



УДК 577.112.088.3543.841.8 549.9

АНАЛИЗ ПЕПТИДОВ ИЗ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

© 1999 г. О. В. Шваб, С. В. Тришкин, Е. Н. Шепель,
Б. В. Васьковский, Г. Т. Сухих*, В. П. Демушкин[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-1, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Институт биологической медицины, Москва

Поступила в редакцию 04.03.98 г. Принята к печати 12.09.98 г.

Разработана методика анализа пептидного состава экстрактов из различных животных и растительных тканей. Методика включает подготовку пробы кислотной экстракцией пептидной фракции из исследуемого материала и осаждение добавлением ацетона, разделение пептидов ионообменной хроматографией со ступенчатой элюцией фракций и детекцией нингидрином и компьютерную обработку результатов разделения. Результаты анализа представлены в виде хроматографических профилей разделения и пептидограмм. Данные анализа могут храниться в базе данных, использоваться для создания обобщенных пептидных портретов объектов исследования и разностных портретов, позволяющих выявлять характерные для данного образца пептиды. Диапазон количества определяемого пептида – 1–10 нмоль.

Ключевые слова: хроматография пептидов; пептидограмма; анализ пептидного состава.

Для анализа пептидного состава различных препаратов и выделения индивидуальных пептидов используют различные хроматографические методы и электрофорез [1–3]. Наилучшее разрешение фракций обеспечивают газовая хроматография и капиллярный электрофорез, которые, однако, не свободны от недостатков. В частности, газовая хроматография не пригодна для анализа средних и длинных пептидов, а капиллярный электрофорез не может обеспечить воспроизводимость разделения при рутинном анализе, особенно образцов, содержащих точно неизвестное количество солей или кислот (неизбежных компонентов пептидных препаратов, получаемых экстракцией или хроматографией). Эффективное разрешение достигается также при использовании ВЭЖХ в обращенной фазе, которая лишена вышеперечисленных недостатков.

Цель работы – создание методики анализа пептидов из тканей человека, животных и растений, состоящей из способа выделения пептидной фракции, методики анализа пептидов ионообменной ВЭЖХ и программы компьютерной обработки полученных данных.

За основу способа выделения пептидной фракции мы использовали методики получения пептидных препаратов тканей животных [5] и мочи человека [4]. Для более полной денатурации белков, разрушения нестабильных при нагревании пептидов и получения воспроизводимых резуль-

татов экстракцию образцов проводили 1 М уксусной кислотой при кипячении. Пептиды из экстрактов осаждали добавлением ацетона (2 : 5 по объему) и выдерживали 12 ч на холоду. В этих условиях свободные аминокислоты и биогенные амины остаются в супернатанте [4]. Осадок растворяли в 0.1 М уксусной кислоте и лиофилизовали. Нами было найдено, что эта процедура облегчает растворимость пептидной фракции.

Для анализа полученных пептидных препаратов мы остановились на ионообменной ВЭЖХ, поскольку данный метод включает два механизма разделения – ионный обмен и адсорбционные взаимодействия веществ с хроматографической насадкой. Поэтому подвижность пептидов будет определяться как различиями их зарядов, так и различиями в их гидрофобности.

Оптимизацию разделения проводили на экстракте эпифиза крупного рогатого скота. Для характеристики препарата использовали стандартный вариант разделения – ВЭЖХ в обращенной фазе и получили достаточно хорошее разрешение (рис. 1).

Для ионообменной ВЭЖХ этого же препарата мы использовали аминокислотный анализатор фирмы Biotronik (Германия), содержащий автосамплер и калиброванную петлю для образцов, что позволило стандартизировать наносимый объем, время подачи буферных растворов и условия детекции пептидов после реакции с нингидрином. В случае использования катионита разделение эпигаламина также дает хорошее разре-

[#] Автор для переписки (e-mail: vdem@ibch.siobc.ras.ru).

шение, причем число хроматографических пиков больше, а степень разрешения пиков существенно лучше, чем при разделении ВЭЖХ в обращенной фазе. Детекция на основе реакции пептидов с нингидрином и технические характеристики аминокислотного анализатора позволяют определять 1–10 нмоль пептида. Естественно, что использование других вариантов детекции, например флуоресцентной, позволит повысить чувствительность анализа.

На хроматограмме экстракта эпифиза крупного рогатого скота отчетливо видно более 30 фракций (рис. 2а).

Результаты анализа могут быть представлены либо в виде текстового файла или кривой разделения – хроматограммы (программа WinPeak фирмы Biotronik), либо в виде пептидограммы, когда содержание пептида (площадь пика) приведено в логарифмическом масштабе (рис. 2б).

Пептидограммы (пептидный портрет), на наш взгляд, более наглядны, чем хроматографические профили (ср. рис. 2а и рис. 2б) и могут быть легко воссозданы из текстовых файлов результатов хроматографического анализа с помощью простой программы, реализованной нами на ПЭВМ на языке Pascal. На основе этой программы можно создавать базы данных о пептидограммах, характерных для различных источников: тканей человека, животных и растений (рис. 3–5).

При коррекции различных функциональных расстройств пересадка фетальных тканей дает положительные клинические эффекты [6, 7], которые, возможно, по крайней мере частично, опосредуются действием пептидов, присутствующих в фетальных тканях [7–9]. Качественный и количественный пептидный состав фетальных тканей в настоящее время не известен, так как ранее подробно изучались лишь пептиды, выделенные из органов и тканей половозрелых животных [10]. Нами были изучены пептидные экстракты фетальных тканей мозга и печени человека (рис. 4а, б) и их пептидограммы. Нетрудно видеть, что анализируемые образцы отличаются не только качественным, но и количественным содержанием отдельных фракций. Наиболее богата пептидами печень, меньшее количество фракций выявлено в мозге.

На рис. 5 приведены пептидограммы для двух растений, используемых в фармакологии – бессмертника и левзеи сафлоровидной, а на рис. 6 – их разностный портрет, из которого наглядно видно, какие из пептидов характерны для бессмертника и какие для левзеи сафлоровидной. Аналогичные пептидограммы получены нами в настоящее время и для других растений (данные не приводятся). Анализ полученного материала показывает, что пептидограммы растений могут быть использованы для характеристики расти-

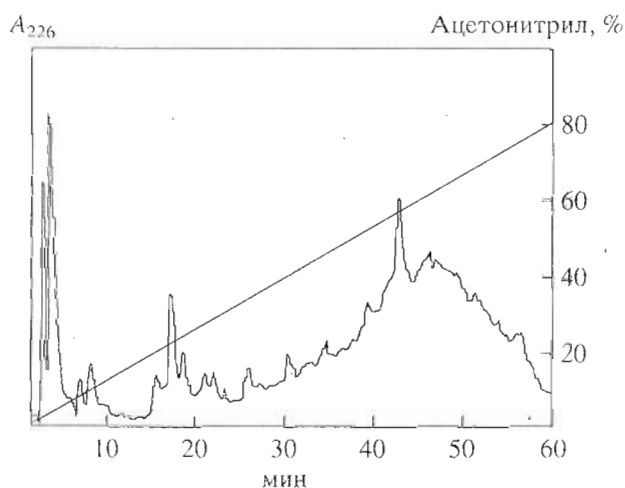


Рис. 1. Разделение пептидного экстракта эпифиза крупного рогатого скота ВЭЖХ в обращенной фазе.

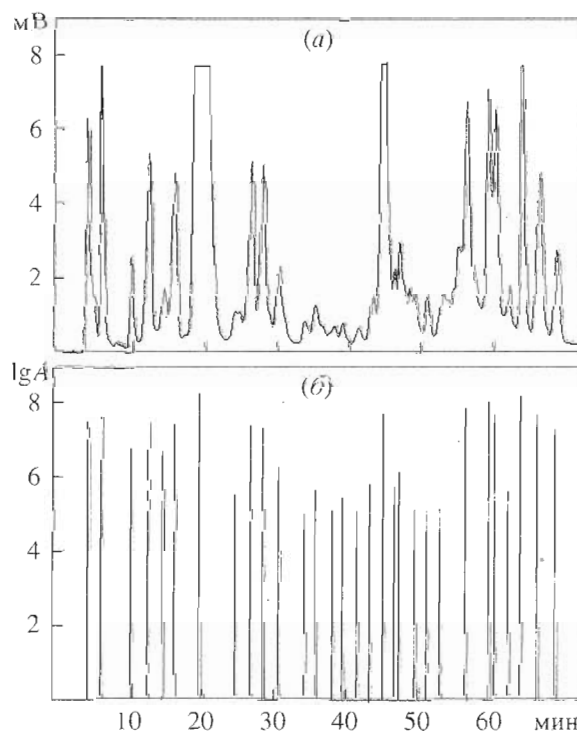


Рис. 2. Разделение пептидного экстракта эпифиза крупного рогатого скота методом ионообменной ВЭЖХ. (а) – хроматографический профиль; (б) – пептидограмма.

тельных препаратов и, возможно, для их таксономической систематизации.

Безусловно, пептидограммы содержат информацию лишь о части пептидов, поскольку некоторые из них могут обладать сходными свойствами (заряд и гидрофобность) и не содержать группировки, дающие цветные продукты реакции с нингидрином. Однако и в разработанном варианте

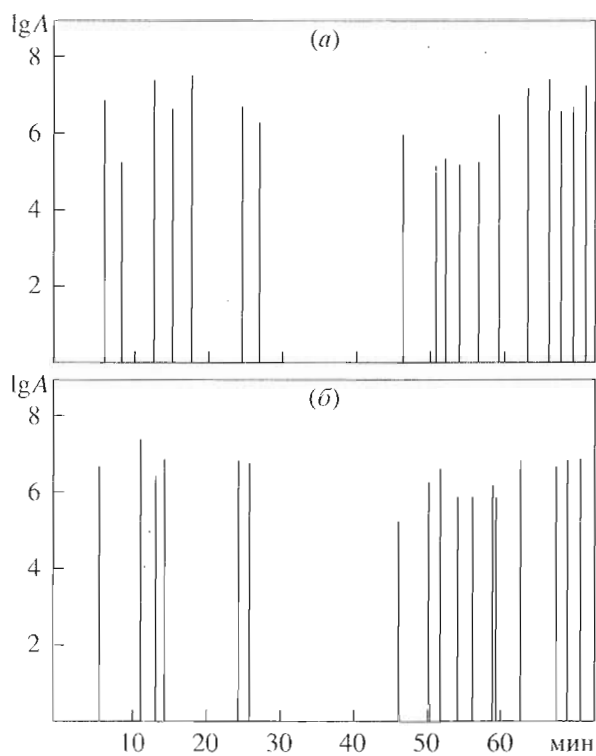


Рис. 3. Пептидограммы экстрактов мозга (а) и печени (б) крысы.

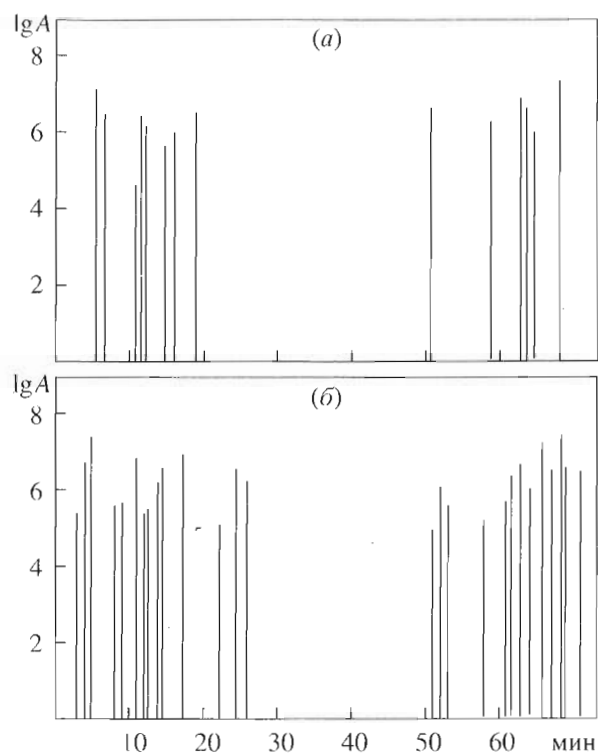


Рис. 4. Пептидограммы экстрактов фетальных тканей человека: мозга (а) и печени (б).

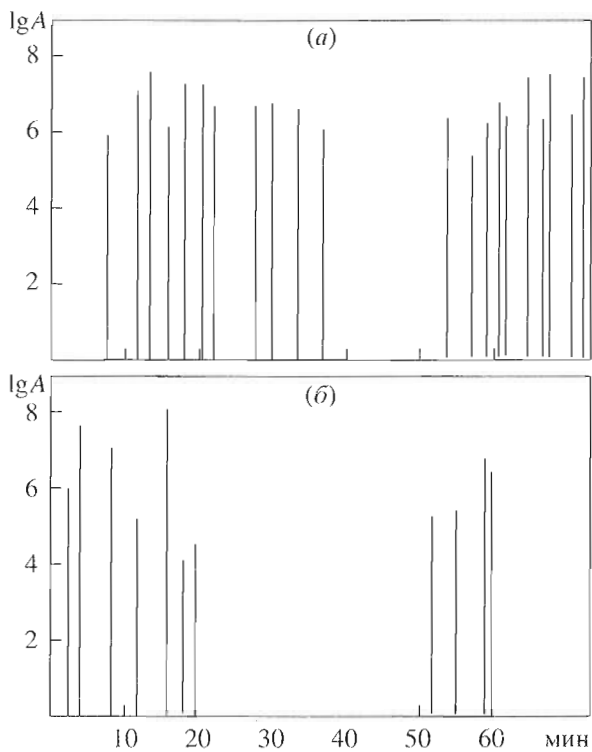


Рис. 5. Пептидограммы экстрактов растений: бессмертника (а) и левзеи сафлоровидной (б).

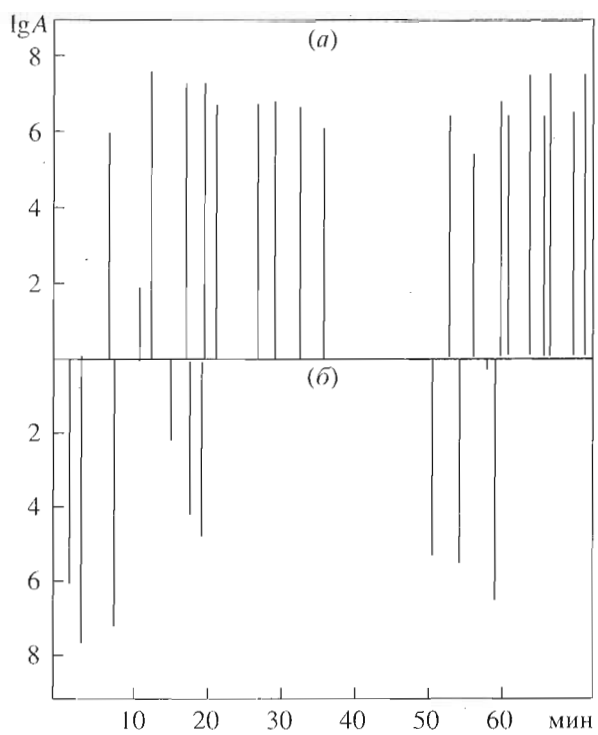


Рис. 6. Разностный портрет экстрактов растений. Пептиды, характерные для бессмертника (а) и левзеи сафлоровидной (б).

можно получить достаточно полезную информацию о пептидном составе изучаемых объектов, особенно при рутинном анализе большого количества образцов.

Таким образом, разработанная система хроматографического анализа пептидов может быть использована для изучения пептидного состава различных природных объектов и, вероятно, для таксономической систематизации, характеристики лекарственных препаратов пептидной природы, для диагностики различных патологических состояний по анализу состава пептидов плазмы крови, мочи, биоптатов и решения других задач, требующих характеристики пептидного состава.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы пептидных экстрактов готовили из мозга и печени крысы, фетальных тканей человека (Институт биологической медицины, Москва), лекарственных препаратов травы бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*) и левзеи сафлоровидной (*Leuzea Carthamoides*) (АОЗТ "Здоровье", Москва). Лиофильно высушенный пептидный экстракт эпифиза крупного рогатого скота получен из Института биорегуляции и геронтологии (Санкт-Петербург).

Приготовление пептидных экстрактов

Способ А. Ткани животных и фетальные ткани человека разрушали гомогенизацией в ножевом гомогенизаторе MPW-324 (Польша) и затем в стеклянном гомогенизаторе Поттера. К образцу добавляли ледяную уксусную кислоту до 1 М концентрации. Суспензию нагревали на бане при 100°C в течение 30 мин. Смесь охлаждали и центрифугировали 40 мин при 75000 g. К супернатанту добавляли ацетон в объемном соотношении 2 : 5 и оставляли на ночь при +4°C. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 40 мин при 40000 g, растворяли в 0.1 М уксусной кислоте и центрифугировали 20 мин при 40000 g. Полученный супернатант лиофилизировали дважды, растворяя сухой остаток в воде.

Способ Б. Высушенное растительное сырье растирали в фарфоровой ступке, замачивали в 1 М уксусной кислоте, выдерживали 1 ч при комнатной температуре и далее, после кипячения при 100°C в течение 30 мин, обрабатывали как в способе А.

Хроматографический анализ пептидных экстрактов

ВЭЖХ в обращенной фазе проводили на хроматографе Du Pont 8800 (Du Pont, США). Пептидный экстракт эпифиза (1 мг) растворяли в 10 мкл 0.1% TFA и наносили на колонку 4 × 250 мм с

Nucleosil 5/C-18, уравновешенную 0.1% TFA (буфер 1). Пептиды элюировали линейным градиентом буфера 2 (60% CH₃CN в буфере 1) от 0 до 80% за 60 мин. Скорость элюции 1.0 мл/мин. Детекция при 226 нм.

Ионообменную ВЭЖХ проводили на аминокислотном анализаторе LC 3000 (Biotronik, Германия). Препарат пептидов, полученный способом А или Б растворяли в 20–60 мкл буфера, содержащего в 1 л 0.82 г ацетата натрия, 75.0 мл метанола, 0.5 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мкл каприловой кислоты и 10% муравьиной кислоты, так чтобы концентрация пептидов составляла 10–100 мг/мл, и наносили на колонку 1 × 125 мм со смолой ВТ-2410 (Biotronik, Германия), уравновешенную буфером А.

Для элюции использовали: буфер А, содержащий в 1 л 8.20 г ацетата натрия, 75.0 мл метанола, 5.0 мл ледяной уксусной кислоты, 4.0 мл муравьиной кислоты и 100 мкл каприловой кислоты, рН 3.30; буфер Б, содержащий в 1 л 4.0 г гидроксида натрия, 2.7 мл ледяной уксусной кислоты, 2.5 мл муравьиной кислоты и 100 мкл каприловой кислоты, рН 3.60; буфер В, содержащий в 1 л 4.0 г гидроксида натрия, 2.7 мл ледяной уксусной кислоты, 2.5 мл муравьиной кислоты и 100 мкл каприловой кислоты, рН 4.90, и буфер Г, содержащий в 1 л 1.0 мл ледяной уксусной кислоты, 83 мМ тринатрийфосфата, 1.0 г EDTA и 100 мкл каприловой кислоты, рН 10.50.

Пептиды элюировали последовательно буфером А (30.5 мин при 40°C), Б (7.5 мин при 60°C), В (12 мин при 60°C) и Г (27 мин при 60°C). Скорость элюции 0.2 мл/мин. Для визуализации использовали раствор нингидрина, содержащий 20 г нингидрина, 0.6 г гидриндантина, 50 мл фенола, 550 мл монометилового эфира этиленгликоля и 400 мл 4 М ацетата натрия (рН 5.5). Детекцию проводили при 440 и 570 нм.

Промывку катионообменника и подготовку колонки к анализу проводили в условиях, указанных в руководстве для пользователей хроматографом LC 3000.

Работа выполнена в рамках проекта "Новейшие методы биоинженерии" ГНТП РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хроматография / Ред. Э. Хефтман. М.: Мир, 1986.
2. Rabel S.R., Stobaugh J.F. // *Pharmaceut. Res.* 1993. V. 10. P. 171–186.
3. Schoneich C., Hunter A.F.R., Rabel S.R., Stobaugh J.F., Jois S.D.S., Larive C.K., Siahaan T.J., Squier T.C., Bigelow D.J., Williams T.D. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 67. P. 155R–181R.
4. Викторов И.В., Шашкова Н.А., Зотов В.М., Демускин В.П., Пятницкий А.Н. // *Ж. невропатологии и психиатрии.* 1987. Т. 87. С. 600–603.

5. Демушкин В.П., Малыгина Т.А., Зотов В.М., Акулин В.Н., Говоруха А.Г., Эпштейн Л.М., Климов В.И. Способ хроматографического разделения пептидов: Авт. свид. № 1259185 // Б. И. 1986.
6. Fine A. // Cell Transplantation. 1994. V. 3. P. 113–145.
7. Molnar E.M. // Medorganica (Germany). 1993. V. 17. P. 57–61.
8. Schmid F. Zell-therapie. Ein Schritt in die Zukunft der Medizin. Stuttgart, 1992.
9. Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. Сб. статей / Ред. Г.Т. Сухих, А.Н. Ерин. М.: Межд. институт биол. медицины, 1996, 127 с.
10. Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И., Васильковский Б.В., Свириев В.И., Назимов И.В. // Био-орган. химия. 1992. Т. 18. С. 1271–1311.

Analysis of Peptides from Animal and Plant Tissues

**O. V. Shvab*, S. V. Trishkin*, E. N. Shepel’*, B. V. Vaskovskii*,
G. T. Sukhikh**, and V. P. Demushkin****

* *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-1 Moscow, 117871 Russia*

** *Institute of Biological Medicine, Moscow*

A new technique was developed for the analysis of peptide compositions of extracts from various animal and plant tissues. It involves the acidic extraction of a peptide fraction from the starting material and its precipitation with acetone, fractionation of peptides by ion-exchange chromatography by using a stepwise elution of fractions and detection by means of ninhydrin color reaction, and computer processing of the results. For the presentation of the results of analysis, chromatographic profiles and peptidograms were proposed. The results of analysis can be stored in a database and used for the creation of “generalized peptide portraits” and “differential peptide portraits” of the subjects investigated, which allow the identification of peptides characteristic of the subjects. The amount of peptide undergoing analysis ranged from 1 to 10 nmol.

Key words: peptide chromatography, peptidogram, analysis of peptide composition

[#] *To whom correspondence should be addressed; e-mail: vdem@ibch.siobc.ras.ru.*