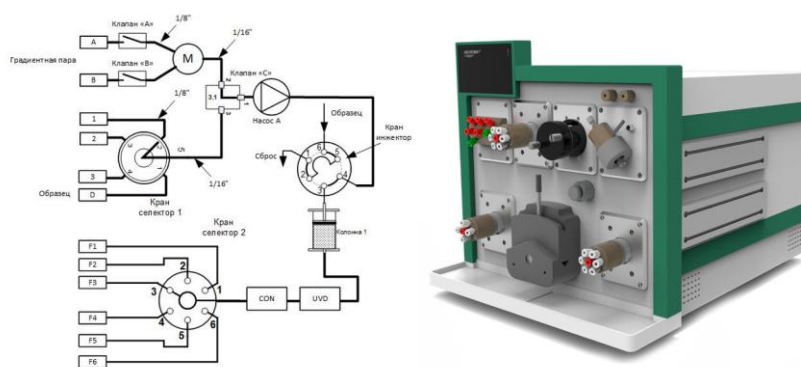


Рис.1. Гидравлическая схема и общий вид хроматографа
Fig. 1. Hydraulic circuit and overview of the chromatograph

ческой и препаративной белковой хроматографии. На рис.1 представлен общий вид хроматографа и его гидравлическая схема.

Перистальтический насос низкой пульсации обеспечивает подачу элюента от 0.1 до 25 см³/мин (при промывках до 50 см³/мин) при давлении до 0.2 МПа. Градиентная пара создается клапанами, расположенными перед насосом, а переключающий кран предназначен для подачи образца (минуя камеру смешения) и от 3 до 5-ти различных буферных растворов при реализации сложных схем разделения в зависимости от количества портов в кране. Подачу образца можно осуществлять и через кран-инжектор. Такая схема позволяет увеличить функциональные возможности прибора для формирования градиентов при разделении сложных образцов или при автоматизации процесса рутинного разделения образцов по сравнению с известным и прекрасно зарекомендовавшим себя на рынке хроматографических систем низкого давления АКТА Start. По сравнению с известной системой расширен диапазон рабочих скоростей элюента (от 5 до 25 см³/мин) и в системе присутствует встроенный коллектор фракций на основе переключающего крана. Это позволяет увеличить производительность, используя колонки диаметром 24 мм (объем сорбента до 100 см³).

Детектирование осуществляется УФ-монитором при 280 нм, на основе светодиода, контроль проводимости регистрируется кондуктометром. Компоновка

прибора позволяет расширить возможности детектирования за счет установки дополнительного проточного рН-метра и/или УФ-детектора с переменной длиной волны, как на базе мануального фильтрового фотометра, так и с использованием спектрофотометрического детектора с изменяемой длиной в диапазоне 190-600 нм. Вес хроматографа 40 кг, габаритные размеры 650х650х650 мм.

Характеристики прибора обеспечивают использование колонок диаметром от 5 до 24 мм с размером частиц сорбента от 30 мкм и выше. Гидравлическая схема и программное обеспечение позволяют реализовать различные методы разделения белков, включая циклическую схему наработки целевого продукта с промежуточной регенерацией колонки в автоматическом режиме, что позволяет значительно повысить выходы целевого продукта без затрат на дорогостоящие сорбенты и колонки большого объема.

Хроматографическая система разработана в комплектации, максимально привязанной к запросам и задачам заказчика, с предварительно установленным и сконфигурированным ПО «МультиХром Аксиома». ПО основано на хорошо известной российской программе для хроматографии «МультиХром» [10] версии 4 и работает как в операционной среде Windows (версии 7, 10, 11), так и на компьютерах под управлением ОС Астра Линукс. К стандартным функциям ПО МультиХром добавлены управляющие модули,

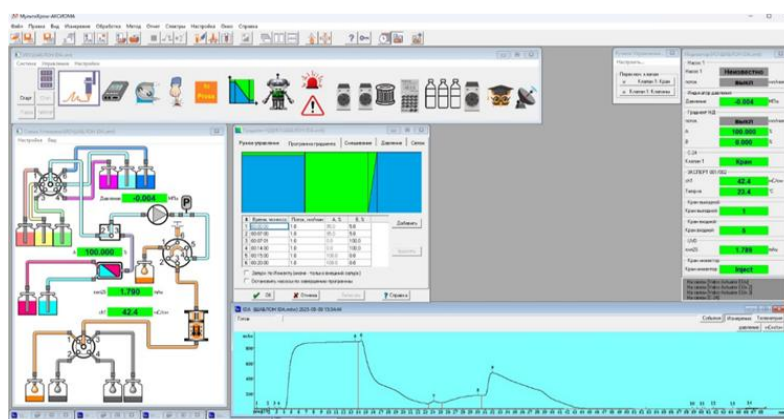


Рис.2. Вид рабочего пространства программного обеспечения
Fig. 2. Overview of the software workbench

специфические для препаративной белковой хроматографии: переключатели кранов и клапанов, управление детекторами и коллектором фракций, датчики аварий, схемы управления цифровыми линиями и насосами с ПИД регуляторами, преобразователи сигналов. Жидкостная схема хроматографа отображается на экране и онлайн визуализирует потоки элюента, положение кранов и клапанов, параметры хроматографической системы, показания детекторов, систем ввода образца и сбора фракций. Управление хроматографической системой возможно, как в программируемом, полностью автоматическом, так и в ручном режиме.

Функции ПО поддержаны платой управления хроматографа, в составе которой имеется три АЦП, семь вариантов цифровых выходов с частотной и широтно-импульсной модуляцией, входные/выходные каналы, счетные каналы, подключение дополнительных устройств по шине I2C. Такая конфигурация прибора дает широкие возможности для наращивания функционала, позволяет, в дальнейшем, проводить модернизацию и подключать дополнительные модули в зависимости от возникающих задач. В состав хроматографа входит информационная панель, на которую выводятся основные параметры хроматографической установки и некоторые элементы управления хроматографом (рис.2).

Программное обеспечение можно использовать не только для управления прибором и обработки результатов хроматографического анализа. Оно может быть настроено для выделения определенных компонентов на базе анализа параметров хроматографических пиков, так и для выделения целевого вещества в ходе многократного автоматического ввода и выполнения разделения с регенерацией колонки без непосредственного участия оператора. Детектор пиков срабатывает по комбинации уровня сигнала и/или производной, что позволяет разделять вещества при невысоком разрешении хроматографических пиков или разделять пики даже когда они не достигают уровня заданной базовой линии. Процесс можно приостановить, изменить параметры вручную и продолжить разделение, что удобно в процессах отработки параметров разделения и фракционирования. При работе ПО записываются протоколы действия пользователя, измеряемые сигналы и команды управления (след аудирования) для соответствия стандартам GLP.

ПО может быть гибко настроено на конкретное разделение, реакцию на выход параметров за допустимые пределы, прецизионную обработку полученных хроматограмм, выдачу отчетов в требуемом формате и другие функции. В базовом ПО «МультиХром» реализован ряд

уникальных технологий обработки данных, позволяющих поднять прецизионность и надежность хроматографического анализа [11-13].

Программное обеспечение «Мульти-Хром Аксиома» обеспечивает целостность данных, надежную идентификацию оператора, возможность смены оператора во время проведения процесса разделения белковой смеси или анализа. Есть поддержка валидационных процедур, включая валидацию системы (IQ/OQ/PQ), валидацию методик и самого ПО.

Аффинная хроматография белков

Наиболее специфичным методом, отличающим хроматографию белков от других хроматографических методов, является аффинная хроматография. Аффинная хроматография с использованием сорбентов с закрепленными на поверхности Белком А или Г является важнейшим этапом очистки моноклональных антител, на базе которых создаются новейшие эффективные лекарственные препараты направленного действия. В настоящей работе на модельной смеси иммуноглобулина G (IgG) и альбумина мы изучили возможность использования хроматографической системы с колонкой на основе Белка А, включая стабильность процесса при циклической наработке продукта.

Процесс выделения и очистки состоит из следующих основных стадий: уравнивание колонки, нанесение образца и его пропускание через сорбент с закрепленным Белком А, промывка сорбента для удаления слабо связанных с сорбентом компонентов, элюирование IgG с использованием буферов с различными физико-химическими свойствами для диссоциации антигена и антитела, элюирования прочих примесей и регенерация сорбента путем промывки его растворами с возвращением в исходное состояние для проведения следующего цикла выделения.

Хроматографию смеси IgG (1 мг/см³) и альбумина (5 мг/см³) проводили на ко-

лонке объемом 1 см³ (7.3x25 мм), заполненной сорбентом Protein A 6FF Galak (Китай). Образец в Элюенте А объемом 13 см³ наносили насосом со скоростью 1 см³/мин. С такой же скоростью проводили последующие хроматографические стадии и промывки. Использовали четыре буферных раствора следующего состава:

Элюент А: 20 mM Na₂HPO₄; 0.15M NaCl pH 7.4 – стартовый буфер

Элюент В: 0.1M глицин-HCl pH 2.5 – элюирование IgG

Элюент С: 0.1M NaOH – промывка от прочих сильно связавшихся примесей

Элюент D: вода – отмывка и подготовка к регенерации

Процесс осуществляли по следующей программе: 0-13 мин нанесение образца, 13-23 мин – Буфер А; 23-31 мин – Буфер В; 31-35 мин – Буфер D; 35-40 мин – Буфер С; 40-45 мин – Буфер D; 45-55 мин – Буфер А. Нанесение, очистку и сбор образца осуществляли в автоматизированном циклическом режиме, количество циклов 20, рис. 3.

Из хроматограмм на рис.3 видно, что результат разделения практически не изменяется в течение двадцати циклов процесса и целевой продукт по данным электрофореза полностью свободен от альбумина как после первого, так и после двадцатого цикла очистки. Следует отметить также, что с использованием циклического режима приблизительно за 20 часов удастся наработать 250 мг IgG на колонке объемом 1 см³. Иммуноглобулин выделяется узкой хроматографической зоной с концентрацией 5 мг/см³. Учитывая, что емкость сорбента составляет 35 мг/см³, на колонку можно наносить до 35 см³ исходного раствора IgG с концентрацией 1 мг/см³, что потенциально повышает производительность более, чем в два раза. Технические характеристики хроматографической системы позволяют использовать колонки объемом 100 см³ и более (колонки диаметром 24 мм), что

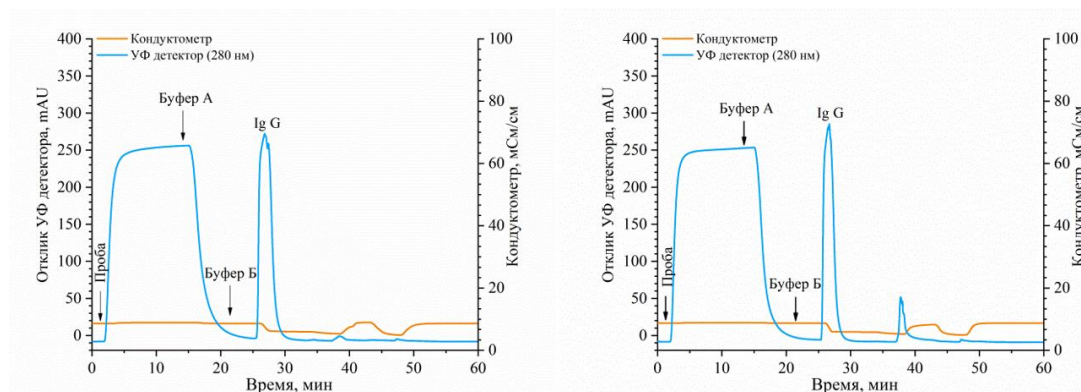


Рис.3. Хроматограммы выделения IgG на колонке Protein A 6FF объемом 1 см³.
 Слева 1-й цикл, справа – 20-й цикл

Fig. 3. Chromatograms of IgG isolation on the 1 ml Protein A 6FF column. 1st cycle (left), 20th cycle (right).

обеспечивает наработку значительных количеств IgG, достаточных не только для научных исследований, но и для получения пилотных партий высокоочищенных иммуноглобулинов.

Другой широко используемый метод аффинной хроматографии – это металл-хелатная хроматография. Для реализации метода биотехнологический процесс синтеза целевого белка проводят с использованием конструкции, обеспечивающей пришивку нескольких остатков гистидина (обычно 6 аминокислот) на С- или N-конце молекулы целевого белка. Такая полигистидиновая последовательность способна прочно связываться с ионами переходных металлов, например, никеля.

В качестве сорбента для связывания используют сефарозу или другой носитель с закрепленными лигандами иминодиуксусной (Ni-IDA) или нитрилотриуксусной (Ni-NTA) кислоты, которые эффективно связывают ионы никеля с образованием хелатного комплекса.

Процесс выделения и очистки состоит из следующих основных стадий: насыщения сорбента ионами никеля (при необходимости), промывки колонки для удаления избыточного раствора никеля, нанесения сырья, в процессе которого целевой белок, содержащий полигистидиновый фрагмент связывается с ионами никеля, образуя смешанный хелатный комплекс, промывки колонки для удаления

слабо связанных с поверхностью белков и других примесей, элюирования целевого белка с использованием буферного раствора, как правило, содержащего имидазол, который разрушает хелатный комплекс, регенерации сорбента путем промывки его буферными растворами и возвращение в исходное состояние.

Такой метод обеспечивает уже на первой стадии выделения достаточно высокую степень очистки и отделение от большинства примесей, мешающих эффективной хроматографии на следующих стадиях. В опыте использовали сульфатный осадок, полученный после разрушения биомассы с рекомбинантным соматотропином. 2 г осадка растворяли в 20 см³ элюента А, фильтровали последовательно через фильтры 20 мкм и 0.45 мкм. Образец объемом 13 см³ с концентрацией 2 мг/см³ наносили насосом со скоростью 1 см³/мин на колонку объемом 1 см³ (7.3 x 25 мм), заполненную сорбентом Ni-NTA 6FF Galak (Китай). С такой же скоростью проводили хроматографию. После нанесения образца колонку отмывали элюентом А, целевой белок элюировали элюентом В.

Элюент А: 20 mM натрий-фосфатный 0.5 M NaCl 30 mM имидазол, pH 8,2, 48 мСм/см

Элюент В: 20 mM натрий-фосфатный 0.5 M NaCl 0.3 M имидазол, pH 8.2, 49.9 мСм/см.

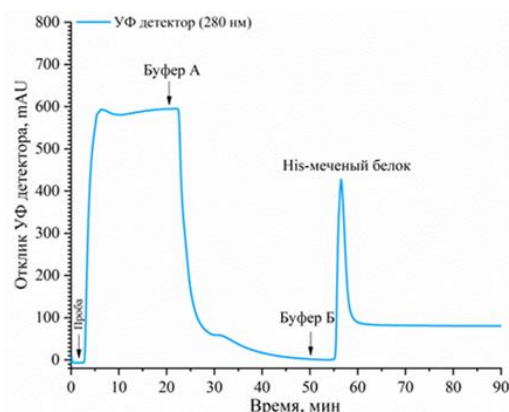


Рис.4. Металл-хелатная хроматография His-меченного белка.
Колонка 1 см³ с сорбентом Ni-NTA 6FF Galak
Fig. 4. Metal chelate chromatography of His-tagged protein.
1 ml column with a Ni-NTA 6FF Galak sorbent

На рис. 4 представлены результаты разделения His-меченного белка, которые демонстрируют эффективное извлечение целевого компонента из смеси. Белок выделяется узкой фракцией с концентрацией 5-7 мг/см³.

Таким образом, можно говорить об эффективном использовании хроматографа низкого давления для целей аффинной хроматографии как по селективности разделения, так и по нагрузкам. В таком процессе важнейшую роль играют характеристики сорбента и объем хроматографической колонки, а хроматограф низкого давления обеспечивает сопоставимый результат с хроматографическими системами высокого давления.

Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография широко применяется в процессах выделения и очистки белков. Ее используют как для предварительной очистки и концентрирования, так и на более поздних стадиях для тонкой очистки целевого вещества. Разрешающая способность процесса зависит также от характеристик сорбента. Нами проведены сравнительные исследования трех сорбентов различных производителей, характеристики которых представлены в таблице 1. Это сорбент Helios 30Q в колонке объемом 1 см³, сорбент Q SepFast HighRes Plus 10x90 мм

объемом 7 см³ и аналогичная колонка с сорбентом Source 15Q.

Изучение проводили на примере разделения лиофильно высушенной культуральной жидкости микроцета *Penicillium verruculosum* с клонированным геном β-ксилозидазы. Образец с предварительно обессоленной и переведенной в элюент А культуральной жидкостью с концентрацией 2 мг/см³ общего белка наносили на хроматографические колонки из расчета 10 мг белка на 1 см³ геля.

Элюент А: 10 мМ Бис-Трис/НСl, рН 6.7;

Элюент В: 10 мМ Бис-Трис/НСl + 0.4 М NaCl, рН 6.7.

Образец наносили в стартовом элюенте А, промывали до установления базовой линии, градиентное элюирование проводили от 0 до 225 мМ NaCl за 20 объемов колонки, затем проводили элюирование оставшихся белковых примесей ступенчатым подъемом концентрации NaCl до 400 мМ. Разделение на носителях Helios 30Q и Q SepFast HighRes Plus проводили с использованием разработанной хроматографической системы, а на носителе Source 15Q – системы AKTA Purifier 100 высокого давления. На рис. 5 представлены хроматографические профили разделения, полученные на хроматографических системах низкого и высокого

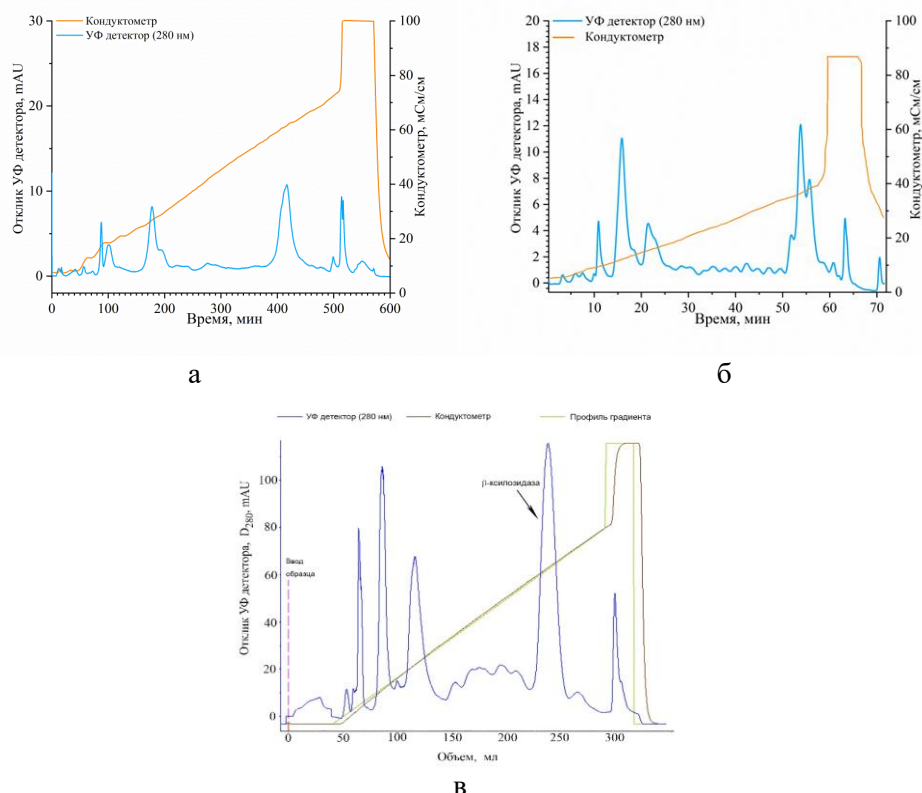


Рис. 5. Ионообменная хроматография культуральной жидкости *P. verruculosum* с клонированным геном β -ксилозидазы на колонке Biokal Q SepFast HighRes Plus CV 7 см³ (слева), Helios 30Q CV 1 см³ (в центре) и Source 15Q, 7 см³ (справа)

Fig. 5. Ion exchange chromatography of the *P. verruculosum* culture liquid with cloned β -xylosidase gene on the 7 ml Biokal Q SepFast HighRes Plus CV (left), 1 ml Helios 30Q CV (centre), and 7 ml Source 15Q (right) column

давления, в условиях, обеспечивающих наилучшее разрешение компонентов.

Из представленных результатов видна важность сравнительных исследований сорбентов однотипных по функциональной группе. Так на колонке с сорбентом Helios 30Q с частицами 30 мкм при работе при низком давлении за счет большей селективности сорбента получено лучшее разделение, чем на колонке с сорбентом Source 15Q с частицами 15 мкм, требующей использования высокого давления.

Гидрофобная хроматография

Гидрофобная хроматография как правило применяется на стадии тонкого разделения белков. В качестве примера использования мы провели разделение протеолитических проферментов трипсиногена и химотрипсиногена, полученных из экстракта эндокринного сырья после

предварительной очистки ионообменной хроматографией. Разделение в режиме гидрофобной хроматографии проводили на колонке размером 24 x 150 мм (68 см³) с гидрофобным сорбентом UniHR Butyl 30S. Процесс осуществляли в холодной комнате для демонстрации возможности работы прибора в условиях низких температур.

Раствор проферментов в цитратном буфере (0.02M со стадии ионного обмена) содержит 0.37M хлорида натрия. В раствор добавили 1.28M сульфата аммония до электропроводности 194 мСм/см (Буфер А). Хроматографию проводили в этом буфере до удаления основной примеси, затем элюировали трипсиноген буфером Б (Na-цитратный буфер с добавлением сульфата аммония до 104 мСм/см. После элюирования трипсиногена буфер

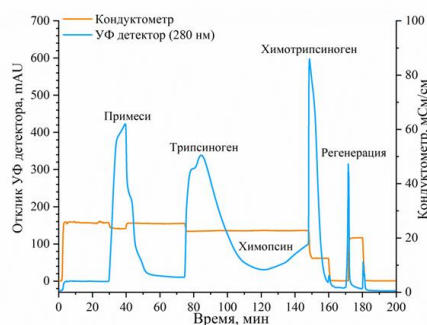


Рис. 6. Гидрофобная хроматография протеолитических проферментов на колонке 24x150 мм с сорбентом UniHR Butyl 30S, поток 9 см³/мин.

Fig. 6. Hydrophobic chromatography of proteolytic proenzymes on a 24x150 mm column with the UniHR Butyl 30S sorbent, flow rate: 9 ml/min

меняли на буфер С, содержащий цитрат натрия 0.02М с сульфатом аммония до 56 мСм/см и элюировали химотрипсиноген. ВЭЖХ анализ полученных фракций показывает, что метод позволяет выделить проферменты в индивидуальном виде с чистотой от 90 до 93% и нагрузкой 30-35 мг/см³ сорбента, что соответствует 2.5 г за один хроматографический цикл.

Гель-хроматография и обессоливание

Важными методами, используемыми на различных стадиях хроматографической очистки белков, являются процессы, основанные на разделении компонентов по их размерам. Такие подходы исключительно важны для удаления солей при подготовке к стадии ионного обмена (нагрузка до 30% от объема колонки), для группового разделения белков при нагрузках до 20% от объема колонки или для финишной очистки целевого белка с нагрузками на уровне 2%. Процесс финишной очистки может быть совмещен с заменой состава растворителя для подготовки конечной формы препарата.

Гель-хроматография высокого разрешения обычно реализуется на длинных колонках (20-50 см), заполненных сорбентами с частицами 10-15 мкм, что требует применения хроматографа среднего

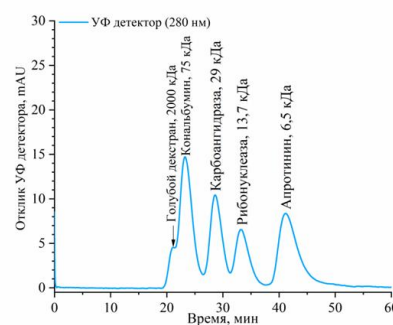


Рис. 7. Гель-хроматография хроматография белков на колонке 8x500 мм с сорбентом Superdex 75 Prep

Fig. 7. Gel chromatography of protein on an 8x500 mm column with the Superdex75 Prep sorbent.

или высокого давления. Однако и на хроматографе низкого давления можно получить представление о молекулярно-массовом распределении на сорбентах с зернением более 30 мкм.

На рис.7 представлена хроматограмма разделения белков с молекулярными массами от 6.5 до 75 кДа: кональбумин (75 kDa), карбоангидраза (29 kDa), рибонуклеаза (13.7 kDa) и апротинин (6.5 kDa). Хроматографический профиль демонстрирует достаточно высокую степень разрешения, что позволяет решать такие задачи, как оценка молекулярной массы или отделение димера белка от его мономера.

Заключение

Представленные результаты демонстрируют, что разработанный отечественный лабораторный хроматограф низкого давления позволяет реализовать все традиционные методы хроматографического выделения и очистки белков: аффинную, ионообменную, гидрофобную и гель-хроматографию, в том числе в условиях пониженной температуры.

Конструкция и гидравлическая схема прибора Аксиома Дебют в сочетании с программным обеспечением «Мульти-хром Аксиома» обеспечивает работу в ручном и автоматическом режимах, а

также позволяет реализовывать многократную циклическую процедуру очистки и выделения целевых белков для препаративной или рутинной наработки. Объем колонок может варьироваться в диапазоне двух порядков – от 1 до 100 см³, что вместе с возможностью реализации циклического процесса позволяет обеспечить наработку значительных количеств белка.

Использование разработанной хроматографической системы в сочетании с хроматографическими сорбентами с размером гранул около 30-100 мкм позво-

ляет эффективно, быстро и недорого проводить разделение целевых белков методами аффинной, ионообменной и гидрофобной хроматографии, а также проводить обессоливание и оценку молекулярных масс белков методом гель-проникающей хроматографии.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

743. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12512>.

8. Shin K.S, Youn H.D., Han Y.H., Kang S.O., Hah Y C. *Eur. J Biochem.* 1993; 215(3): 747-52.

9. Dotsenko A., Denisenko Ju., Zorov I. *J.Molec. Graph. and Model.* 2023; 119: 108381.

10. Kalambet Yu.A. Svidetel'stvo o gosudarstvennoj registracii programmy dlya E`VM: 2018616410. 2018. (In Russ.)

11. Kalambet Y.A., Kozmin Y.P., Perelroysen M.P. *J. Chromatogr. A*, 1991; 542: 247-261.

12. Kalambet Y.A. *J. Chemom.* 2011; 25(7): 352-356.

13. Kalambet Y.A., Kozmin Y.P. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssy.* 2024; 24(6): 944-955. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12571>

Список литературы/References

1. Razaghi A, Owens L, Heimann K. *J Bio-technol.* 2016; 240: 48-60.

2. Araki E, Araki H, Senokuchi T, Moto-shima H. *J Diabetes Investig.* 2020; 11(4): 795-797.

3. Richmond E., Rogol A. *Best Pract. Res Clin Endocrinol Metab.* 2016; 30(6): 749-755.

4. Raso S, Hermans C. *Drugs Today (Barc).* 2018; 54(4): 269-281.

5. Bogomolova E.G., Kopejkin P.M., Tagaev A.A. *Medicinskij akademicheskij zhurnal.* 2020; 20(3): 49-60. (In Russ.)

6. Schmetzer O., Moldenhauer G., Riesenberger R. *J. Immunol.* 2005; 174(2): 942-952.

7. Karasev, V.S., Bochkova, O.P., Staroverov, S.M., Ivanov, A.V., Pytskiy, I.S., Buryak, A.K. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssy.* 2024; 24(5): 735-

Информация об авторах / Information about the authors

В.С. Карасев – к.б.н., старший научный сотрудник Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина и АО «Биохиммак СТ», Москва, Россия

Р.А. Андержанов – инженер Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина, Москва, Россия

А.Ю. Кирьянов – научный сотрудник АО «Биохиммак СТ», Москва, Россия

Ю.А. Каламбет – к.ф.м.н., старший научный сотрудник Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина, генеральный директор ООО «Амперсанд», Москва, Россия

V.S. Karasev – Ph.Doc, (biology) Senior Researcher, Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin” and JSC “Biochemmack S&T”

R.A. Anderzhanov – Engineer, Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”

A.Yu. Kirianov – Research Associate, JSC “Biochemmack S&T”

Yu.A. Kalambet – Ph.Doc, (Physics and Mathematics), Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”; general director “Ampersand” LLC



И.Н. Зоров – к.х.н., ведущий научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

С.М. Староверов – д.х.н, заведующий лабораторией Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, президент АО «БиоХимМак СТ», Россия

А.К. Буряк – проф., д.х.н., член-корреспондент РАН, директор ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина, Москва, Россия

I.N. Zorov – Ph.Doc, (chemistry), Leading Researcher, Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

S.M. Staroverov – Dr.Sci. (Chemistry). Head of the laboratory of the Department of Chemistry M.V.Lomonosov Moscow State University; president of JSC “Biochemmack S&T” e-mail: staroverov@bcmst.ru

A.K. Buryak – Director of the Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”, Corresponding member of RAS. Moscow, e-mail: akburyak@mail.ru

Статья поступила в редакцию 02.05.2025; одобрена после рецензирования 30.10.2025; принята к публикации 02.11.2025.

The article was submitted 02.05.2025; approved after reviewing 30.10.2025; accepted for publication 02.11.2025.