

К. Г. Бурдашкина¹, А. П. Власов², Д. А. Русанович²,
О. Н. Ринейская¹, В. В. Кирковский¹, Г. Н. Бычко¹

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМЫ НА КОЛОНКЕ SUPERDEX 75 10/300 GL

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии
и медицинских биотехнологий», г. Минск²

В статье приведены данные молекулярно-массового распределения белков и продуктов их деградации на колонке Superdex 75 10/300 GL, что является воспроизводимым экспресс-методом определения уровня пептидемии, обеспечивающим эффективное разделение плазмы на группы белково-пептидных компонентов. Получены данные высокоэффективного гель-хроматографического разделения 59 образцов нативной плазмы крови и супернатантов осажденной хлорной кислотой с последующей нейтрализацией. Установлен протокол предварительной подготовки плазмы к ВЭЖХ анализу с использованием кислотно-этанольного осаждения с последующей нейтрализацией 2М К₂СО₃. При одновременной регистрации при 4-х длинах волн (210, 220, 260, 280 нм) были определены времена удерживания среднемолекулярных пептидов в нативной плазме (33,72 мин), супернатанта в присутствии ацетатного буфера (33,82 мин) и в присутствии К₂СО₃ (33,81 мин) с определением точной молекулярной массы (2797,48; 2737,23 и 2743,19 Да соответственно).

Ключевые слова: высокоэффективная гель-хроматография, среднемолекулярные пептиды, молекулярно-массовое распределение.

**K. G. Burdashkina, A. P. Vlasov, D. A. Rusanovich,
Oh. N. Rineyskaya, V. V. Kirkovsky, G. N. Bychko**

OPTIMAL CONDITIONS FOR HIGH-PERFORMANCE GEL CHROMATOGRAPHY OF PLASMA PROTEIN AND PEPTIDE COMPONENTS ON SUPERDEX 75 10/300GL COLUMN

The data of molecular weight distribution of proteins and their degradation products using column Superdex 75 10/300 GL is reproducible rapid method to determine peptidemia level providing effective separation of plasma into the protein and peptide group components are given in the article. The data of high-performance gel chromatographic separation of 59 native plasma samples and supernatants precipitated with perchloric acid followed by neutralization are received. Plasma preliminary preparation protocol for HPLC analysis using acid-ethanol precipitation with subsequent neutralization of 2M K₂CO₃ is specified. Under simultaneous registration at 4 wavelengths (210, 220, 260, 280 nm) the retention time for middle molecular peptides in the native plasma (33.72 min), supernatant with acetate buffer (33.82 min) and supernatant with K₂CO₃ (33.81 min) were determined to identify the exact molecular mass (2797.48 Da, 2737.23 Da and 2743.19 Da respectively).

Key words: high-performance gel chromatography, middle molecular peptides, molecular weight distribution.

Известно, что способы разделения белков основаны на их физико-химических особенностях. Так, геометрия молекулы (радиус Стокса) и масса, являются критериями разделения методами гель-хроматографии, ультрафильтрации, отчасти гель-электрофореза. На различии соотношения заряженных функциональных групп белков при разных значениях pH основано разделение белков методами ионообменной хроматографии, электрофореза, изоэлектрического фокусирования. Различие

в числе и характере гидрофобных участков поверхности использует гидрофобная и обращенно-фазная хроматография, а специфические взаимодействия, основанные на комплементарности, – аффинная хроматография [2]. Однако применение данных методов в анализе биологических жидкостей усложняется мешающим воздействием компонентов сходных параметров, а их использование в клинико-лабораторной практике сопряжено с длительностью выполнения.

Так, применение гель-хроматографического разделения основано на различной скорости элюции белков через сорбент, в качестве которого используют гранулированный гель поперечно-сшитых гидрофильных материалов, например декстрана, полиакриламида, поливинилового спирта. Зависимость между объемом элюции и молекулярной массой белка позволяет использовать метод в изучении характера молекулярно-массового распределения компонентов биологических жидкостей [4, 5].

Одними из основных компонентов протеомного статуса плазмы (сыворотки) крови при дисбалансе в протеазоингибиторной системе, являются продукты ограниченного протеолиза, так называемые «среднемолекулярные» пептиды (СМП) с массой порядка 500–10 000 Да. Они обладают рядом патобиологических эффектов и являются одним из основных показателей тяжести синдрома эндогенной интоксикации организма [1]. Однако в широкой клинической практике СМП не исследуются из-за неспецифичности существующих методов прямой спектрофотометрии.

Цель работы. Подобрать оптимальные условия проведения гель-хроматографического анализа белково-пептидных компонентов плазмы на колонке Superdex 75 10/300 GL.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись 59 образцов плазмы крови, заготовленной с использованием цитратного консерванта (9:1). Использовали нативную плазму и депротеинизированную с последую-

ющей нейтрализацией (ацетатным буфером и K_2CO_3). Применяли хроматографическую систему среднего давления «NGC Scout 10» (BioRad, США), оснащенную мультиволновым UV/Vis детектором с мониторингом проводимости. Разделение проводили на колонке Superdex 75 10/300 GL, матрица которой представляет собой композит из поперечно сшитой агарозы и декстрана, с эффективностью более 30 000 теоретических тарелок/м. Оптимальный диапазон разделения глобулярных белков составляет 3000–70 000 Да, декстранов 500–3000 Да, диапазон стабильности по pH 3,0–12,0. В качестве элюирующего раствора использовали буферную систему PBS (phosphatebufferedsaline), состоящую из 0,05 М фосфатного буфера и 0,15 М NaCl, pH 7,2. Скорость элюции PBS составляла 0,5 мл/мин. Детектирование осуществляли одновременно при длинах волн 210, 220, 260 и 280 нм, соответствующим максимумам поглощения пептидной связи и ароматических остатков. Длина оптического пути составляла 0,5 см. Интегрирование полученных пиков проводили с использованием программной оболочки CromLab (BioRad, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. Для калибровки колонки готовили модельную смесь из стандартного набора белков: кональбумин (75 000Да), карбоангидраза (29 000Да), рибонуклеаза (13 700 Да), апротинин (6500 Да) и пептид ангиотензин (1046 Да) (рис. 1, А). Строили калибровоч-

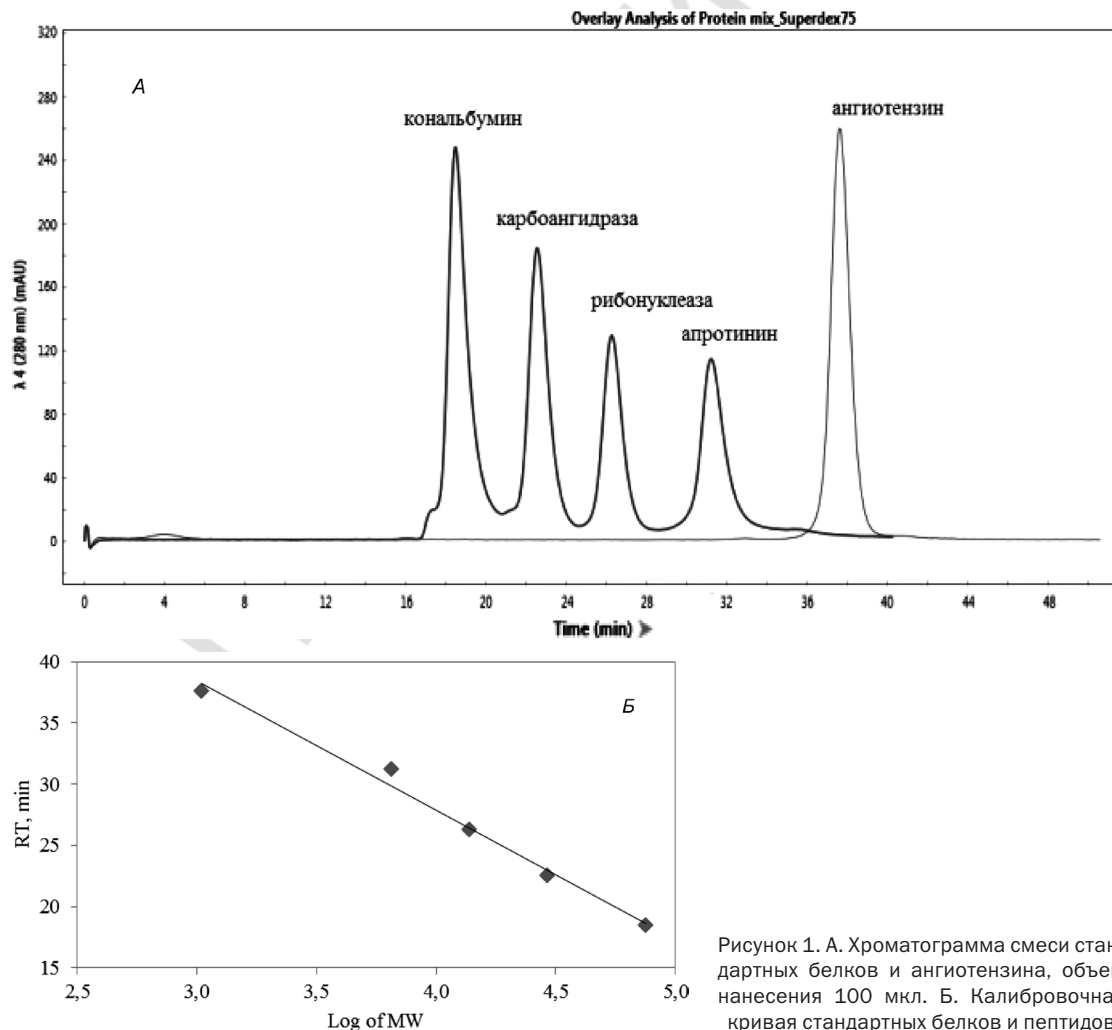


Рисунок 1. А. Хроматограмма смеси стандартных белков и ангиотензина, объем нанесения 100 мкл. Б. Калибровочная кривая стандартных белков и пептидов

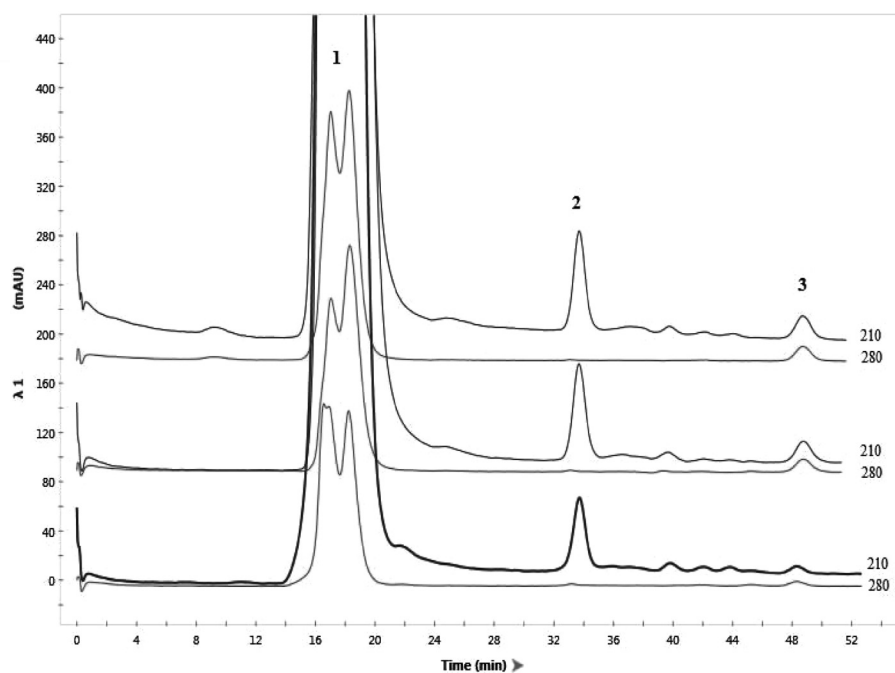


Рисунок 2. Хроматограммы образцов плазмы, разведение PBS (1:10), объем нанесения 100 мкл, колонка Superdex 7510/300 GL

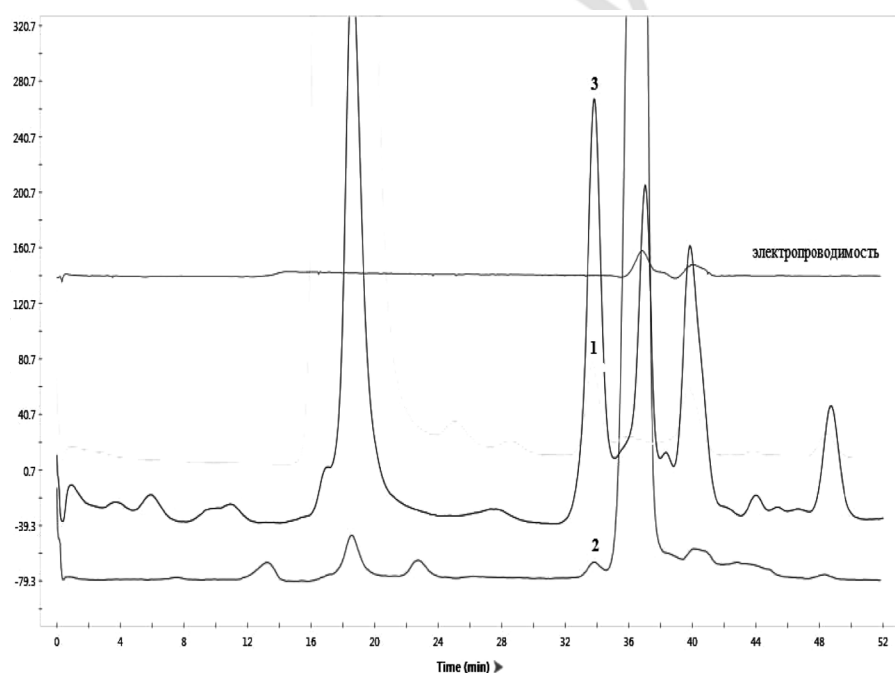


Рисунок 3. Хроматограммы плазмы (1), осажденной КЭО в присутствии 4М ацетатного буфера pH 4,5–5,0 (2), осажденной КЭО с нейтрализацией 2М K_2CO_3 (3) pH 8,5–9,0. Объем нанесения по 100 мкл

ную кривую зависимости времени удерживания (retention time, RT) от молекулярной массы разделяемых компонентов (Mass Weight, MW) с уравнением регрессии $y = -10,576x + 70,173$ ($R^2 = 0,9889$) (рис. 1, Б).

Образцы плазмы крови разбавляли буферным раствором PBS в 10 раз, центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин. Перед нанесением на колонку плазму фильтровали через Millex-фильтры (Millipore, США) из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,22 мкм. В дальнейшем было установлено, что нефiltroванная плазма дает идентичную картину разделения, тем не менее для экономии ресурса колонки данный этап был сохранен.

Была получена достаточно типичная картина разделения (рис. 2), включающая пик 1 высокомолекулярных белков (примерно 14–24 мин), пик 2 средномолекулярных компонентов (примерно 32–36 мин) с минимальным поглощением при 280 нм и пик 3 пептидной природы (после 48 мин). При интегрировании пиков 17 образцов плазмы было установлено, что среднее время удерживания белково-пептидных компонентов средней молекулярной массы составляет 33,72 минуты (33,69–33,75), что, согласно уравнению регрессии, соответствует примерно 2797,48 Да (2779,26–2815,81). Небольшой сигнал пика 2 при 280 нм, возможно, вызван небольшим

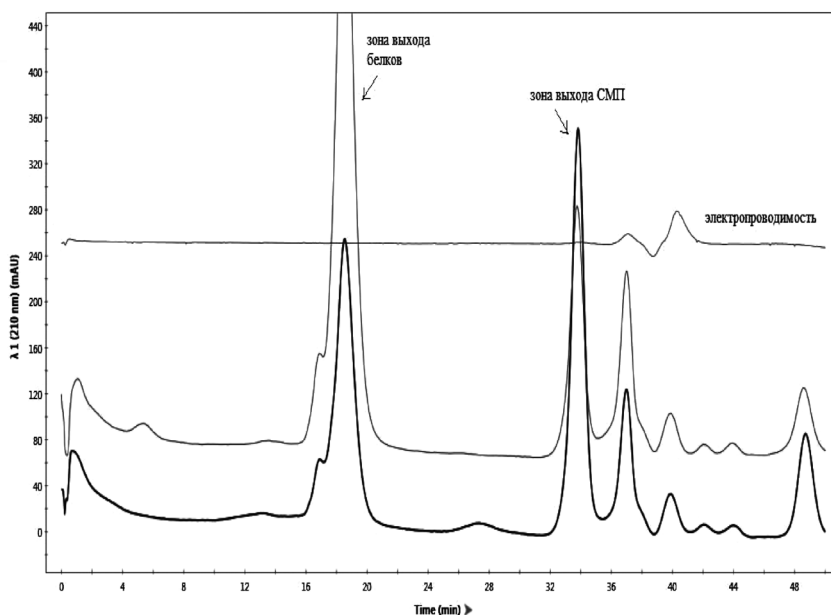


Рисунок 4. Хроматограмма супернатанта, нейтрализованного 2М K_2CO_3 , рН 8,5–9,0. Объем нанесения по 100 мкл

количеством ароматических аминокислотных остатков (тирозин, фенилаланин, триптофан), поглощающих именно при этой длине волны, а пик 3, выходящий с опозданием, напротив, скорее всего со связыванием этих ароматических остатков с матрицей сорбента [4]. Фракция № 2 соответствует пептидам с длиной цепи от 25 и до 30 аминокислотных остатков, если учесть, что средняя молярная масса аминокислоты примерно 100 Да). Фракция № 3, предположительно, соответствует коротким пептидам с более высоким содержанием ароматических аминокислотных остатков, однако определение их длины выходит за пределы эксклюзии данной хроматографической колонки.

Для изучения уровня пептидемии в протеолитически активной плазме у пациентов при патологии особенный интерес представляют пептиды группы «средних молекул». Из-за мешающего влияния белковых компонентов плазмы сигнал этого пика (2) при 280 нм недостаточно выражен, поэтому мы рассматривали возможность пробоподготовки плазмы при помощи депротеинизации. Для выделения пула среднемолекулярных пептидов использовали метод кислотно-этанольного осаждения (КЭО), при котором крупномолекулярные белковые комплексы осаждаются 1,2 М хлорной кислотой, с последующим доосаждением этиловым спиртом [3]. Однако рабочий диапазон рН колонки требует нейтрализации анализируемого супернатанта. Для этого к полученному хлорнокислому супернатанту добавляли 4М ацетатный буфер (рН 4) и 10М NaOH в объемном соотношении (мл) 300:30:1,5 соответственно. При этом рН конечного раствора составил 4,5–5,0. Однако мониторинг электропроводности показал, что в доосажденном спиртом супернатанте (рис. 3) в области выхода низкомолекулярных белков и среднемолекулярных пептидов появляется скачок, что свидетельствует о выходе ацетатного буфера в той же области.

Во избежание фонового влияния ацетатного буфера хлорнокислый супернатант нейтрализовали 2 М раствором K_2CO_3 в объемном соотношении 4:1, перемешивали и оставляли на льду 15–20 минут для полного выпадения калия хлората, центрифугировали 5 минут при 12 000 оборотов/мин. При добавлении к супернатанту этанола (объемное соотношение 4:1), выдерживали время экспозиции

не менее 10 минут, и центрифугировали 5 минут при 12 000 оборотов/мин. рН полученного супернатанта составил 8,5–9,0. Типичная хроматограмма разделения супернатанта представлена на рис. 4.

Таким образом, применение хроматографического профилирования является информативным методом мониторинга стационарного состояния белков и функционирования системы протеолиза в плазме. При анализе молекулярно-массового распределения белков и пептидов методом гель-хроматографии на колонке Superdex 75/10 300 GL при одновременной регистрации на 210, 220, 260, 280 нм были определены групповые зоны выхода крупномолекулярных белков и СМП, а также среднее время удерживания СМП в нативной плазме (33,72 мин), супернатанта в присутствии ацетатного буфера (33,82 мин) и в присутствии K_2CO_3 (33,81 мин) с определением точной молекулярной массы (2797,48; 2737,23 и 2743,19 Да соответственно). Установлен протокол предварительной подготовки плазмы к анализу с использованием КЭО с последующей нейтрализацией 2М K_2CO_3 , обеспечивающий лучшее разрешение, чем 4М ацетатный буфер.

Литература

1. Карякина, Е. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // *Клин. лаб. диаг.* – 2004. – № 3. – С. 4–8.
2. *Молекулярная биология. Структура и функции белков:* учебник / В. М. Степанов. – 3-е изд. – М.: Изд-во Моск. ун-та: Наука, 2005. – 336 с.
3. *Способ определения «средних молекул»* / В. В. Николайчик [и др.] // *Лаб. дело*, 1991. – № 10. – С. 15–18.
4. *Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography* / E. R. S. Kunji [et al.] // *Methods*. – 2008. – № 46. – P. 62–72.
5. *Hong, P. Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates* / P. Hong, S. Koza, E. S. P. Bouvier // *J. Liq Chromatogr. Relat. Technol.* – 2012. – № 35(20). – P. 2923–2950.
6. *Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides* / Haleem J. Isaaq [et al.] // *Electrophoresis*. – 2002. – P. 3048–3061.

Поступила 11.01.2018 г.