

慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第七十七期

TSKgel色谱柱

在尺寸排阻色谱法分离多肽中的应用

Separation and Purification



2015-12

TSKgel 色谱柱在尺寸排阻色谱法分离多肽中的应用

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。

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%甲基溶纤剂+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

各作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 G2000SWXL 以及 TSKgel G2500PWXL）在多肽分离的应用上进行探讨。

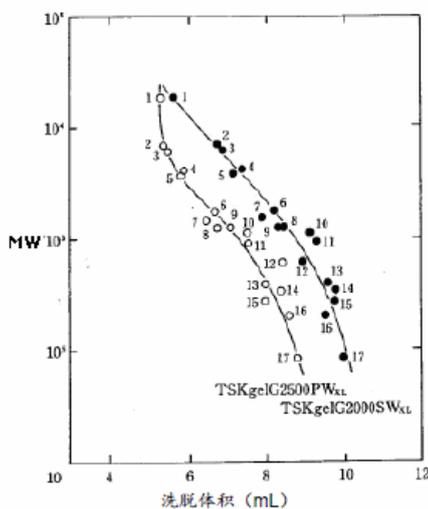
TSKgel 色谱柱在尺寸排阻色谱法分离多肽中的应用

实例应用——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 G2000SWXL 的样品洗脱速度均慢于 TSKgel G2500PWXL。同时，在 TSKgel G2000SWXL 中，肌球蛋白（MW17800）进入填充剂的小孔内部，但在 TSKgel G2500PWXL 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 G2500PWXL 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 G2000SWXL，可适用于从低分子量到高分子量区域更广的范围。

另一方面，如样品分子量低于 3000，TSKgel G2500PWXL 显示的标准曲线与 TSKgel G2000SWXL 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。

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. 胰岛素(5,807) 4. 大胃泌素(3,849)
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)

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	8.5	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	7.3
Big gastrin	3,849	5.9	7.4
Insulin	5,807	5.5	6.9
Aprotinin	6,500	5.4	6.7
Myoglobin	17,800	(5.35)*	5.6

洗脱液: 0.1% TFA+45% 乙腈

流速: 1.0mL/min

*完全排阻

图 2、3 所示为 TSKgel G2500PWXL 与 TSKgel G2000SWXL 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 G2000SWXL 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 G2500PWXL 时的分离效果要高于 TSKgel G2000SWXL。例如图 2 中所示的后叶催产素 (MW1007) 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 G2000SWXL。

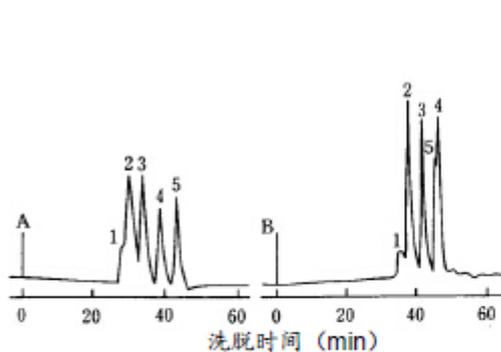


图 2 多肽混合物的分离 (1)

色谱柱: A, TSKgel G2500PWXL 7.8mmID×30cm
B, TSKgel G2000SWXL 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)

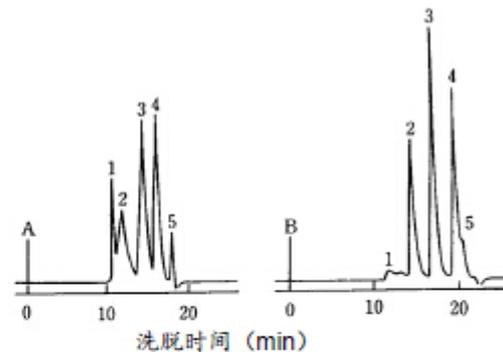


图 3 多肽混合物的分离 (2)

色谱柱: A, TSKgel G2500PWXL 7.8mmID×30cm
B, TSKgel G2000SWXL 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

如上所述，在整体上，TSKgel G2000SWXL 具有更高的分离效果，但对于分子量低于 1000 的多肽样品，TSKgel G2500PWXL 的分离效果会更好。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。

TSKgel 色谱柱在尺寸排阻色谱法分离多肽中的应用

实例应用——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。如上所示，由于 TSKgel G2000SWXL 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)。

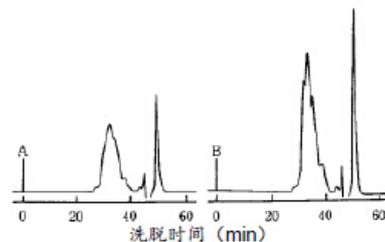


图 4 蛋白质消化物的分离

色谱柱: A, TSKgel G2500PWXL 7.8mmID×30cm
B, TSKgel G2000SWXL 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)

TSKgel 色谱柱在尺寸排阻色谱法分离多肽中的应用

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 G2000SWXL 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 G2500PWXL 或 TSKgel G3000PWXL。

TSKgel	多肽、蛋白质的分子量区间范围	特征
TSKgel G2000SWXL	100-100000*	首选色谱柱 分离范围大 分离效果好
TSKgel G2500PWXL	100-5000	用于低分子量的多肽样品 具有耐碱性
TSKgel G3000PWXL	1000-50000	用于高分子量的多肽样品 具有耐碱性

*预估值

北京慧德易公司作为日本东曹公司的一级代理，竭诚为您服务。如需订购东曹的产品或者需要进一步的资料，请联系我们。



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

服务热线：4008-111-326

公司官网：www.prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易