



УДК 547.962;578.088;543.544

**УЛЬТРАМИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА
ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ
СУБЪЕДИНИЦ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ *****Беленький В. Г., Ганкина Э. С., Аниськова М. А.,
Аникина Т. Б., Красовский А. Н.***Институт высокомолекулярных соединений Академии Наук СССР,
Ленинград*

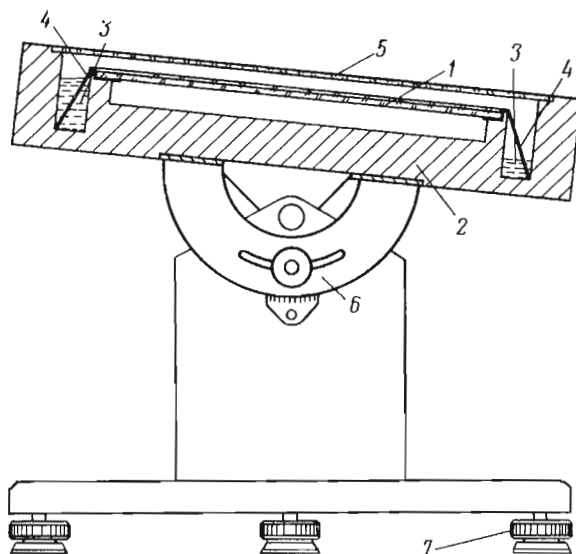
Разработана методика определения МВ пептидных цепей белка в диапазоне $1,5 \cdot 10^4$ — $6 \cdot 10^4$ с помощью ТСГХ на сефадексе G-150 и G-200 (в 2%-ном ДСН) люминесцирующих ДНС-пептидов, полученных при денатурации белка в 2%-ном ДСН с β -меркаптоэтанолом. Чувствительность методики позволяет, исходя из 100 мкг белка, определить его МВ с точностью 5–6% (из десяти определений). Для определения МВ в диапазоне 10^3 – 10^5 предлагается ТСГХ на сефадексе G-75 G-200 (в 5М Gu·HCl) KM-пептидов, полученных при денатурации белка в 5М Gu·HCl с β -меркаптоэтанолом и последующей обработкой йодуксусной кислотой. Эта методика в 10 раз менее чувствительна, чем методика с ДСН.

Среди микрометодов определения МВ белка основную роль играют электрофорез в полиакриламидном геле [1, 2] и ТСГХ [3, 4]. Успехи электрофореза в повышении чувствительности определения МВ белка общеизвестны, однако отсутствие строгих теоретических соотношений между МВ белка и его электрофоретической подвижностью, в том числе и в случае электрофореза в растворах ДСН [5, 6], делает электрофоретическую методику определения МВ белка недостаточно надежной. Определение МВ нативных белков с помощью гель-хроматографии также может давать неточные результаты, поскольку многие белки отличаются по форме глобул, а некоторые белки, например лизоцим, специфически взаимодействуют с сефадексом.

Положение изменяется, если ТСГХ подвергать не нативный белок, а белок, денатурированный в растворах мочевины, Gu·HCl или ДСН. В этом случае денатурированные белковые молекулы имеют клубкообразную (в растворах мочевины и Gu·HCl [7]) и стержневидную (в ДСН при МВ $1,5 \cdot 10^4$ [8]) форму, которая не зависит от природы белка, и наблюдается однозначная связь между хроматографической подвижностью белка и его МВ, предсказанная теоретически [9] и прослеженная в ряде работ по колоночной гель-хроматографии [8, 10, 11] и ТСГХ [12–15]. На этой основе нами была разработана стандартизованная ультрачувствительная

* Принятые сокращения: МВ – молекулярный вес, ТСГХ – тонкослойная гель-хроматография, ДСН – додецилсульфат натрия, Gu·HCl – хлористый гуанидиний, ДНС–Cl – дансилхлорид, АКГГ – адренорегуляторный гормон, L₁, L₂, L₃, L₃₄ – рибосомальные белки, ЛСБ – лейцинсвязывающий белок, ДНС-пептид – дансилпептид, KM-пептид – карбоксиметилпептид.

Рис. 1. Лоток для ТСГХ по типу камеры для проведения хроматографии на пластинках с незакрепленным слоем сорбента из комплекта КТХ-01 (ширина камеры уменьшена до 10 см, паз для хроматографической пластинки увеличен): 1 — стеклянная пластина с сефадексом; 2 — кювета для хроматографии; 3 — элюирующий буфер; 4 — бумажные фитильки для контакта слоя сефадекса с элюирующим буфером (между бумажным фитильком и слоем сефадекса для улучшения контакта заливается пипеткой суспензия сефадекса); 5 — стеклянная крышка, 6 — регулирование наклона кюветы; 7 — регулирование уровня лотка



методика определения с помощью ТСГХ на сефадексе МВ одноцепочных белков и пептидных цепей субъединиц белков, обладающих четвертичной структурой после их денатурации в виде ДНС-пептидов и КМ-пептидов с элюцией соответственно 2%-ным ДСН и 5 М Gu·HCl.

Введение в белок люминесцирующей ДНС-группы дало возможность наблюдать зону, содержащую 5—10 мкг белка, и фотографировать хроматограмму с помощью контактной люминесцентной фотографии [16]. К сожалению, эта чувствительная и удобная методика детектирования оказалась пригодной только при элюции растворами ДСН, поскольку в 5М Gu·HCl ДНС-пептиды не люминесцировали. Для детектирования зон белка (КМ-пептида) в этом элюенте с хроматограммы снимали реплику на хроматографическую бумагу, которую окрашивали 0,1%-ным раствором бромфенолового синего. Чувствительность подобного детектирования составляла 100 мкг.

ТСГХ в 5М Gu·HCl проводили на пластинках с сефадексом G-75 — G-200. Эта методика позволила определять МК КМ-пептидов в диапазоне 10^3 — 10^5 . Для ТСГХ ДНС-пептидов в 2%-ном ДСН использовали сефадекс G-150 и G-200, и нижний предел МВ повышался до $1,5 \cdot 10^4$ (в этой области конформация пептида изменяется с клубкообразной на стержневидную), а верхний предел снижался до $6 \cdot 10^4$, выше которого стержнеобразные молекулы пептида выходят с нулевым объемом. ТСГХ пептидов проводили в специальном лотке (рис. 1). На рис. 2 и 3 показаны фотографии тонкослойных хроматограмм денатурированных белков при элюции ДСН и Gu·HCl. Следует отметить, что зависимость хроматографической подвижности пептидов от МВ более сильно проявляется в растворах ДСН, где размер макромолекул пропорционален $M^{0,73}$, по сравнению с раствором Gu·HCl, где размер молекул пептидов пропорционален $M^{0,555}$ [7].

Скорость движения пептидов по пластинке оценивалась соотношением l_0/l_x , где l_x и l_0 — длина пробега по хроматографической пластинке пептидов, полученных из исследуемого и реперного белков. МВ пептида определяли из зависимости $l_0/l_x - \lg M$ (рис. 4 и 5), которая строилась методом наименьших квадратов с помощью ЭВМ «Мир-2» (программа 1—8.42.2) и представляла полином 2 степени:

$$\lg M = a - b \left(\frac{l_0}{l_x} \right) + c \left(\frac{l_0}{l_x} \right)^2,$$

где a , b и c — коэффициенты (для ТСГХ на сефадексе G-150 в 2%-ном ДСН: $a=8,0$; $b=15,2$; $c=15,0$).

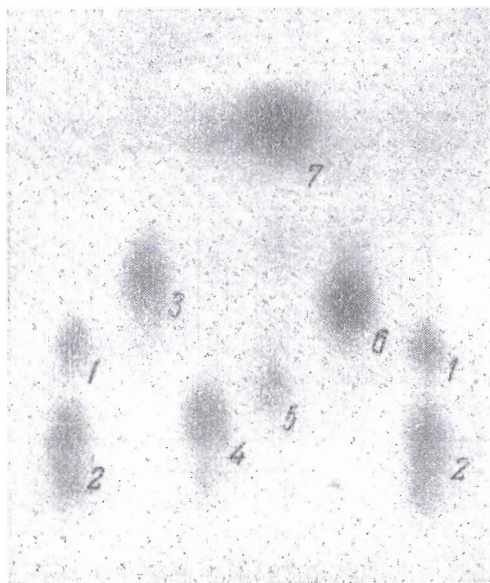


Рис. 2. ТСГХ ДНС-пептидов (5 мкг) в 2%-ный ДСН/0,1 н. NaHCO_3 на сефадексе G-200 «сверхтонкий» (контактная люминесцентная хроматография): 1 — легкая цепь γ -глобулина; 2 — тяжелая цепь γ -глобулина; 3 — гемоглобин; 4 — овальбумин; 5 — ЛСБ; 6 — миоглобин; 7 — ДНС-ОН

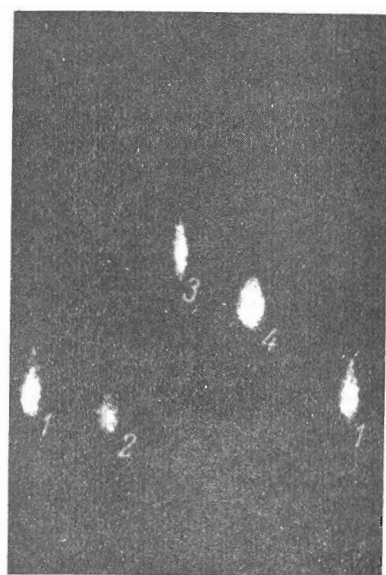


Рис. 3. ТСГХ КМ-пептидов в 5M $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$ /0,01M калий-фосфатном буферном растворе (рН 5,4) на сефадексе G-75 «сверхтонкий» (контактная фотография реплики с хроматограммы): 1 — цитохром С; 2 — рибонуклеаза; 3 — АКТГ; 4 — L_{34}

Погрешность $\Delta M/M$ при расчетах по приведенной формуле составляет 5—6% (для 10 экспериментов) и может быть уменьшена, если использовать минимальные величины l_0/l_x , т. е. выбирать в качестве репера белок наименьшего МВ и проводить большее число опытов.

Таким образом, разработанная методика определения МВ белка в диапазоне $1,5 \cdot 10^4$ — $6 \cdot 10^4$ с помощью ТСГХ ДНС-пептидов в 2%-ном ДСН требует для анализа 100 мкг белка и, следовательно, на порядок более чувствительна, чем наилучшая методика ТСГХ, приведенная в работе [14]. Для белков с $M < 1,5 \cdot 10^4$ нужно использовать менее чувствительную методику ТСГХ в 5M $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$, где на 10 определений расходуется 1 мг вещества (см. таблицу).

МВ одноцепочечных белков, определенные с помощью разработанных методик

Белки	С помощью ТСГХ			По данным работы [18]	
	элюент	на G-150	на G-200	с помощью электрофореза	с помощью седиментации
L_1	2%-ный ДСН	$24\,900 \pm 1000$	$24\,800 \pm 1000$	26 700	22 000
L_2	»	$28\,600 \pm 1100$	$26\,800 \pm 1100$	31 500	28 000
L_5	»	—	$20\,700 \pm 800$	22 000	17 500
L_{34}	5 M $\text{Gu}\cdot\text{HCl}$	7200 ± 300 (на G-75)			
ЛСБ *	2% ДСН	$34\,300 \pm 1400$	$35\,300 \pm 1400$		

* Данные работы [17]: М 34 000 (по аминокислотному составу) М 36 000 (гель-хроматография).

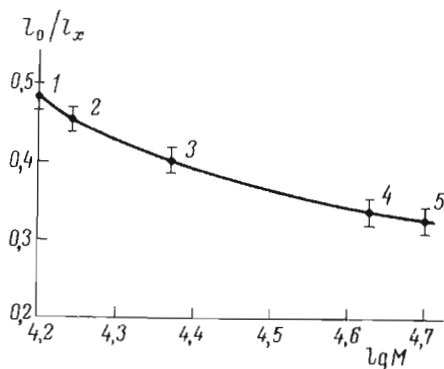


Рис. 4. Зависимость индексов удерживания (l_0/l_x) от $\lg M$ ДНС-пептидов на сефадексе G-200 «сверхтонкий» в 2%-ном ДСН/0,1 н. NaHCO_3 : 1 — гемоглобин; 2 — миоглобин; 3 — γ -глобулин (легкие цепи); 4 — овальбумин; 5 — γ -глобулин (тяжелые цепи)

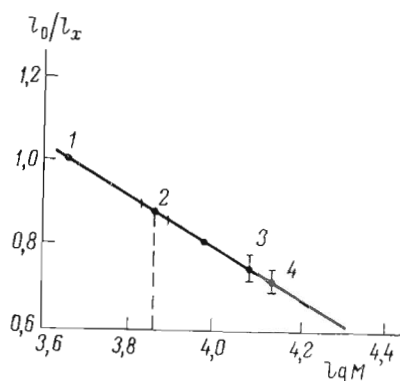


Рис. 5. Зависимость индексов удерживания (l_0/l_x) от $\lg M$ КМ-пептидов на сефадексе G-75 «сверхтонкий» в 5 М $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ /0,01 М калий фосфатом буферном растворе (рН 5,4): 1 — АКТГ; 2 — L_{34} ; 3 — цитохром С; 4 — рибонуклеаза

Из данных таблицы видно, что МВ белков, определенные нашим методом, несколько меньше величин, полученных методом электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН, и больше, чем найденные седиментацией. Достоверность результатов, полученных методом ТСГХ в растворе ДСН не вызывает сомнений, однако определение МВ L_{34} недостаточно надежно из-за отсутствия реперных белков в диапазоне M 4 500 (АКТГ) — 12 200 (цитохром С). С другой стороны, определение МВ L_{34} с помощью ТСГХ в $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$, безусловно, более корректно, чем использование для этих целей методики электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН, которая, как известно [5, 6], дает неточные результаты при изучении белков с $M < 15000$.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие препараты: цитохром С («Schuchardt — München», ФРГ); рибонуклеазу из поджелудочной железы крупного рогатого скота («Reanal», Венгрия); гемоглобин из лошадиной крови («Reanal», Венгрия); γ -глобулин («Koch-Light», Англия); миоглобин из скелетных мышц лошади («Calbiochem», США); АКТГ (Ленмясокомбинат им. С. М. Кирова); рибосомальные белки L_1 , L_2 , L_3 и L_{34} , полученные от Ю. В. Алахова (Институт белка Академии наук СССР); ЛСБ, предоставленный М. Ю. Фейгиной (Институт биоорганической химии им М. М. Шемьякина); ДНС-Cl («Fluka A. G., Buchs S. G.», Швейцария); ДСН («Schuchardt — München», ФРГ); β -меркаптоэтанол («Merck — Schuchardt», ФРГ); подуксусную кислоту, синтезированную по методике [19], $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ «ч.» («Реахим», СССР), очищенный перекристаллизацией из горячего абс. этанола по методике [20], бромфеноловый синий и *m*-крезоловый пурпурный («Реахим», СССР), основания метиламина (25%-ный водный раствор «ч.» «Реахим», СССР).

Денатурацию белка проводили следующим образом. Для получения ДНС-пептидов 100 мкг белка растворяли в 0,01 мл 0,1 н. NaHCO_3 с 2%-ным ДСН, прибавляли 0,004 мл 0,25%-ного ацетонового раствора ДНС-Cl и выдерживали 1 ч при температуре 37°. Добавляли 0,01 мл 20%-ного раствора β -меркаптоэтанол и выдерживали еще 3 ч при той же температуре. Эта методика позволяет вводить в белок одну ДНС-метку на 60—70 аминокислотных звеньев. Введение большего числа меток способствовало ассоциации белка даже в растворах ДСН. (Слабую ассоциацию наблюдали и в выбранных нами условиях получения ДНС-пептидов, что проявлялось

в виде образования дополнительных слабофлуоресцирующих зон, движущихся быстрее основных зон хроматографируемых белков (см. рис. 2)).

Для получения КМ-пептидов 1 мг белка растворяли в 0,05 мл свежеприготовленного 6M раствора $\text{Cu}\cdot\text{HCl}$, содержащего 1 каплю индикатора *m*-крезолового пурпурного и 0,005 мл 10%-ного раствора β -меркаптоэтанола. Прибавляли 1%-ный раствор метиламина до появления окраски розовато-охристого цвета (рН 8,6) и оставляли на 4 ч при комнатной температуре. После этого добавляли 0,035 мл 1 н. NaOH, содержащего 9,45 мг йодуксусной кислоты и выдерживали 1 ч при комнатной температуре в темноте.

Хроматографические пластинки готовили путем нанесения на тщательно обезжиренную стеклянную пластинку размером 100×200 мм густой суспензии сверхтонкого сефадекса, набухавшего в дистиллированной воде в течение 1—2 сут (10 г сефадекса G-75 в 110 мл воды, 10 г сефадекса G-150 и G-200 в 200 мл воды). Слой сефадекса разравнивали с помощью металлического шаблона с калиброванным зазором (0,7 мм).

ТСГХ пептидов производили следующим образом: пластинку с сефадексом устанавливали в лоток для ТСГХ (рис. 1), соединяли фитилями из хроматографической бумаги с элюирующими растворами, залитыми в верхнюю и нижнюю кювету и промывали элюирующим раствором в течение ночи. Растворы белков наносили микрошпателькой объемом 1 мкл. За хроматографией ДНС-пептидов следили по движению люминесцирующих при освещении кюветы УФ-лампой (365 нм) зон белка. За хроматографией КМ-пептидов наблюдали по движению зоны цитохрома С бурого цвета.

Документация ТСГХ. Хроматограммы ДНС-белков фотографировали контактным способом при освещении УФ-лампой (365 нм) с использованием пленочного светофильтра (480 нм) на фотопленку Ф-31. С хроматограмм КМ-пептидов получали отпечатки на хроматографической бумаге, которую держали на слое сефадекса в течение 5 мин, после чего бумагу высушивали и окрашивали 0,1%-ным раствором бромфенолового синего в смеси ледяной уксусной кислоты и метанола (1:9) в течение 5—7 мин с последующей отмывкой 5%-ным раствором уксусной кислоты до появления белого фона. Полученную реплику хроматограммы фотографировали контактным способом на рефлексную фотобумагу.

Авторы благодарны М. Ю. Фейгншой и Ю. Б. Алахову за предоставление образцов лейцинсвязывающего и рибосомальных белков для исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel G. V. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 28, 815—820.
2. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biolog. Chem.*, 244, 4406—4412.
3. Johanson B. G., Rymo L. (1964) *Acta Chemica Scand.*, 18, 217—223.
4. Morris C. (1964) *J. Chrom.*, 16, 167—175.
5. Williams J. G., Gratzier W. B. (1971) *J. Chrom.*, 57, 121—125.
6. Russ G., Polakova K. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 55, 666—672.
7. Reynolds J. A., Tanford Ch. (1970) *J. Biolog. Chem.*, 245, 5161—5165.
8. Fish W., Reynolds J. A., Tanford Ch. (1970) *J. Biolog. Chem.*, 245, 5166—5168.
9. Tanford Ch., Kawahara K., Lapanje S. (1966) *J. Biolog. Chem.*, 241, 1921—1923.
10. Fish W., Mann K., Tanford Ch. (1969) *J. Biolog. Chem.*, 244, 4989—4994.
11. Li Pen Chao, Einstein E. R. (1969) *J. Chrom.*, 42, 485—492.
12. Heinz F., Prosch W. (1971) *Anal. Biochem.*, 40, 327—330.
13. Klaus G. G., Nitecki D. E., Goodman J. W. (1972) *Anal. Biochem.*, 45, 286—297.
14. Wasyl Z., Luchter-Wasyl E., Bielanski W. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 285, 279—286.
15. Yoshino M., Takagi T. (1973) *Anal. Biochem.*, 54, 290—293.
16. Ганкина Э. С., Калымина Г. В., Эрастов Д. П., Бельский Б. Г. (1970) в кн. Синтез, структура и свойства полимеров, стр. 229, «Наука», Л.
17. Penrose W. R., Nichoalds G. E., Piperno J. R., Oxender D. L. (1968), *J. Biol. Chem.*, 243, 5921—5928.
18. Dzionara M., Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1970) *Proc. Nat. Acad. of Sci.*, 67, 1909—1913.
19. Abderhalden E., Gyggenheim B. (1908) *Berichte*, 1, 2853.
20. Nozaki J., Tanford Ch. (1967) *Methods in Enzymology*, Acad. Press., N. Y., 11, 732.

Поступила в редакцию
16.IX.1974

ULTRA—MICRO METHOD FOR DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHTS
OF POLYPEPTIDE CHAINS AND PROTEIN SUBUNITS BASED
ON THIN-LAYER GEL CHROMATOGRAPHY

BELEN'KY B. G., GANKINA E. S., ANISKOVA M. A., ANIKINA T. B., KRASOVSKY A. N.

*Institute of High Molecular Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

A method to determine the protein MW in the range of $1.5 \cdot 10^4$ - $6 \cdot 10^4$ has been devised. It is based on Sephadex G-150 or G-200 thin-layer chromatography of the fluorescent Dns-peptides obtained after protein denaturation with 2% DSS in the presence of β -mercaptoethanol. The accuracy of the method is about 5-6% (based on 10 experiments), 100 μ g of protein being sufficient for analysis. To determine MW in the range of 10^3 - 10^5 , thin-layer chromatography (Sephadex G-75 or G-200) of carboxymethylated peptides, obtained on protein denaturation with β -mercaptoethanol in 5 M Gu·HCl and subsequent iodoacetic acid treatment, has been used. This procedure is 10 times less sensitive than the DSS-method.
