



УДК 547.962.05+543.544

## МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БОЛЬШИХ ПЕПТИДОВ

*Костюк И. О., Ганкина Э. С., Беленький В. Г.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

На примере разделения продуктов неполного бромцианового расщепления цитохрома с описана методика каскадной микроколоночной эксклюзионной хроматографии больших пептидов с использованием непосредственно соединяющихся колонок из полиэтилена с внутренним диаметром около 1 мм. Данная методика практически исключает размывание зон при последовательном соединении колонок с одинаковой или разной насадкой (сефадекс, сферон и т. п.) с целью переноса всей пробы или отдельных ее фракций. Она может применяться при разделении в условиях рецикла, а также при обессоливании. Предлагаемый вариант микроколоночной хроматографии может быть использован при разделении до 60 нмоль больших пептидов.

Микроколоночная хроматография (МКХ), впервые введенная в практику Саидхачевым [1], Грачевым [2] и Кузьминым [3] для анализа нуклеиновых кислот и их фрагментов, в настоящее время успешно развивается, по крайней мере четырьмя группами исследователей [4–8]. Основными преимуществами МКХ являются высокая чувствительность, позволяющая исследовать микрограммовые количества вещества, и значительная (в 100–1000 раз!) экономия сорбентов и элюентов.

Гель-хроматографическое разделение пептидов с близкими молекулярными массами связано с применением колонок высокой селективности. Важнейший способ повышения селективности связан с использованием каскадного или многомерного хроматографического процесса [9, 10]. В работе [11] была показана применимость каскадной гель-МКХ на сефадексе G-50 для разделения больших пептидов ( $M$  1000–10 000) с использованием в качестве элюента раствора 5 M хлоргидрата гуанидина.

Для управления движением веществ по сети раздельных колонок в обычной хроматографии используется система кранов. Такой подход, однако, совершенно неприемлем для МКХ вследствие значительного размывания.

В данной работе описано применение для МКХ колонок из полиэтиленовых капилляров, которые легко стыкуются друг с другом или с отводными трубками детектора (рис. 1). Это позволяет практически полностью устранить размывание зон в соединениях.

Компоненты, подлежащие дополнительному разделению после хроматографии на одной или нескольких последовательно соединенных колонках, переводили на колонку, непосредственно подсоединенную к выходу детектора микроколоночного хроматографа, после чего эту колонку отсоединяли от детектора и подсоединяли к новой системе колонок или непосредственно элюировали новым растворителем, подключая колонку между насосом и детектором. Подобные манипуляции можно производить на одном микроколоночном хроматографе или использовать одновременно несколько хроматографов.

В качестве тестовой смеси использовали продукты частичного бромцианового расщепления цитохрома с, полученные согласно работе [12]. Эта смесь состоит из пяти пептидов (указан порядок выхода, относительная молекулярная масса,  $M$ , и номера входящих в пептид аминокислотных остатков: 1 — 8000, 1–80; 2 — 6500, 1–65; 3 — 3800, 66–104; 4 — 2300, 81–104; 5 — 1400, 66–80), которые полностью разделялись гель-хромато-

Принятые сокращения: МКХ — микроколоночная хроматография, ВЦГ — бромциановый гидролизат, ЖХ — жидкостная хроматография.

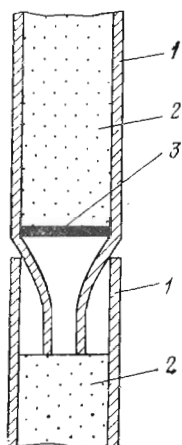


Рис. 1

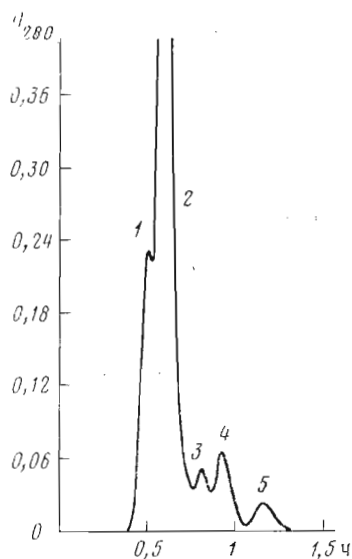


Рис. 2

Рис. 1. Схема соединения микроколонок при каскадной МКХ: 1 — полиэтиленовая микроколонка, 2 — насадка, 3 — титановый пористый фильтр

Рис. 2. Разделение 10 нмоль фрагментов цитохрома с на двух последовательно соединенных колонках (0,085×22 см) с сефадексом G-50 (элюент — 10% по объему водный раствор муравьиной кислоты; скорость элюции 250 мкл/ч)

графией на колонке (5×250 см) с сефадексом G-50 в 10% водном растворе муравьиной кислоты за 72 ч. Разделение пептидов проводили на двух колонках с сефадексом G-50 и двух колонках со сфероном P-1000, элюируя соответственно 10% водным раствором муравьиной кислоты и таким же раствором, содержащим 3% трет-бутилового спирта. На рис. 2 представлен элюиционный профиль при разделении на сефадексе. Видно, что пептид 5 отделяется полностью, а первые четыре разделяются только частично. Для полного их разделения применяли каскадную МКХ; элюиционный профиль полного разделения представлен на рис. 3. Видно, что разделение пептидов 3 и 4 достигается за 2 цикла на сефадексе G-50, а пептидов 1 и 2 за один цикл на сфероне P-1000. Время разделения составляло всего ~3 ч, т. е. в 18 раз быстрее по сравнению с обычной процедурой [12].

Таким образом, в данном случае разделение потребовало использовать разные насадки в колонках (сефадекс, сферон) и рецикл. В принципе; однако, для улучшения эффективности разделения пептидов, близких по молекулярным массам, которые плохо разделяются гель-хроматографией, можно реализовать многомерный процесс, включающий другие методы разделения (например, адсорбционную или обратнoфазную хроматографию).

Предлагаемая техника МКХ значительно облегчает не только разделение, но и обессоливание пептидов. С целью обессоливания нужную фракцию переводят в колонку с сефадексом G-10, уравновешенным водным раствором аммиака (рН 8–9), которую присоединяют к выходу из кюветы, а затем элюируют этим же раствором, собирая пик пептида.

Одним из преимуществ МКХ является высокая чувствительность. При определении пептидов по их поглощению при 280 нм чувствительность детектирования определяется содержанием остатков ароматических аминокислот. Аналитическая рециркуляционная МКХ фрагментов инсулина [11] была выполнена с 1–1,5 нмоль образца, при этом высота пиков в 1-м цикле составляла 80% шкалы, а к концу 4-го цикла — 20–30%. Для БЦГ цитохрома с аналитические возможности составляли ~10 нмоль из-за

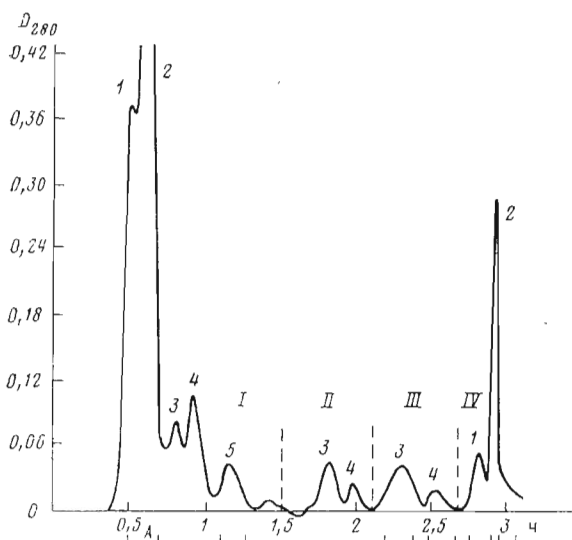


Рис. 3

Рис. 3. Каскадная МКХ 20 нмоль фрагментов цитохрома с на двух колонках (0,085×22 см) с сефадексом G-50 (элюент — 10% водный раствор муравьиной кислоты; скорость элюции 250 мкл/ч) и двух колонках (0,085×11 см) со сфероном Р-1000 (элюент — 10% водный раствор муравьиной кислоты, содержащий 3% трет-бутилового спирта; скорость элюции 2 мл/ч). Пунктиром отделены циклы разделения на сефадексе (I—III). IV цикл — разделение фракции А на сфероне Р-1000. Жирной чертой отмечены отделяемые в каждом цикле фракции

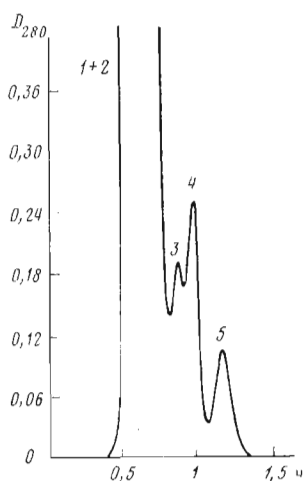


Рис. 4

Рис. 4. МКХ 60 нмоль фрагментов цитохрома с на двух колонках (0,085×22 см) с сефадексом G-50 (условия см. подпись к рис. 2)

разного количества ароматических аминокислот в пептидах (высота пиков от 80 до 2—5% шкалы).

Таким образом, аналитические возможности каскадной МКХ при проведении трех-четырех циклов разделения позволяют определить 1—10 нмоль пептида.

Представляло интерес выяснить, какое наибольшее количество больших пептидов можно разделить предлагаемым методом МКХ. На рис. 4 представлен элюционный профиль при разделении 60 нмоль фрагментов цитохрома с на сефадексе G-50 в 10% растворе муравьиной кислоты. Сравнивая рис. 3 и 4, можно видеть, что шестикратное увеличение количества пептидов не приводит к заметному ухудшению разделения.

### Экспериментальная часть

В работе использовали цитохром с (Schuchardt, ФРГ), свежезоженного бромциан (Serva, ФРГ), муравьиную кислоту марки х.ч. (Союзреактив, СССР), гуанидин·НСI марки ч. (Союзреактив, СССР), сефадексы G-10 и G-50, сверхтонкий (Pharmacia, Швеция), сферон Р-1000 (Lachema, ЧССР). Бромциановое расщепление цитохрома с производили согласно методике, описанной в работе [12].

Работу проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе ХЖ-1305 (СКБ АП АН СССР), имеющем спектрофотометрический детектор с кюветой объемом 1 мкл.

Для хроматографии использовались полиэтиленовые колонки внутреннего диаметром 0,85—1 мм и длиной 22 и 11 см. Колонки заполняли 80% суспензией сефадекса G-50 (фракция 20—30 мкм в набухшем состоянии), набухшего в элюирующем буфере. С помощью насоса засасывали суспензию сорбента в капилляр-контейнер длиной 20—25 см, к нему присоединяли колонку и током элюента со скоростью 250 мкл/ч в нее вводили суспензию сорбента. Когда уровень сорбента достигал обреза колонки, всю си-

стему прокачивали со скоростью 500 мкл/ч до прекращения понижения уровня сорбента. Затем капилляр-контейнер исключали из системы и рабочую колодку промывали со скоростью 250 мкл/ч до получения стабильной нулевой линии.

Заполнение колонок сферомом P-1000 (фракция 20–30 мкм в набухшем состоянии) производили аналогичным способом, используя 50% суспензию в смеси этанол—вода (9:1 по объему; расход жидкости 4 мл/ч). Затем колонку промывали дистиллированной водой (2–3 мл) и уравновешивали элюирующим буфером при скорости его потока 2 мл/ч.

*Разделение фрагментов цитохрома с* проводили на двух колонках K<sub>1</sub> и K<sub>2</sub> общей длиной 44 см (по 22 см каждая) с сефадексом G-50 и двух колонках K<sub>3</sub> и K<sub>4</sub> общей длиной 22 см (по 11 см каждая) со сферомом P-1000. С помощью последовательно соединенных колонок K<sub>1</sub> и K<sub>2</sub> смесь пептидов разделили на 4 фракции, используя как элюент водный раствор 10% муравьиной кислоты. Первая фракция представляла собой смесь плохо разделившихся пептидов 1 и 2. Эту фракцию отбирали в колонку K<sub>3</sub>. Для полного разделения пептидов 3 и 4 колонку K<sub>2</sub> отсоединяли от колонки K<sub>1</sub> и присоединяли к выходу из кюветы. Огобрав в нее эти пептиды, далее проводили их разделение по описанной ранее методике микроколоночного рецикла [11], отбирая фракции на третьем цикле. Пептид 5 хорошо отделяется уже на первом цикле, и его отбирали сразу же. Далее колонки K<sub>1</sub> и K<sub>2</sub> заменяли на колонки K<sub>3</sub> и K<sub>4</sub>. Для элюции использовали 10% водный раствор муравьиной кислоты, содержащий 3% трет-бутилового спирта. При этом вначале к детектору присоединяли колонку K<sub>3</sub> и промывали ее элюирующим буфером до стабилизации нулевой линии. Затем к ней сверху подсоединяли колонку K<sub>4</sub> и таким образом вводили находившиеся в ней пептиды 1 и 2 в систему. Эти пептиды полностью разделялись за один цикл при скорости элюирования 500 мкл/ч.

*Микроколоночное обессоливание.* Для обессоливания использовали колонку внутренним диаметром 1 мм и длиной 21,5 см с сефадексом G-10, уравновешенным водным раствором аммиака (рН 9). В три последовательно соединенные колонки (общей длиной 54 см) с сефадексом G-50, уравновешенным раствором 5 М хлоргидрата гуанидина, содержащим трис-буфер (рН 8,5), вводили 20 нмоль смеси фрагментов цитохрома с. Скорость элюирования при разделении 250 мкл/ч. Первый пик, содержащий пептиды 1 и 2, отбирали в колонку с сефадексом G-10, подсоединенную к выходу из кюветы детектора, и проводили обессоливание, элюируя пептиды водным раствором аммиака (рН 9) со скоростью 1 мл/ч.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Сандахцисс Л. С.* В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 77–94.
2. *Гричев М. А.* В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 104–122.
3. *Кузьмин С. В.* В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973, с. 95–103.
4. *Ishii D., Asai K., Hibi K., Jonokuchi T., Nagaya M. J.* Chromatogr., 1977, v. 144, № 2, p. 157–168.
5. *Scott R. P. W., Kucera P. J.* Chromatogr., 1979, v. 169, № 1, p. 51–72.
6. *Scott R. P. W., Kucera P. J.* Chromatogr., 1979, v. 185, № 1, p. 27–41.
7. *Tsuda T., Novotny M.* Anal. Chem., 1978, v. 50, № 4, p. 632–634.
8. *Кевер Е. Е., Ганкина Э. С., Беленький Б. Г.* Высокомолек. соед., 1981, т. А-23, № 1, с. 234–236.
9. *Majors R. E. J.* Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, p. 571–579.
10. *Freeman D. H.* Anal. Chem., 1981, v. 53, № 1, p. 2–5.
11. *Ганкина Э. С., Костюк И. О., Беленький Б. Г.* Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 3, с. 325–329.
12. *Wilgus H., Stellwagen E.* Anal. Biochem., 1979, v. 94, № 1, p. 228–230.

Поступила в редакцию  
2.X.1981  
После доработки  
4.I.1982

## MICROCOLUMN CHROMATOGRAPHY OF LARGE PEPTIDES

KOSTYUK I. O., GANKINA E. S., BELENKII B. G.

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

A procedure of cascade microcolumn exclusion chromatography of large peptides utilizing directly connected polyethylene columns of about 1 mm inner diameter was illustrated by separation of the products of the cytochrome *c* incomplete cleavage with cyanogen bromide. There is practically no zone spreading when columns with the same or different packing (Sephadex, Spheron etc.) are connected in order to transfer the whole sample or its fractions. The procedure may be used under recycling conditions or for desalting. The described modification of microcolumn chromatography is also suitable for separating up to 60 nmoles of large peptides.