Хроматография пептидных компонентов образца бактериального лизата

Гаранян Г.С.

ГОУ ВПО "Пятигорская государственная фармацевтическая академия Федерального агенства по здравоохранению и социальному развитию"

Пептидный экстракт образца А получали путём предварительного растворения 1г лиофилизата и преципитации 70% сульфатом аммония. Осадок, полученный после центрифугирования, последовательно фильтровали, используя мембранные фильтры Amicon PM 1 и 10 (1000и 10000 MW, США) и концентрировали с помощью центрифугирования под вакуумом на установке Speed Vac Concentretor CS 18 (США).

Пептиды с молекулярной массой в пределах 1-10 кД сепарировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (по методике Gobberti с соавт., 2000) [1]., используя PepRPC HR5/5 колонку и соответствующее хроматографическое оборудование фирмы Pharmacia Biotech (Швеция).

500-µl аликвот при pH 4,6 - растворимой азотной фракции смешивали в соотношении 1:1 с 0,2% раствором трихлоруксусной кислоты и наносили на поверхность колонки. Элюирование проводили при скорости 0.5 мл/мин. При градиенте плотности (0 to 80%) ацетонитрила и в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты. Концентрация CH3CN повышалась линейно от 0 до 36% между 5-60 минутами и от 36 до 48 % между 60 -70 минутами, а также между 48 до 80% между 70-80 минутой.

Концентрация белка в пептидных фракциях определялась по методу Bradford [2].

Обнаружено, что наиболее значительная часть пептидов элюируется в градиенте плотности от 0 до 36% в первые 30-60 минут элюирования. В данной фракции обнаруживаются как минимум 20-22 пептидных пика из которых наиболее выраженные выделяются между 45-55 минутами элюирования при градиенте плотности от 30 до 40 % (7 пептидных компонентов). Дальнейшее повышение градиента плотности элюирующего раствора позволило выделить незначительное число пептидов (4-5 пептидных компонентов). Наиболее выраженный пептидный компонент элюировался при градиенте плотности 50%.

Библиографический список

1. Gobberti, M. Production of angeotensinI-I-converting-enzyme-inghibitory prptides in fermented milks stared by Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus SS1 and Lactococcus lactis subsp. Cremoris FT4. / M. Gobberti // Environ Microbiol.-2000.-Vol. 1. – P.3898-3904.

2. Bradford, M. A rapid and sensetiv metohod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the pricipl of protein-dye binding./M. Bradford// Anal. Chem.-1976. – Vol. 72.-P.248 -254.