



УДК 547.962.05 + 543.544

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ  
БОЛЬШИХ ПЕПТИДОВ***Ганкина Э. С., Костюк И. О., Беленький Б. Г.**Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

Разработан метод высокоэффективной рециркуляционной гель-хроматографии больших пептидов на узкофракционированном сефадексе G-50 (размер частиц 20--30 мкм). Получено полное разделение смеси АКТГ, цепей А и В инсулина и вазопрессина, различающихся по величинам молекулярных весов примерно на 1000.

Одним из важнейших этапов исследования первичной структуры белков является разделение смеси больших пептидов, полученных при гидролитическом расщеплении белка. В связи с этим несомненный интерес представляет метод гель-хроматографии белков и больших пептидов в 6М хлоридрате гуанидина ( $\text{Gup} \cdot \text{HCl}$ ), предложенный Тенфордом для определения молекулярных весов [1].

В литературе отсутствуют сведения об использовании метода Тенфорда для высокоэффективной гель-хроматографии пептидов с  $M \ll 10^4$ , хотя он представляется весьма перспективным для этих целей. Поскольку в 6 М  $\text{Gup} \cdot \text{HCl}$  пептиды принимают конформацию гауссовых клубков, здесь отсутствует эффект влияния формы макромолекулы на удерживаемый объем и пептиды делятся строго по величинам молекулярных весов. Кроме того, большинство пептидов хорошо растворимы в 6 М  $\text{Gup} \cdot \text{HCl}$  и не образуют ассоциатов. Следует также отметить, что по сравнению с ионообменной хроматографией гель-хроматография является более мягким методом, со значительно меньшей необратимой сорбцией пептидов на колонке.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке высокоэффективной гель-хроматографии пептидов с  $M$  1000—5000 в растворе  $\text{Gup} \cdot \text{HCl}$ . В качестве тест-объекта была выбрана смесь четырех пептидов, различающихся по величинам молекулярных весов примерно на 1000 — АКТГ (1) ( $M$  4504), В- (2) и А- (3) цепей инсулина ( $M$  3376 и 2357 соответственно) и вазопрессина (4) ( $M$  1145). Дисульфидные связи в пептидах были предварительно восстановлены  $\beta$ -меркаптоэтанолом с последующим карбоксиметилированием иодуксусной кислотой.

Препаративное хроматографическое разделение пептидов проводили в силанизированной колонке, заполненной сефадексом G-50 (размер частиц 20—30 мкм) в режиме рецикла.

Как видно из рис. 1, уже после I цикла отделяются низкомолекулярные продукты реакции восстановления и карбоксиметилирования (5), вазопрессин (4) и инсулин (1). А-цепь (3) инсулина была отделена в III цикле, остальные компоненты смеси — в IV цикле разделения. Получен-

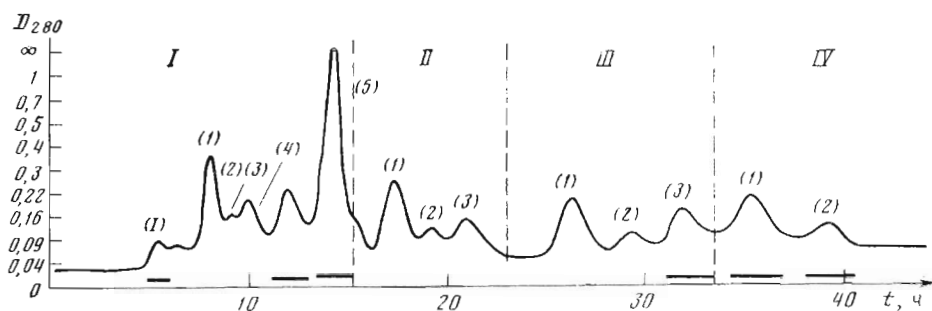


Рис. 1 Гель-хроматография смеси АКГГ (1), цепей А (3) и В (2) инсулина (1) и вазопрессина (4) на колонке (0,4 × 120 см) с сефадексом G-50 в режиме рецикла (I—IV циклы). Элюент — 5 M Gun · HCl — трис-буфер, рН 8,5, скорость элюции 1,2 мл/ч. Жирной чертой отмечены отделяемые в каждом цикле фракции

ные фракции, содержащие отдельные компоненты смеси, обессоливали на колонке с сефадексом G-10 и лиофилизовали. Гомогенность выделенных пептидов контролировали анализом N-концевых аминокислот в виде Dns-производных.

Все выделенные компоненты смеси содержали только одну N-концевую аминокислоту, что свидетельствует, по крайней мере, о 98%-ной чистоте полученных пептидов.

Таким образом, с помощью рециркуляционной хроматографии удалось полностью разделить анализируемую смесь пептидов. Следует отметить, что использованная методика позволила впервые с помощью гель-хроматографии разделить А- и В-цепи инсулина.

Длительность разделения (4 цикла) при оптимальной для использованной колонки скорости элюции (1,2 мл/ч) составляла 40 ч.

Ускорение процесса фракционирования пептидов с помощью описанной методики может быть достигнуто при переходе к микроколоночной хроматографии. Этим методом разделение цепей А и В инсулина на системе полиэтиленовых колонок (диаметр 0,085, общая длина 51 см), заполненных сефадексом G-50, может быть осуществлено за 4 ч (4 цикла хроматографии).

Таким образом, разработанная система рециркуляционной гель-хроматографии на сефадексе G-50 с размером частиц 20—30 мкм в 5 M Gun · HCl является высокоэффективным методом разделения пептидов с  $M$  1000—5000 и позволяет полностью разделять пептиды, различающиеся по величинам молекулярных весов примерно на 1000.

### Экспериментальная часть

В работе использовали следующие препараты: инсулин (Рижский мясокомбинат); АКГГ (Ленмясокомбинат им. С. М. Кирова) и вазопрессин (синтетический, Calbiochem. Calif., США), дансилхлорид (Fluka A. G., Bush S. G., Швейцария); хлористый гуанидин, ч. («Союзреактив», СССР, очищали однократной перекристаллизацией из смеси метанол—вода, 1 : 1), сефадексы G-10, G-50, «Superfine» (Pharmacia, Швеция).

Работу проводили на хроматографическом комплексе фирмы ЛКВ (Швеция), состоящем из перистальтического насоса «Varioprepex», коллектора фракций «Ultrarak» и УФ-детектора «Uvicord-2» с кюветой объемом 100 мкл, а также на установке для микроколоночной хроматографии, собранной на основе микроспектрофотометра МСФП-3 (НИОХ СО АН СССР) с кюветой объемом 1 мкл.

**Фракционирование сефадекса.** Сефадекс G-50 (50 г) заливали 1000 мл дистиллированной воды и оставляли набухать на 24 ч. Набухший в воде сефадекс помещали в стеклянные цилиндры диаметром 5 см (высота слоя

сефадекса 9—10 см), куда добавляли дистиллированную воду до высоты 28 см и перемешивали. Через 15—20 мин после окончания перемешивания в цилиндре отчетливо наблюдаются различающиеся по прозрачности три слоя: верхний слой с размером частиц 20—30 мкм, средний — 30—50 мкм и нижний — 50—70 мкм (размер зерна в полученных фракциях контролировали с помощью микроскопа). Отбирали фракцию с размером частиц 20—30 мкм, к оставшемуся сефадексу вновь добавляли воду и операцию повторяли. Объединенные фракции с размером частиц 20—30 мкм подвергали дополнительному фракционированию не менее 5 раз. Полученный таким образом сефадекс сохраняли под слоем воды с добавлением небольшого количества азида натрия.

*Приготовление колонок.* Для хроматографии использовали стеклянные колонки (0,4 × 120 см), которые предварительно силанизировали. С этой целью колонку заполняли 1%-ным раствором диметилдихлорсилана в бензоле и выдерживали 20 мин, раствор сливали и после испарения бензола колонку нагревали в термостате при 150° в течение 2 ч. Эту процедуру повторяли дважды.

Фракционированный сефадекс переносили в 5 М раствор  $\text{Gin} \cdot \text{HCl}$  (рН 8,5). Объем взвеси должен быть не менее двойного объема колонки. Полученную взвесь дегазировали, перемешивая на магнитной мешалке в вакууме в течение 40 мин. В колонку с нижнего конца вставляли полиамидный фильтр, а к верхнему концу присоединяли стеклянную трубку внутренним диаметром 0,4 и высотой 80 см. Колонку и присоединенную к ней трубку заполняли сефадексом, отсасывая воздух с нижнего конца колонки водоструйным насосом. Чтобы избежать излишнего уплотнения сефадекса, водоструйный насос отключали, когда слой взвеси достигнет фильтра.

Колонку с присоединенной трубкой устанавливали строго вертикально и подсоединяли к перистальтическому насосу. Уплотнение насадки производили, прокачивая элюент перистальтическим насосом со скоростью 1,2 мл/ч. Объем уплотнившегося при этой скорости сефадекса был больше объема набиваемой колонки, и его верхний уровень находился в присоединенной к колонке дополнительной трубке. После того как верхний уровень сефадекса в трубке переставал понижаться, ее отсоединяли, колонку присоединяли к насосу через адаптер с фильтром и промывали 30—40 мл элюирующего раствора со скоростью 1,2 мл/ч.

Аналогичным образом заполняли и микроколонки. Во время заполнения колонки сефадексом и работы на ней необходимо предохранять систему от попадания пузырьков воздуха.

*Подготовка образцов.* Соответствующий пептид (3 мг) растворяли в 0,15 мл 6 М  $\text{Gin} \cdot \text{HCl}$ , добавляли 0,015 мл 10%-ного водного раствора  $\beta$ -меркаптоэтанола и 1%-ный раствор метиламина до рН 8,5. Реакционную смесь оставляли на 4 ч при 20°. Затем осторожно прибавляли 0,018 мл раствора иодуксусной кислоты (189 мг в 0,7 мл 1 н.  $\text{NaOH}$ ), поддерживая рН 8—9 добавлением 1% метиламина. После добавления всего количества иодуксусной кислоты реакционную смесь оставляли в темноте на 1 ч.

*Рециркуляционная хроматография пептидов.* Половину объема реакционной смеси (после восстановления и карбоксиметилирования АКГГ, инсулина и вазопрессина), содержащую по 1,5 мг каждого компонента (0,09 мл), наносили на колонку (0,4 × 120 см) с сефадексом G-50 с помощью насоса, соединенного капиллярной фторопластовой трубкой внутренним диаметром 1 мм с верхним адаптером колонки. Нижний адаптер колонки присоединяли к «Увикорду» ( $\lambda$  280 нм), а выход с него — к перистальтическому насосу с всасывающей стороны. Таким образом осуществлялась работа установки в режиме репикла. Элюцию проводили 5 М раствором  $\text{Gin} \cdot \text{HCl}$ , в который добавляли кристаллический трис-ОН до рН 8,5, со скоростью 1,2 мл/г (см. рис. 1). Для полного разделения смеси пептидов потребовалось четыре цикла разделения (около 40 ч).

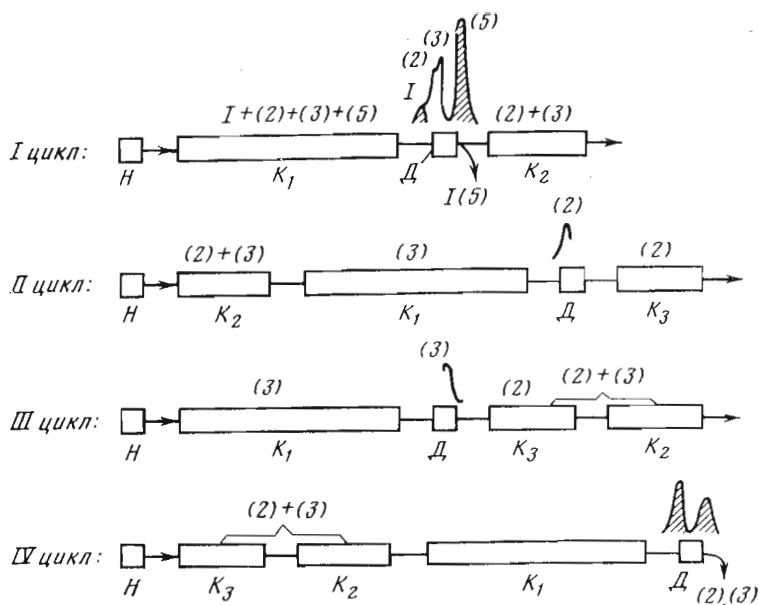


Рис. 2. Схема рециркуляционной микроколоночной хроматографии смеси инсулина (1), цепей А (3) и В (2) инсулина и низкомолекулярных продуктов (5). и — насос, д — детектор,  $K_1$ — $K_2$  — колонки, кривая пад детектором — запись хроматограммы в каждом цикле (заштрихованные пики — отбираемые фракции)

В случае микроколоночной хроматографии рецикл осуществляли с использованием трех полиэтиленовых колонок (диаметр 0,085 см) длиной: 28 см ( $K_1$ ), 12 см ( $K_2$ ) и 11 см ( $K_3$ ). Колонку  $K_1$  присоединяли одним концом к шприцевому насосу, а другим — к детектору. На выходе из него присоединяли колонку  $K_2$ . Пробу пептидов (8 мкг восстановленного инсулина в 0,5 мкл элюирующей жидкости) наносили на колонку  $K_1$ . Элюцию производили со скоростью 0,16 мл/ч. Для нанесения пробы и отбора фракций колонки отсоединяли от насоса и детектора. На I цикле разделения (рис. 2) отбирали фракции, содержащие инсулин и низкомолекулярные компоненты (5). Фракции, содержащие А- и В-цепи инсулина, переводили в колонку  $K_2$ . На этом I цикл разделения завершался. Далее колонку  $K_2$  присоединяли к верху колонки  $K_1$  и подключали к насосу, а к детектору присоединяли колонку  $K_3$ . Таким образом цепи инсулина вновь поступали в колонку  $K_1$  и из нее в детектор. При этом отделившийся компонент (2) (В-цепь инсулина) переходил в колонку  $K_3$ . На III цикле к колонке  $K_3$  присоединяли колонку  $K_2$  (общая длина колонок  $K_3$  и  $K_2$  23 см). В эти колонки собирали А- и В-цепи инсулина, после чего колонки  $K_3$  и  $K_2$  присоединяли к колонке  $K_1$  и подключали к насосу. На этом IV цикле происходило полное разделение цепей А и В инсулина. Длину колонок, присоединяемых после детектора в каждом цикле, можно определить объемом прошедшего через детектор элюента, соответствующего заднему фронту заданного хроматографического пика (В-цепи инсулина во II цикле, А-цепи инсулина в I и III циклах).

Для обессоливания фракций, полученных на колонке ( $0,4 \times 120$  см), их объединяли в пределах каждого пика, наносили на колонку ( $0,8 \times 40$  см) с сефадексом G-10, пептиды элюировали водным раствором аммиака (рН 9—10) и лиофилизовали. Для определения N-концевых аминокислот около 0,2 мкмоль пептида дансильировали и гидролизovali. Днс-аминокислоты идентифицировали с помощью микротонкослойной хроматографии на пластинках ( $6 \times 6$  см) с силикагелем [2].

Авторы благодарят В. Г. Мальцева (Институт высокомолекулярных соединений АН СССР) и Ю. С. Смирнова (Институт биоорганической химии АН СССР) за помощь в работе и ценные советы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Tanford C., Fish W., Mann K. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4989—4994.
2. Бельский Б. Г., Нестеров В. В., Ганкина Э. С. (1970) в сб. *Физические и физико-химические методы анализа органических соединений*, с. 80—91, «Наука», М.

Поступила в редакцию  
10.VII.1978

После доработки  
11.X.1978

## HIGH EFFICIENT GEL CHROMATOGRAPHY OF LARGE PEPTIDES

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

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

An efficient method has been worked out in preparative and microcolumn modes for separating large peptides by recycling gel chromatography on Sephadex G-50 of 20—30  $\mu$  particle size. For preparative chromatography glass columns with 0.4 cm  $\times$  120 cm dimensions were used. The separation of the following large peptides was achieved within 40 hr (4 cycles) using 5 M Gu·HCl-Tris buffer pH 8.5 at the eluent flow rate of 1.2 ml/hr (peptide molecular weight is given in parentheses): ACTH (4504), insulin A and B chains (2537 and 3376, respectively), and vasopressin (1145). Micro-column gel chromatography with recycling on polyethylene columns (diameter 0.085 cm, length 28, 12, or 11 cm) permitted the separation of insulin A and B chains within 4 hr (4 cycles, eluent flow rate 0.16 ml/hr).

---