



УДК 577.112:543.544

**МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ
ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ С РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ
ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ***Кевер Е. Е., Зимица Т. М., Беленький В. Г.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

Разработана методика определения молекулярной массы глобулярных белков с помощью микроколоночной эксклюзионной ВЭЖХ на кремнеземном модифицированном сорбенте TSK GEL 3000 SW с рефрактометрическим детектированием. Методика осуществлена на отечественном микроколоночном хроматографе ХЖ-1309. Она дает возможность определять молекулярные массы глобулярных белков в диапазоне 10–200 кДа с точностью $\pm 3\%$.

Настоящая работа, посвященная микроколоночному варианту эксклюзионной ВЭЖХ белков, осуществлялась с целью значительного повышения чувствительности анализа по массе образца. Чем меньше отношение диаметра колонки к длине и больше ее эффективность, тем меньше масса образца, который может быть исследован. При определении индивидуальных минорных компонентов в микрофракциях сложных биологических жидкостей преимущества микроколоночной хроматографии проявляются наиболее убедительно.

Реализация эксклюзионной ВЭЖХ белков стала возможной после разработки жестких хроматографических сорбентов на основе модифицированных инертных кремнеземных матриц [1, 2]. Эти сорбенты наряду с адсорбционной инертностью и широкими порами, доступными для молекул белков, обладают значительным удельным объемом пор (1,5 мл/г), обеспечивающим селективность разделения. Наиболее удачным набором свойств обладают сорбенты TSK GEL 3000 SW, выпускаемые фирмой Toyo Soda (Япония) [1–3], что и определило их выбор для реализации микроколоночного варианта эксклюзионной ВЭЖХ белков. Однако следует иметь в виду, что при работе с сорбентами подобного типа могут проявляться гидрофобные и электростатические взаимодействия белков с матрицей сорбента, которые приводят к несоответствию удерживаемых объемов молекулярной массе [4]. Для устранения всех нежелательных взаимодействий рекомендуется добавлять в элюент детергенты, полярные органические растворители, варьировать pH или повышать ионную силу [5, 6]. Мы добавляем в элюирующий буфер NaCl в концентрации 0,2 М.

Важным фактором повышения точности определения молекулярных масс и размеров макромолекул при микроколоночной хроматографии на колонках диаметром менее 0,5 мм является стабильность подачи элюента, так как при объемах элюирования в несколько десятков микролитров погрешность может вноситься не только работой механических узлов шприцевого насоса, но и сжимаемостью жидкости. Хроматограф ХЖ-1309 оснащен прецизионной системой подачи элюента, обеспечивающей расхождение времен удерживания не более чем на 0,3%.

Применение рефрактометрического детектора с минимальной детектируемой концентрацией на уровне $10^{-4}\%$ имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами регистрации белков — фотометрией и флуориметрией: возможность работы в непрозрачных для УФ-света элюентах; большая универсальность; пропорциональность сигнала весовым концентрациям компонентов, что позволяет определять их весовые доли в пробе. Однако для ряда задач, особенно при исследовании биообъектов, предпочтителен не универсальный, а избирательный детектор, позволяющий регистрировать индивидуальные компоненты в сложных смесях [7].

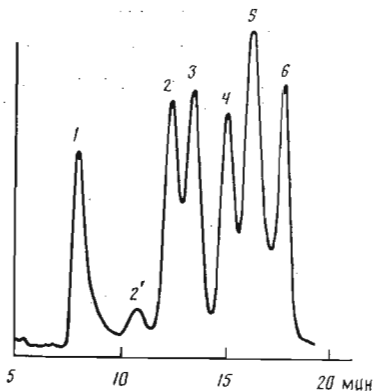


Рис. 1

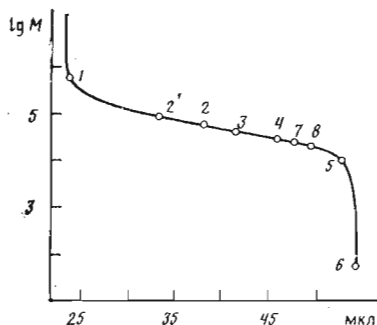


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограмма смеси белков и глицина. Фторопластовая колонка $0,5 \times 300$ мм заполнена TSK GEL 3000 SW. Элюент — $0,03$ М натрий-фосфатный буфер (pH 6,8) в $0,2$ М NaCl. Объем пробы 60 нл. Содержание каждого белка в пробе 50 – 60 нг. Скорость подачи элюента 3 мкл/мин. Чувствительность рефрактометрического детектора 10^{-7} Дп. 1 — тироглобулин, 2 — бычий сывороточный альбумин (BSA), 2' — BSA-димер, 3 — овалбумин, 4 — карбоангидраза, 5 — цитохром *c*, 6 — глицин

Рис. 2. Калибровочная зависимость логарифма молекулярной массы ($\lg M$) от объема удерживания (V_R) для глобулярных белков. 1–6 — обозначения как на рис. 1; 7 — химотрипсиноген, 8 — ингибитор трипсина из сои

Полученная хроматограмма искусственной смеси белков приведена на рис. 1. Объем удерживания тироглобулина (600 кДа) соответствует свободному объему колонки — 24 мкл. Для определения полного объема колонки в смесь добавляли глицин. Кроме того, полный объем колонки определяли по зоне воды, регистрируемой на хроматограмме в виде отрицательного пика. Удерживаемые объемы в обоих случаях составили 54 мкл. Наличие в составе хроматографа ХЖ-1309 микро-ЭВМ ДВК-2 с комплектом прикладных программ позволяет с помощью калибровочной кривой (рис. 2) определять молекулярную массу глобулярных белков по их удерживаемому объему с помощью стандартной процедуры. Обработку хроматограммы можно провести непосредственно после анализа или занести данные во внешнее запоминающее устройство. Молекулярная масса основного компонента белка куриного яйца — овалбумина, полученная нами с помощью стандартной процедуры обработки хроматографических данных, соответствует хорошо известному из литературы значению 43 кДа ($V_R=52$ мл) [8]. Селективность и воспроизводимость анализа позволяют определять молекулярные массы глобулярных белков с точностью $\pm 3\%$. При таких условиях, однако, следует учитывать особенности модели. Так, например, осложнения могут возникнуть при определении молекулярных масс асимметричных или имеющих вытянутую форму белков (фибриногена, коллагена, иммуноглобулинов и т. д.), а также при исследовании белков, имеющих простетические группы (липопротеинов, гликопротеинов и т. д.). Определение молекулярной массы неизвестных белков хроматографическими методами возможно лишь для субъединичных белков после их полной денатурации и расщепления S—S-связей в специальных элюентах [9]. Таким образом, обсуждая точность определения молекулярной массы белка хроматографическим методом, авторы имеют в виду топологически однородные глобулярные белки, удовлетворительно описываемые одним параметром — эквивалентным гидродинамическим радиусом, определяемым из соотношения Стокса — Эйнштейна [10].

Экспериментальная часть

Эксперимент проводился на микроколоночном хроматографе ХЖ-1309 отечественного производства с лазерным рефрактометрическим детектором. Колонка $0,5 \times 300$ мм из фторопласта Ф-4МБ заполнялась суспензией-

ным способом при постоянном давлении 200 кгс/см² сорбентом TSK GEL 3000 SW (Тоюо Soda, Япония), представляющим собой модифицированный гидрофильным радикалом сферический силикагель с размером частиц 10 мкм. Сорбент дополнительно обрабатывали 10% раствором глицидоксипропилтриметоксисилана в воде, подкисленной HCl до pH 3,5, при 90° С в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Затем сорбент тщательно промывали дистиллированной водой и прогревали суспензию 40 мин при 80–90° С. Обработку проводили согласно процедуре, описанной в работе [11], для устранения остаточной адсорбции белков. Эффективность колонки — 10⁴ теоретических тарелок (по глицину).

В качестве элюента использовался 0,03 М натрий-фосфатный буфер (pH 6,8) с добавлением NaCl до 0,2 М концентрации. Жидкостная система хроматографа была усовершенствована авторами — изъята разделительная камера объемом 20 мл, после чего элюент набирался непосредственно в насос, изготовленный из титанового сплава РК-20. Таким образом, суммарный объем жидкостной системы (шприцевый микронасос и коммуникации) составил около 1,5 мл, что обеспечило на практике точность объемной подачи элюента ±0,3%. Объем измерительной ячейки рефрактометрического детектора равен 100 нл, его чувствительность составляет 10⁻⁷Δn (Δn — разность показателей преломления исследуемого раствора и растворителя). Чувствительность хроматографической системы по количеству вещества при объеме пробы 60 нл составляет ~50 нг белка в регистрируемой зоне при соотношении сигнал/шум, равном 20.

Обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью микро-ЭВМ ДВК-2, оснащенной пакетом прикладных программ, разработанных в ИВС АН СССР.

Для калибровки хроматографической системы использовались белки фирмы Serva (ФРГ): тироглобулин (600 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (30 кДа), химотрипсиноген (25 кДа), ингибитор трипсина из сои (21 кДа), цитохром с (12,3 кДа). Бычий сывороточный альбумин (65 кДа), содержащий небольшое количество димера, — препарат отечественного производства. Для определения полного объема колонки использовался глицин (Reanal, ВНР).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. // J. Chromatogr. 1980. V. 190. № 2. P. 297–303.
2. Hashimoto T., Sasaki H., Aiura M., Kato Y. // J. Chromatogr. 1978. V. 160. № 1. P. 301–306.
3. Pfankoch E., Lu K. C., Regnier F. E., Barth H. G. // J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 180. № 4. P. 430–441.
4. Kopaciewicz W., Regnier F. E. // Anal. Biochem. 1982. V. 126. № 1. P. 8–16.
5. Kopaciewicz W., Regnier F. E. // Anal. Biochem. 1983. V. 133. № 2. P. 251–259.
6. Rivier J. E. // J. Chromatogr. 1980. V. 202. № 2. P. 211–222.
7. Maltsev V. G., Zimina T. M., Khvatov A. B., Belenkii B. G. // J. Chromatogr. 1987. V. 416. № 1. P. 45–52.
8. Squire Ph. G. // J. Chromatogr. 1981. V. 210. P. 433–442.
9. Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Кевер Е. Е., Костюк И. О., Саминский А. Е., Илларионова Н. Г. // Биосоган. химия. 1987. Т. 13. № 7. С. 894–897.
10. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Гидродинамика. М.: Наука, 1986. С. 332.
11. Hearn M. T. W. // J. Chromatogr. 1986. V. 376. P. 245–257.

Поступила в редакцию
25.VIII.1988

После доработки
20.XII.1988

MICROCOLUMN SIZE-EXCLUSION HPLC OF GLOBULAR PROTEIN WITH REFRACTOMETRIC DETECTION

KEVER J. J., ZIMINA T. M., BELENKII B. G.

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

A method of determination of molecular masses of globular proteins based on microcolumn size-exclusion HPLC on modified silica sorbent (TSK-GEL 3000 SW) with refractometric detection has been developed. Molecular masses in the range 10 to 200 kD were determined with the accuracy of ±3%.