



No.073

SEPARATION REPORT

TSKgel 色谱柱在尺寸排阻色谱法分离多肽中的应用

— 目 录 —

	页码
1. 前言	1
2. 应用实例	3
3. 总结	6

1. 前言

采用高性能尺寸排阻色谱法 (GFC 或 SEC) 进行多肽分离, 操作简便, 不仅可用作检测分子量的手段, 还可作为纯化多肽与蛋白质分解产物如多肽片断的方法之一。可与反相色谱法 (RPC) 及离子交换色谱法 (IEC) 联用。同时, 在临床上还通过把 GFC 进行比较, 来推测病程的进展。

表 1 所示为 TSKgel 色谱柱在采用 GFC 法进行多肽分离的相关文献及其概要。

各著者均对洗脱液进行了细致的分离, 明确了 GFC 法中使用的洗脱液对分离性能与分馏后处理会产生影响。一般情况下, 采用 GFC 法分离多肽所使用的填充剂多为 TSKgel 的 SW 硅胶型填料而非 TSKgel 的 PW 树脂型填料。

本报告中, 将针对这些填充剂 (TSKgel G2000SW_{XL} 以及 TSKgel G2500PW_{XL}) 在多肽分离的应用上进行探讨。另外, 关于反相色谱法 (RPC) 在多肽分离方面具有的高分离性能, 在分离报告 No.63、65、69 中进行了详细的描述, 敬请参考。

表 1 采用 GFC (SEC) 分离多肽的主要文献

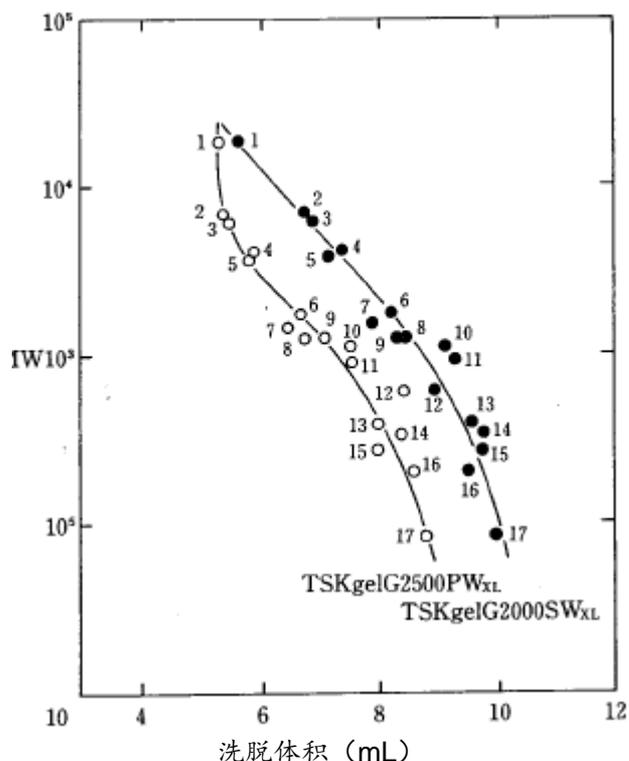
文献编号	色谱柱	样品	分离条件及概要
1	TSKgel G2000SW	尿毒症患者体液中的多肽	50mM 磷酸缓冲液 (pH7.2) +0.3%SDS 正常人与患者血清的 GFC 分离对比
2	TSKgel G2000SW	多肽标准品 (MW200~10,000)	0.15M 磷酸缓冲液 (pH7.4) +1MNaCl+20%甲基醇 纤剂+1%SDS 详细研究约 50 种多肽的洗脱效果
3	TSKgel G3000PW	多肽标准品 (MW300~)	0.1%TFA+45%乙腈 研究了 PW 色谱柱对 11 种多肽的洗脱条件
4	TSKgel G2000SW TSKgel G3000SW	多肽标准品 (MW255~)	6M 盐酸胍 研究标准曲线的线性
5	TSKgel G2000SW	多肽标准品 (MW255~9,700)	0.1M 甲酸 研究多肽的脱盐
6	TSKgel G2000SW	心房利钠肽	10mMTFA+0.2MNaCl+30%乙腈 3K~5K、13K 活性多肽的分离
7	TSKgel G3000SW	肌钙蛋白 I-CNBr 断片 (MW1,437~4,050)	0.2M 甲酸钠+6M 尿素+0.1%TFA 采用可直接导入下一步 IEC 的洗脱条件进行分离
8	TSKgel G2000SW	β -微管蛋白消化物 (3~30 个氨基酸的多肽)	10mM 醋酸铵 (pH6.8) 通过与 RPC 联用进行分离纯化
9	TSKgel G2000SW	多肽标准品及酪氨酸水解产物	0.05M 磷酸缓冲液 (pH2.5) +0.1%TFA+35%甲醇 研究多肽的洗脱条件
10	TSKgel G2000SW TSKgel G3000SW	多肽、蛋白质标准品	0.1%TFA+0.25MNaCl 研究了 37 种样品的分子量、氨基酸残基与洗脱位置的关系
11	TSKgel G2000SW	异常胶原纤维的消化物	10mM 磷酸缓冲液+6M 盐酸胍+1mMEDTA 多肽的纯化与分子量的测定 (MW1,535~2,473)
12	TSKgel G2000SW	胶原蛋白 α 2 (IV) 链消化物	0.1%TFA+醋酸铵 GFC+RPC 联用进行多肽纯化
13	TSKgel G2000SW	多肽标准品及肌球蛋白 CNBr 断片	0.1%TFA 或 50mMKH ₂ PO ₄ (pH6.5) +0.5MKCl+8M 尿素等 研究多肽的洗脱情况、以及与填充剂的相互作用
14	TSKgel G2000SW	β -内啡肽 β -促脂素	50mM 磷酸缓冲液 (pH5.8) +20%乙腈 对 RPC 无法分离的多肽采用 GFC 法分离
15	TSKgel G2000SW	6-磷酸-2-激酶的胰蛋白酶消化物	20mM 磷酸缓冲液 (pH6.0) +6M 盐酸胍 对含有标记氧化活性部位的多肽实施分离
16	TSKgel G2000SW	α -麦角蛋白消化物	6M 盐酸胍 (pH4.95) 测定 RPC 法纯化后多肽的分子量(MW300~3,000)
17	TSKgel G2000SW	氨基酸-tRNA 合成酶的多肽断片	醋酸: 乙腈: 水=2: 3: 5 对含有活性部位的多肽进行分离
18	TSKgel G2000SW	人淋巴细胞嗜中性多肽	0.1%TFA 多肽 (10k) 的分离、酸性条件下分离、回收率佳
19	TSKgel G2000SW	乙酰胆碱受体活性部位的多肽断片	10%醋酸+8M 尿素 亲和标记的多肽断片的纯化、分子量测定
20	TSKgel G2000SW	牛乳清蛋白质的水解物	0.1%TFA+35%甲醇 研究样品水解物对致敏作用的影响
21	TSKgel G2000SW	各类多肽	HPLC 法分离多肽的总论 阐述了 GFC、RPC、IEC 分离模式的对比及其联用等内容
22	TSKgel G2000SW	血红蛋白消化物	10mM 醋酸铵 (pH6.0) 中试规模生产的试样中多肽消化物 (MW1000~22000) 的分离
23	TSKgel G2000SW	人中性粒细胞多肽 (MW3,715)	50mM 甘氨酸 (pH2) +0.1MNaCl 通过与 RPC 联用进行纯化, 氨基酸序列分析
24	TSKgel G3000PW	Cyt P450sc-皮质铁氧还蛋白复合体的多肽断片	0.1%TFA+30%乙腈 复合物形成部位的多肽分离纯化, 使用 PW 型色谱柱进行分离

2. 实例应用

1) 标准多肽的分离

表 2 所示为各多肽标准液的洗脱体积，图 1 所示为标准曲线。洗脱液采用含有 45%乙腈的 0.1%TFA 溶液。所有 TSKgel G2000SW_{XL} 的样品洗脱速度均慢于 TSKgel G2500PW_{XL}。同时，在 TSKgel G2000SW_{XL} 中，肌球蛋白 (MW17,800) 进入填充剂的小孔内部，但在 TSKgel G2500PW_{XL} 中，肌球蛋白被小孔排阻，从外水体积中被洗脱。根据其结果，可认为 TSKgel G2500PW_{XL} 在上述洗脱液条件下的多肽分子量排阻界限推测为 8000，相比之下，硅胶型填充剂 TSKgel G2000SW_{XL}，可适用于从低分子量到高分子量区域更广的范围。

图 1 TSKgel G2500PW_{XL} 与 TSKgel G2000SW_{XL} 的标准曲线



色谱柱: TSKgel G2500PW_{XL}、TSKgel G2000SW_{XL}
(7.8mm ID X 30cm)

洗脱液: 0.1%TFA+45%乙腈

流速: 1mL/min

温度: 25℃

检测: UV (215nm)

样品: 1. 血红蛋白(17,800) 2. 抑肽酶(6,500)
3. 胰胰岛素(5,807) 4. 大胃泌素(3,849)

另一方面,如样品分子量低于 3000, TSKgel G2500PW_{XL} 显示的标准曲线与 TSKgel G2000SW_{XL} 几乎趋于相同, 分离范围非常接近。但是, 对比各多肽的洗脱体积, 两者尚存有微妙的区别 (尤其是亮氨酸脑啡肽), 这是由于在分离过程中样品与填充剂之间的相互作用 (离子性、疏水性的相互作用等) 而造成的影响。

表 2 采用 TSKgel G2500PW_{XL} 与 TSKgel G2000SW_{XL} 的多肽洗脱体积?

多肽标准品	MW	洗脱体积 (mL)	
		TSKgel G2500PW _{XL}	TSKgel G2000SW _{XL}
Glycine	75	8.8	10.0
Alanyl-valine	188	8.6	9.5
Glycylglycylglycylglycine	246	8.0	9.7
Glutathione	307	8.4	9.8
TRH	362	8.0	9.6
Leucine-Enkepharin	555	8.5	9.0
DSIP	848	7.6	9.3
Oxytocin	1,007	7.6	9.2
LH-RH	1,182	7.1	8.3
Bradykinin potentiator B	1,182	6.7	8.4
Substance P	1,347	6.5	7.9
Bombesin	1,619	6.7	8.2
Glucagon	3,482	5.9	7.2
Big gastrin	3,849	5.9	7.4
Insulin	5,807	5.5	6.9
Aprotinin	6,500	5.4	6.7
Mvozlobin	17,800	(5.35)*	5.6

洗脱液: 0.1%TFA+45%乙腈
流速: 1.0mL/min

*完全排阻

5. 胰高血糖素 (3,482) 6. 胃泌素 (1,619)
7. 物质 P (1,347) 8. 缓激肽-增强剂 B (1,182)
9. LH-RH (1,182) 10. 后叶催产素 (1,007)
11. DSIP (848) 12. 亮氨酸-脑啡肽 (555)
13. TRH (362) 14. 谷胱甘肽 (307)
15. 四聚甘氨酸 (246) 16. 甘氨酸 (75)

图 2、3 所示为 TSKgel G2500PW_{XL} 与 TSKgel G2000SW_{XL} 在分离多肽标准品时的对比图。通过色谱图可以明确的看出，TSKgel G2000SW_{XL} 吸收峰形与分离带的宽度均更佳，因此其分离性能更为优异。另一方面，如果多肽的分子量小于 1000，由于样品与填充剂之间的某些相互作用，使用 TSKgel G2500PW_{XL} 时的分离效果要高于 TSKgel G2000SW_{XL}。例如图 2 中所示的后叶催产素 (MW1,007) 与亮氨酸-脑啡肽 (MW555)、以及图 3 所示的 TRH (MW362) 与甘氨酸 (MW75) 均显示了其分离效果高于 TSKgel G2000SW_{XL}。

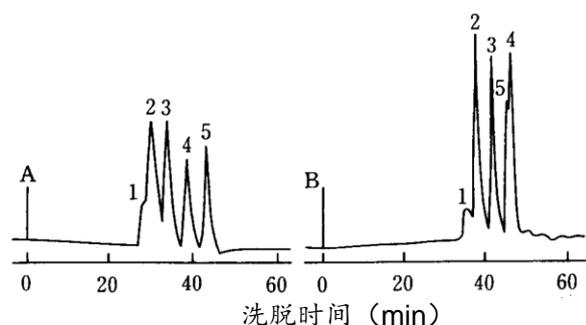


图 2 多肽混合物的分离 (1)

色谱柱: A. TSKgel G2500PW_{XL} 7.8mmID×30cm
B. TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

洗脱条件: 同图 1 (流速为 0.7mL/min)

样品: 1. 抑肽酶 2. 大胃泌素
3. 后叶催产素 4. 胃泌素
5. 亮氨酸-脑啡肽 (各约 2.5ug/40uL)

如上所述，在整体上，TSKgel G2000SW_{XL} 具有更高的分离效果，但对于分子量低于 1,000 的多肽样品，TSKgel G2500PW_{XL} 的分离效果会更佳。另外，由于 TSKgel SW 型硅胶填充剂不具有耐碱性，如样品需要在碱性条件下进行分离、或使用 NaOH 溶液进行色谱柱清洗时，请考虑使用 TSKgel PW 型色谱柱。

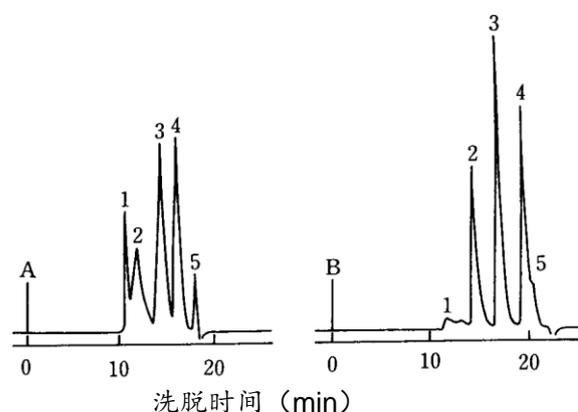


图 3 多肽混合物的分离 (2)

色谱柱: A. TSKgel G2500PW_{XL} 7.8mmID×30cm
B. TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

洗脱条件: 同图 1 (流速为 0.5mL/min)

样品: 1、肌球蛋白, 2、胰高血糖素, 3、LH-RH,
4、TRH, 5、甘氨酸

2) 蛋白消化物的分离

图 4 所示为分离基因重组 ProteinA 的 TRCK-胰蛋白酶消化物的实例。样品中含有与蛋白质消化物分子量不同的各类多肽。如 2-1) 所示, 由于 TSKgel G2000SW_{XL} 色谱柱的分离范围较宽, 其分离效果也更好。(该样品通过 RPC 分析的结果, 可观察到约有 60 种多肽峰在 RPC 下被检测到。可参考分离报告 No.69)。

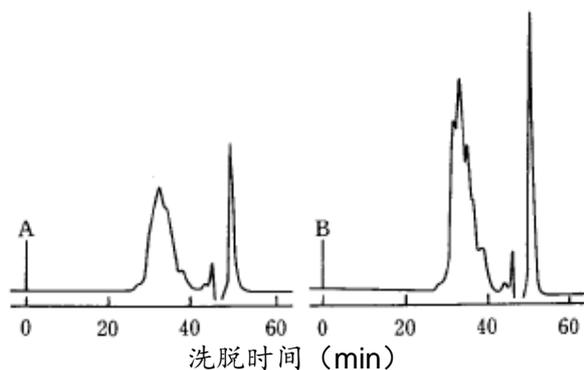


图 4 蛋白质消化物的分离

色谱柱: A. TSKgel G2500PW_{XL} 7.8mmID×30cm
B. TSKgel G2000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

洗脱条件: 同图 1 (流速为 0.2mL/min)

检测: UV (215nm)

A: 0.64ABS/FS B: 0.32ABS/FS

样品: 重组蛋白 A-TRCK 胰蛋白酶消化物
(20ug/20ul)

3、总结

表 3 所示为采用尺寸排阻色谱法进行多肽分离时, TSKgel 色谱柱产品的不同性能。一般考虑采用 TSKgel G2000SW_{XL} 较为适合, 但考虑到填充剂的耐碱性与多肽的分子量大小等因素, 也可根据情况而选择使用 TSKgel G2500PW_{XL} 或 TSKgel G3000PW_{XL}。

表 3. TSKgel 色谱柱在分离多肽中的 (尺寸排阻色谱法) 性能对比

TSKgel	多肽、蛋白质的分子量区间范围	特征
TSKgel G2000SW _{XL}	100 – 100,000*	首选色谱柱 分离范围大 分离效果好
TSKgel G2500PW _{XL}	100 – 5,000	用于低分子量的多肽样品 具有耐碱性
TSKgel G3000PW _{XL}	1,000 – 50,000	用于高分子量的多肽样品 具有耐碱性

*预估值

参考文献

- 1 Analysis of middle molecular peptides in normal and uremic body fluids by high-performance gel chromatography, H.Mabuchi and H. Nakahashi, J. Chromatogr., 224(1981)322
- 2 Estimation of molecular weights of peptides by determination of height equivalent to a theoretical plate in size-exclusion chromatography, Y.Shioya, H.Yoshida and T.Nakajima, J.Chromatogr., 240(1982)341
- 3 High-performance gel-permeation chromatography of polypeptides in a volatile solvent : Rapid resolution and molecular weight estimations of proteins and peptides on a column of TSK-G3000-PW, G.D. Swergold and C.S.Rubin, Anal. Biochem., 131(1983) 295
- 4 Molecular weight determination of peptides by high-performance gel permeation chromatography, W. O.Richter, B.Jacob and P.Schwandt, Anal. Biochem., 133(1983)288
- 5 Desalting of peptides by high-performance gel permeation chromatography, W.O.Richter and P. Schwandt, J.Chromatogr.,288(1984)212
- 6 Radioimmunoassay for α -human and rat atrial natriuretic polypeptide K.Nakao, A.Sugawara, N. Morii, M.Sadamoto, M.Suda, J.Soneda, T.Ban, M. Kihara, U.Yamori, M.shimokura, Y.Kiso and H. Imura Biochem. Biophys. Res. Comm. 124(1984)815
- 7 General method for the separation of cyanogen bromide digests of proteins by high-performance liquid chromatography ; Rabbit skeletal troponin I, C.T.Mant and R.S.Hodges, J.Chromatogr., 326(1985) 349
- 8 Amino-acid sequence of β -tubulin from Physarum polycephalum myxamoebae, M.S.-Wowra, L. Clayton, P.Dawson, K.Gull and M.Little, Eur. J. Biochem., 161(1986)669
- 9 High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive, M.A.Vijayakshmi, L.Lemieux and J. Amiot, J.Liquid Chromatogr.,9(1986)3559
- 10 High-performance gel permeation chromatography of proteins and peptides on columns of TSK-G-2000-SW and TSK-G3000-SW : A volatile solvent giving separation based on charge and size of polypeptides, G.B.Irvine and C.Shaw, Anal. Biochem., 155(1986)141
- 11 Fibrinogens Kawaguchi and Osaka : An amino acid substitution of A α arginine-16 to cysteine which forms an extra interchain disulfide bridge between the two A α chains, T.Miyata, S.Terukina, M.Matsuda, A.Kasamatsu, Y.Takeda, T.Murakami and S. Iwanaga, J.Biochem., 102(1987)93
- 12 Construction of a model for the aggregation and cross-linking region(7S domain) of type IV collagen based upon an evaluation of the primary structure of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains in this region, B.Siebold, R. Qian, R.W.Glanville, H.Hofmann, R.Deutzmann and K.Kuhn, Eur. J.Biochem., 168(1987)569
- 13 Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides : Requirement for peptide standards to monitor column performance and nonideal behaviour, C.T.Mant, J.M.R.Parker and R.S. Hodges, J.Chromatogr., 397(1987)99

- 14 The combined use of size-exclusion and reversed-phase high-performance liquid chromatography for characterization of β -endorphin processing pathways, A.I. Smith, C.A. Wallace, M.C. Cheng and D.J. Autelitano, *J. Chromatogr.*, 416(1987)255
- 15 Functional homology of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose - 2,6 - bisphosphatase, phosphoglycerate mutase, and 2,3-bisphosphoglycerate mutase, A. Tauler, M.R. El-Maghrabi and S.J. Pilkis, *J. Biol. Chem.*, 262(1987)16808
- 16 Isolation and analysis of peptidic fragments of α -gliadin using reversed phase high-performance liquid chromatography, P. Kocna, P. Fric, M.K. Holaková, J. Slaby, E. Kasafirek and W. Th. J. M. Hekkens, *J. Chromatogr.*, 434(1988)429
- 17 Analytical strategy for determination of active site sequences in aminoacyl-tRNA synthetases, C. Beauvallet, C. Hountoundji and J.-M. Cshmitter, *J. Chromatogr.*, 438(1988)347
- 18 Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity, J.-M. Schroder, U. Mrowietz and E. Christophers, *J. Immunol.*, 140(1988)3534
- 19 Amino acids of the *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor α subunit labelled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site M. Dennis, J. Giraudat, F.K. Hibert, M. Goeldner, C. Hirth, J.Y. Chang, C. Lazure, M. Chretien and J.-P. Changeux, *Biochemistry*, 27(1988)2346
- 20 Immunogenicity and Allergenicity of whey protein hydrolysates, J. Asselin, J. Amiot, S.F. Gauthier, W. Mourad and J. Hebert, *J. Food Sci.*, 53(1988)1208
- 21 Optimization of peptide separations in high-performance liquid chromatography, C.T. Mant and R.S. Hodges, *J. Liquid Chromatogr.*, 12(1989)139
- 22 Identification of peptides from a peptic haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale, by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, J.M. Piot, D. Guillochon, Q. Zhfao, G. Ricart, B. Fournet and D. Thomas, *J. Chromatogr.*, 481(1989)221
- 23 Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family, C.G. Wilde, J.E. Griffith, M.N. Marra, J.L. Snable and R.W. Scott, *J. Biol. Chem.*, 264(1989)11200
- 24 Cross-linking studies of the cholesterol hydroxylation system from bovine adrenocortical mitochondria, I.V. Turko, T.B. Adamovich, N.M. Kirillova, S. A. Usanov and V.L. Chashchin, *Biochim. Biophys. Acta*, 996(1989)37



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区宜山路 1289 号 B 座 3F, 301 室
电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858
电子邮件：info@tosoh.com.cn
网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com