

Хроматофокусирование трипсиновых гидролизатов белков на сульфокатионообменнике

Курек Д.В., Вакиштейн М.С.

студент, сотрудник

МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет 119992, Москва, Россия

E-mail: Svoboda_rus@mail.ru

В последние годы ВЭЖХ становится важным методом при идентификации пептидов, установлении структуры белка и, особенно, - при поиске генетических дефектов (составлении пептидных карт). При поиске дефектов сравнивают хроматограммы трипсиновых гидролизатов аномального и нормального белков, полученные в одинаковых условиях, и находят отличающиеся пептиды. Порядок разделения пептидов определяется несколькими параметрами: зарядом, количеством пептидных связей, гидрофобностью и т.д., что позволяет использовать различные варианты ВЭЖХ. Одно из новых направлений - хроматофокусирование (ХФ) пептидов на сильно- и слабокислотных катионитах, основанное на формировании линейного градиента рН внутри колонки при пропускании синтетического полибуферного элюента. Однако такие полибуферы затрудняют детектирование неароматических пептидов ниже 254 нм за счет собственного поглощения, что делает актуальным поиск более простых элюентов, не поглощающих в УФ-области. При выборе компонентов подвижных фаз для разделения была использована разработанная нами ранее база данных по внутренним градиентам рН в хроматофокусировании «CFocus». В ней содержится информация о подвижных фазах, колонках, сорбентах, которые применялись ранее в данном методе. Предложены простые подвижные фазы на основе Трис и фосфатного буфера, формирующие линейный градиент рН от 3 до 7 даже на сульфокатионообменном сорбенте Hamilton PRP-X200, практически не обладающем буферной емкостью. Также эти компоненты обладают собственным низким поглощением в УФ-области, что позволяет детектировать низкие концентрации пептидов. Добавки сильного электролита (0,1-0,5 М NaCl) в подвижные фазы позволяют получить более плавный и протяженный градиент (до 15 минут). Для снижения гидрофобности в систему добавляли 10% ацетонитрила. Варьируя концентраций компонентов в подвижных фазах – стартовом растворе и элюенте (от 3мМ до 10 мМ для фосфатного буфера и от 6 мМ до 10 мМ для Трис), получили ряд градиентов рН с различной протяженностью (от 5 до 25 минут, в отдельных случаях до 40 минут).

Предложенные системы применили для разделения трипсиновых гидролизатов человеческого и бычьего сывороточного альбумина методом хроматофокусирования. В данном случае разделение происходит по смешанному механизму: различия в значениях изоэлектрических точек, широкий диапазон размеров пептидов (начиная от одиночных аминокислот до достаточно объемных пептидов), различное сродство к подвижной фазе. Детектирование проводили в УФ-области при 206-254 нм. Получены хроматограммы с 10-14 хорошо разделенными пиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 33096).