



УДК 577.112:543.544

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСКЛЮЗИОННАЯ МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

*Беленький В. Г., Ганкина Э. С., Кевер Е. Е.,
Костюк И. О., Саминский А. Е., Илларионова Н. Г.*

*Институт высокомолекулярных соединений
Академии наук СССР, Ленинград*

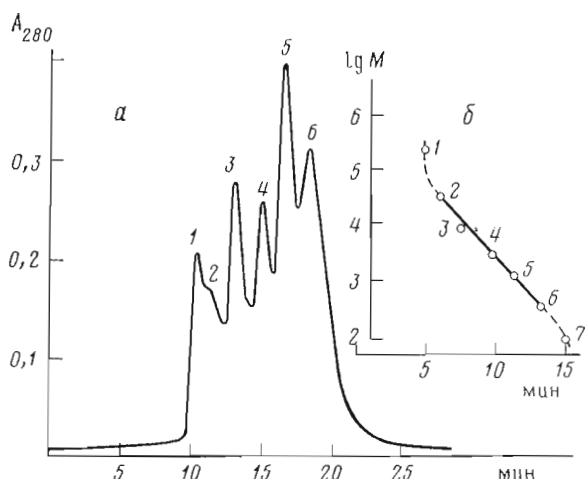
Разработан новый метод определения молекулярной массы белков и пептидов на основе микроколоночной эксклюзионной хроматографии в трифторуксусной кислоте на кремнеземных сорбентах разной пористости с линейной молекулярно-массовой калибровочной зависимостью в диапазоне $5 \cdot 10^2 - 7 \cdot 10^4$ Да. Показано, что белки и пептиды принимают в этом элюенте конформацию статистического клубка и не гидратируются в течение 2–3 сут при 20°C .

Высокоэффективная эксклюзионная хроматография (ВЭЭХ) — важнейший метод препаративного разделения сложных пептидных и белковых смесей, а также определения молекулярной массы пептидов и белков и молекулярно-массового распределения (ММР) белковых гидролизатов. ВЭЭХ нативных белков и пептидов не может дать надежных результатов в анализе их молекулярной массы и ММР вследствие различной конформации молекул пептидов и белков в растворах.

Как показал Тенфорд [1, 2], эта проблема может быть снята при эксклюзионной хроматографии белков в растворах 6 М гуанидинийхлорида или додецилсульфата натрия. В первом растворе молекулы белка принимают конформацию статистического клубка [1], во втором — стержневидную конформацию при $M > 10^4$ Да [2]. Поэтому оптимальным методом определения молекулярной массы белков и ММР белковых гидролизатов до сих пор является разработанный Уи [3] метод ВЭЭХ в 6 М гуанидинийхлориде на модифицированных силикатных сорбентах типа SW-геля (Toyo Soda). Вследствие полной денатурации белков в 6 М гуанидинийхлориде указанная методика не может быть использована для выделения физиологически активных нативных белков. Имеется и еще один недостаток в этой методике, связанный с высокой вязкостью элюента, ограничивающей скорость элюции, и его корродирующими свойствами, быстро выводящими из строя гидравлическую систему хроматографа. Поэтому очевидна целесообразность перехода к другому элюенту, менее вязкому и коррозионно неактивному, но вместе с тем обеспечивающему одинаковую статистическую конформацию белков и пептидов в растворах при отсутствии адсорбции на макропористом сорбенте. Разработка метода ВЭЭХ денатурированных белков и пептидов в элюенте с указанными выше свойствами и явилась целью настоящей работы. Вместе с тем ввиду особой ценности белков и пептидов целесообразно снизить количество пробы для анализа молекулярной массы и ММР, что может быть достигнуто переходом к микроколоночной хроматографии [4].

С этой целью были использованы силикатные немодифицированные сорбенты — силикагель и макропористые стекла, а в качестве элюента — трифторуксусная кислота, особенностью которой является наличие сильноокислотной карбоксильной группы ($pK = 0,28$) и амфифильный характер гидрофобной трифторметильной группы. ТФА характеризуется относительно невысокой диэлектрической проницаемостью ($\epsilon = 8$). Эти свойства ТФА обуславливают ее сильное взаимодействие с полипептидной цепочкой, благодаря которому происходит денатурация белков и пептидов.

Сокращения: ВЭЭХ — высокоэффективная эксклюзионная хроматография, ММР — молекулярно-массовое распределение, ТФА — трифторуксусная кислота.



a — хроматограмма смеси белков и пептидов на системе из двух колонок общей длиной 39 см, внутренним диаметром 0,55 мм, заполненных силикагелями Partisil-60 ($d_{\text{пор}}=60 \text{ \AA}$) и SG-5G ($d_{\text{пор}}=250 \text{ \AA}$). Элюент — раствор в ТГА 3% воды и 5% диметилацетамида. Скорость элюции 5 мкл/мин. Детектирование при $\lambda=280 \text{ нм}$, 0,4 ОЕ на шкалу. Пики соответствуют маркерным белкам (в скобках приведена молекулярная масса в дальтонах): 1 — фибриноген (30 000), 2 — овалбумин (45 000), 3 — цитохром с (12 300), 4 — цепь В инсулина (3495), 5 — бацитрацин (1450), 6 — субстрат эластазы (451). *b* — калибровочная зависимость времени удерживания t_R от $\lg M$ белков и пептидов в условиях, приведенных выше. 7 — нафталин (128 Да)

Тем же можно объяснить и хорошую растворимость белков и пептидов в ТГА. ТГА обладает примерно в 5 раз меньшей вязкостью, чем 6 М водный раствор гуанидинийхлорида, что приводит к повышению скорости элюции без уширения хроматографических зон (пиков), поскольку с уменьшением вязкости возрастает коэффициент диффузии, контролирующей массопередачу между подвижной и стационарной фазами.

Как показали эксперименты, чистая ТГА не полностью подавляет адсорбцию полипептидов на силикатных сорбентах. Чтобы исключить этот эффект, необходимо ввести в состав элюента небольшую добавку предотвращающих адсорбцию низкомолекулярных компонентов [5]. Подобный элюент вместе с силикатными сорбентами представляет идеальную систему для эксклюзионной хроматографии белков и пептидов в полностью денатурированном состоянии (в конформации статистического клубка). Прозрачность элюента при $\lambda=280 \text{ нм}$ дает возможность фотометрического детектирования пептидов с ароматическими аминокислотами. Однако для детектирования пептидов, не содержащих остатков ароматических аминокислот, необходимо использовать рефрактометрический детектор. Предлагаемый элюент не приводит к гидролизу пептидной связи за время, необходимое для хроматографического анализа, и таким образом обеспечивает возможность точного определения молекулярной массы и ММР белков и их фрагментов.

Для определения конформационного состояния бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ТГА было использовано измерение дисперсии оптического вращения. Результаты измерений обрабатывались по уравнению Моффита — Янга [6], из которого можно рассчитать коэффициент b_0 , определяющий процентное содержание α -спирализованных участков в полипептидной цепочке (значения b_0 могут меняться от 0 до -630° при изменении α -спиральности от 0 до 100%). Полученное значение $b_0=-70^\circ$ для БСА в ТГА свидетельствует о том, что α -спиральные участки белка в ТГА разрушены практически полностью, и позволяет заключить, что белки и пептиды (с расщепленными S—S-связями) находятся в ТГА в конформации статистического клубка, а это дает основание рассчитывать на единую для всех белков и пептидов универсальную калибровочную зави-

симость удерживаемых объемов от массы при хроматографии в ТГА, как это имеет место в 6 М гуанидинхлориде [1].

При микроколоночной ВЭХ белков и пептидов на макропористых стеклах и силикагелях в ТГА было установлено, что отдельные белки и пептиды имеют большие времена удерживания, чем следовало из их молекулярных масс, вероятно, из-за взаимодействия с адсорбентами. Для подавления этих взаимодействий, искажающих эксклюзивный механизм фракционирования, в элюент ввели низкомолекулярные добавки, эффективность которых определяли по значениям времен удерживания нафталина и динитрофенильных производных аланина и лизина, которые при эксклюзивной хроматографии должны совпадать.

Одним из наиболее эффективных элюентов, обеспечивающих идеальную эксклюзивную хроматографию белков и пептидов, оказался раствор в ТГА 3% воды и 5% диметилацетамида (аналога пептидной связи) (см. рисунок). Этот элюент не гидролизует пептидные связи заметным образом в течение 3 сут при 20°С. С учетом неизбежных потерь на промывку и заполнение петли дозатора раствором пробы, а также необходимости нескольких повторных анализов для определения молекулярной массы или ММР необходимо иметь 2–3 мкл раствора, содержащего ~5 мкг белка, а длительность анализа не превышает 30 мин.

В результате проведенных исследований создана новая эффективная методика определения молекулярной массы пептидов и белков в конформации статистического клубка в интервале молекулярных масс от 450 до 50 000–70 000 Да с использованием микроколоночной ВЭХ на немодифицированных силикатных сорбентах в элюенте на основе ТГА. Преимуществами разработанной методики по сравнению с хроматографией в 6 М гуанидинхлориде [3] являются низкая вязкость элюента, позволяющая сократить время анализа в 3 раза, и летучесть элюента, облегчающая выделение веществ, минуя обессоливание. Чувствительность анализа, позволяющая использовать ~5 мкг белка, также значительно превосходит описанные в литературе методики с использованием не микроколоночной ВЭХ.

Экспериментальная часть

Измерение дисперсии оптического вращения производили на спектрополяриметре Perol-60 (Bellingham and Stanley, Англия) с качающимся анализатором (симметричный угол качения 30°) в диапазоне длин волн 450–590 нм с дискретностью 20 нм. Поправку на зависимость показателя преломления от длины волны не учитывали, так как она не превышала 2% от рассчитываемых величин (суммарная погрешность при расчете не превысила $\pm 2^\circ$). Спектры снимали при 20°С в кювете длиной 50 мм, концентрация раствора составляла 10 мг/мл.

Микроколоночную эксклюзивную хроматографию осуществляли с помощью жидкостного хроматографа «Миличром» (СССР), у которого стандартную хроматографическую колонку заменили на колонку из калиброванной фторопластовой трубки с внутренним диаметром 0,55 или 0,50 мм и наружным диаметром 1,5 или 2,5 мм соответственно и длиной 30–40 см. Концы колонок закрывали титановыми фильтрами толщиной 0,2 мм, размер пор 3 мкм. Колонки заполняли сорбентом из водной суспензии под давлением 130 или 200 атм при наружном диаметре колонок 1,5 или 2,5 мм соответственно. Пробу (0,1–0,2 мкл раствора 2 мг/мл) вводили с помощью кранов-дозаторов Valco или Rheodyne, модель 7410 (США) с объемом дозирующей петли 0,5 мкл. В некоторых экспериментах вместо хроматографа «Миличром», у которого объем кюветы составляет 1,6 мкл, использовали спектрофотометрический детектор жидкостного хроматографа ХЖ-3301 с кюветой объемом 0,3–0,4 мкл в сочетании с микронасосом собственного изготовления [4]. Использовали сорбенты с размером частиц 10 мкм: Lichrosorb Si-60, Lichrospher Si-100 и Si-500 (Merck, ФРГ), Partisil-60 (Whatman, Англия), Separon Si-VSK (Laboratorni Pstroje, ЧССР) и SG-5G (Институт полимеров Словацкой Академии наук, ЧССР), а также макропористое стекло МПС-250 (Институт химии силикатов АН СССР). Перед употреблением все сорбенты гидратировали обработкой 0,1 М HCl

при 100° С в течение 5–7 ч. Было проверено, что ТФА практически не обладает коррозионной активностью в отношении нержавеющей стали 17Х18 Н10Т (СССР) и SS-316 (США), из которых изготовлены детали хроматографов. Тем не менее при длительных перерывах в работе гидравлическую систему приборов отмывали и заполняли спиртом. Используемые системы колонок Partisil-60 – SG-5G и Lichrospher Si-500 – Separon Si-VSK обладали эффективностью 6–8 тыс. или 10 тыс. теоретических тарелок на хроматографе «Миличром» или СФ-детекторе хроматографа ХЖ-3301 соответственно при скорости элюции 5 мкл/мин.

ТФА (Союзреактив, марка ч.) очищали ректификацией с отбором фракции 72–73° С. Низкомолекулярные добавки – вода диметилацетамид (Союзреактив, марка ч.д.а.) – вводили в ТФА по объему.

Пробы белков и пептидов, не содержащих S–S-связей, растворяли в элюенте (0,5 мг белка в 0,25 мл). Содержащие S–S-связи белки предварительно окисляли надмуравьиной кислотой [7], которую приготавливали, добавляя к 9,5 мл муравьиной кислоты 0,5 мл 30% раствора перекиси водорода и выдерживая полученную смесь при 20° С в течение 2 ч в закрытом сосуде. Исследованные белки из KitMS-II (Serva, ФРГ): БСА, овальбумин, химотрипсиноген А (по 2 мг) растворяли в рассчитанном количестве надмуравьиной кислоты (0,4; 0,04 и 0,2 мл соответственно количеству S–S-связей во взятой навеске), выдерживали 2,5 ч при 20° С, а затем вводили в колонку без дополнительной обработки.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института полимеров Словацкой Академии наук Д. Береку и Дж. Новаку за предоставление сорбента SG-5G.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reynolds J. A., Fish W., Tanford Ch. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 19. P. 5166–5168.
2. Fish W., Mann K., Tanford Ch. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 18. P. 4989–4994.
3. Ui N. // Analyt. Biochem. 1979. V. 97. № 1. P. 65–71.
4. Кевер Е. Е., Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Виленчик Л. Э., Куренбин О. И., Жмакина Т. П. // Высокомолекуляр. соединения. 1982. Т. Б-24. № 6. С. 403–406.
5. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Кевер Е. Е., Костюк И. О., Саминский А. Е. Способ эксклюзионной жидкостной хроматографии полимеров: А. с. 1272227 СССР // Б. И. 1986. № 43. С. 179–180.
6. Moffit W., Yang J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1956. V. 42. № 9. P. 596–608.
7. Бейли Дж. Методы химии белков. М.: Мир, 1965. С. 98, 99.

Поступила в редакцию
13.VIII.1986
После доработки
24.XI.1986

MICROCOLUMN EXCLUSION CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS AND PEPTIDES

BELENKII B. G., GANKINA E. S., KEVER J. J., KOSTIUK I. O.,
SAMINSKY A. E., ILLARIONOVA N. G.

*Institute of Macromolecular Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Leningrad*

A new method of determination of molecular mass of proteins and peptides has been developed, basing on the microcolumn exclusion chromatography on non-modified silica sorbents in trifluoroacetic acid. It is shown that in this eluent the proteins and peptides adopt the random-coil conformation and are not hydrolyzed for three days at room temperature.