

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ РФ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ХИМИИ И ПРИКЛАДНОЙ ЭКОЛОГИИ

В.В. Сова, М.И. Кусайкин

Выделение и очистка белков

Методическое пособие по курсу

«Химия и биохимия белков и ферментов»

Владивосток

2006

УДК 577.472(26)

ББК

Р

Сова В.В., Кусайкин М.И.

Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков

- Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. - 42 с.

Данное методическое пособие содержит краткое описание основных методов очистки белков.

Пособие предназначено для студентов, специализирующихся по органической химии, биотехнологии и медицинской химии.

Редакторы

Рецензент

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Оборудование, специальные материалы, реактивы	4
Выбор исходного материала	5
Разрушение клеток и экстракция	7
Диализ	10
Тепловая денатурация	11
Осаждение белков	12
Гельфильтрация	14
Разделение белков путем адсорбции	17
Выбор ионообменника	19
Элюция адсорбированного белка	21
Аффинная хроматография	21
Гидрофобная хроматография	22
Высокоэффективная жидкостная хроматография	23
Хроматография среднего давления	24
Электрофорез	24
Изоэлектрическое фокусирование	29
Капиллярный электрофорез	32
Двумерные системы электрофореза	33
Кристаллизация белков	34
Методы кристаллизации	35
Доказательства гомогенности белка	37
Тестовые задания	39
Литература	42

Введение

Исследования строения и функций белков предполагают наличие высокоочищенных препаратов. Получение же белка в гомогенном состоянии - достаточно сложная задача. Как правило, биологический материал, являющийся источником выделения, содержит большое число белков, их комплексов друг с другом и другими биополимерами. Близкие свойства компонентов этой смеси требуют при выделении индивидуальных белков использования разнообразных методов и различных их сочетаний. Трудности получения чистого белка связаны также с лабильностью белков и опасностью их денатурации, что сужает круг возможных методов выделения.

Данное методическое пособие содержит краткое описание основных приемов очистки белков и довольно простые объяснения теории происходящих при этом процессов. Предполагается, что студенты знакомы с основами биохимии, белковой химии и ферментативной кинетики. В большинстве случаев термины «фермент» и «белок» взаимозаменяемы. Все ферменты представляют собой белки, но не наоборот: не все белки обладают ферментативной активностью. Удобнее использовать термин «фермент», когда речь идет о конкретном белке, подвергаемом очистке, а термин «белок», когда речь идет о смеси белков. Пособие не является исчерпывающей сводкой всех методов очистки белков. С каждым годом появляются все новые методы белковой химии. Некоторые из них лишь кратко упоминаются, но если исследователь усвоил важнейшие приемы работы с белками, ему уже не так трудно овладеть и новыми методами.

Оборудование, специальные материалы, реактивы

Существует минимум основного оборудования для лаборатории, в которой проводится очистка ферментов. Спектрофотометр с УФ-лампой, с помощью которого определяют активность ферментов и концентрацию белка – прибор первой необходимости. При очистке ферментов нельзя избежать центрифугирования, поэтому нужна стандартная центрифуга с охлаждением и со скоростью около 15 000 об/мин.



Спектрофотометр

Электронная
пипетка

Центрифуга с охлаждением

Рис. 1. Некоторые приборы, используемые в лаборатории по очистке белков

Необходимы в работе такие приборы, как гомогенизатор, весы, рН-метр, автоматические пипетки, прибор для электрофореза, установка для ультрафильтрации. Обязательно следует приобрести набор приспособлений для колоночной хроматографии: колонки разных размеров, коллектор фракций с УФ-детектором, перистальтический насос, магнитную мешалку (для создания градиента).

При очистке белка применяется целый ряд специальных реактивов. В основном это сорбенты для колоночной хроматографии, реагенты для буфера, сульфат аммония, ЭДТА, додецилсульфат натрия, акриламид, метиленбисакриламид, реактив Фолина и другие.

Выбор исходного материала

Выбор исходного материала зависит от того, какая ставится цель. Если необходимо, например, изучить фермент определенного типа, безотносительно источника, выбирают тот, который содержит большие количества фермента, а сам источник доступен. При выборе организмов того или иного вида обращают внимание на легкость его выращивания. Из животных часто используют крыс, кроликов. Если источником является определенный орган, то берут его не у мелких лабораторных животных, а у крупных: быков, свиней. Однако в том случае, когда проводятся плановые исследования специфического белка из конкретного источника, его приходится использовать независимо от содержания нужного вещества.

Например, в лаборатории химии ферментов ТИБОХ вначале была изучена распространенность ламинариназы – пищеварительного фермента, расщепляющего полисахарид ламинаран, среди морских беспозвоночных. Это исследование представляло интерес для биологов, так как показало зависимость уровня активности фермента от систематического положения животного, способа питания, образа жизни. Химикам полученные данные позволили выбрать в качестве источника для выделения индивидуальных ламинариназ кристаллические стебельки промысловых видов моллюсков. Кристаллические стебельки являются уникальными концентраторами пищеварительных ферментов. Удачный выбор объекта исследования лежал в основе успехов в выделении гомогенных ферментов, установлении их аминокислотной последовательности и механизма действия.

При работе с растениями необходимо учитывать некоторые сложности: вариабильность материала, выращенного в открытом грунте, малое содержание белка в экстрактах растений. Цитоплазма, которая содержит большую часть ферментов, часто может составлять не более 1-2% всего объема растительной клетки. Следовательно, концентрация белка в экстракте будет низкой, даже если для его приготовления добавляют минимальное количество жидкости.

В случае микроорганизмов существуют проблемы выращивания микробной массы в определенных условиях и в больших количествах. Для каждой группы микроорганизмов (грибы, дрожжи, бактерии) необходимы свои особые условия выращивания, сбора клеток и экстрагирования.

Многие ферменты микроорганизмов *индуцибельны*. Культивируя бактерии в среде, богатой белками или углеводами, можно вызвать увеличение образования протеолитических ферментов или, соответственно, гликозилаз. Так при выращивании морского микроорганизма *Pseudoalteromonas* sp. в среде, содержащей в качестве источника углерода ламинаран вместо традиционной глюкозы, он начинал продуцировать высоко активную ламинариназу, которая ранее не обнаруживалась. Кроме того, уровень биосинтеза белков изменяется в процессе жизненного цикла микроорганизма, поэтому необходим предварительный анализ динамики роста и

правильный выбор продолжительности выращивания биомассы. Чаще всего оптимальным периодом сбора клеточной массы является конец логарифмической фазы перед замедлением роста клеток.

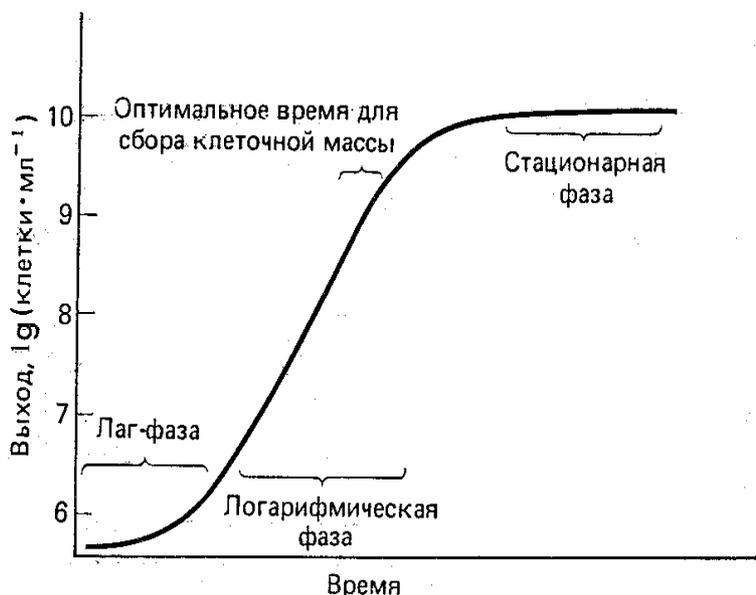


Рис. 1. Рост микроорганизмов

Хранение материала

Как полученный материал, так и экстракт из него, следует хранить замороженными. При низких температурах, прежде всего, замерзает свободная вода, и кристаллы льда разрушают мембраны и органеллы, но не повреждают белки. Интересно, что при -15° (в бытовых холодильниках) некоторые соли буфера выпадают в осадок, изменяется pH раствора, а в оставшемся незамерзшем концентрированном растворе могут, хотя и медленно, работать протеазы (ферменты, гидролизующие белки). Поэтому температуру хранения необходимо снижать до -25° и ниже – до -80° .

Разрушение клеток и экстракция

Большая часть белков и ферментов, изученных в ранний период развития белковой химии, были внеклеточными. Причина этого в том, что такие белки сравнительно легко выделялись, внеклеточные белки более стабильны (часто имеют в своей структуре

дисульфидные мостики), обладают небольшой молекулярной массой. Именно для этих белков первыми были установлены структуры: для лизоцима, рибонуклеазы, химотрипсина.

Однако большинство белков локализовано внутри клеток. Как показала практика, они менее стабильны, часто не содержат дисульфидных связей.

После того, как выбран источник выделения белка, следующим шагом является экстракция его из ткани. Вначале необходимо разрушить клетки и органеллы, что достигается измельчением в гомогенизаторе с последующей экстракцией буфером.

Животные ткани различаются по своей прочности: легко разрушаются эритроциты, а в кровеносных сосудах, напротив, содержится жесткий коллагеносодержащий материал. Успешным является замораживание ткани в жидком азоте и измельчение ее в замороженном состоянии. Ряд белков можно извлечь из тканей после обработки их ацетоном или другими органическими растворителями. Растительные клетки труднее разрушаются, так как содержат целлюлозную оболочку. Некоторые бактерии легко разрушаются под действием осмотического шока, а более устойчивые с толстой клеточной стенкой требуют механического воздействия, например ультразвуком.

Таким образом, способы разрушения клеток можно разделить на следующие группы:

- 1. Мягкое воздействие*, которое включает лизис клеток с помощью осмотического шока, разрушение под действием ферментов (лизоцима и др.), химическую солубилизацию (например, экстракция дрожжей толуолом, при которой частично растворяется клеточная стенка), гомогенизацию вручную (клетки продавливают через зазор).
- 2. Воздействие средней силы*, при котором используют лопастной гомогенизатор или растирание с абразивом (песком, стеклянными шариками).
- 3. Сильное воздействие* с помощью пресса, ультразвука или шаровой мельницы.

Выбор раствора для экстракции зависит от особенностей белка. Для растворимого белка используют буферные растворы. Обычно объем раствора в 2-3 раза превышает объем ткани. После экстракции белка массу центрифугируют при 10.000-20.000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Смесь до центрифугирования называют *гомогенатом*. Жидкая фаза после осаждения нерастворимого материала (надосадочная жидкость или супернатант) носит название «*экстракт*».

Экстракция белков, связанных с мембраной представляет особую проблему. Иногда выделение таких комплексов удается провести с использованием детергентов, в состав которых входят липофильные (алифатические или ароматические) цепи, взаимодействующие с гидрофобными поверхностями белка и вытесняющие его из комплекса с нормальной мембраной. Из детергентов наиболее широко применяются дезоксихолат, додецилсульфат натрия (анионный детергент), тритон X-100 и др. Тритон – это торговое название целой серии в большинстве своем неионных детергентов на основе полиэтиленгликоля.

Если экстракция была проведена из микробных или растительных источников или из ядер животных клеток, раствор содержит большие количества нуклеиновых кислот. Для удаления этих полианионов, взаимодействующих с белками, доводят рН раствора до 5 или добавляют такие соединения как протаминсульфат или стрептомицин. Нуклеиновые кислоты могут быть удалены также обработкой РНК-азами и ДНК-азами с последующим удалением низкомолекулярных соединений. После центрифугирования на поверхности экстракта могут плавать частицы жира. Его можно удалить фильтрацией через стекловату или плотную ткань.

Сложности работы с растительными экстрактами состоят в том, что большинство растений содержат фенольные соединения, которые легко окисляются под действием эндогенных фенолоксидаз с образованием темных пигментов. Эти пигменты ковалентно соединяются с белками и инактивируют многие ферменты. Кроме того, они мешают определению количества белка в экстрактах, так как такие классические методы как метод Лоури основаны на реакциях с ароматическими аминокислотами. Известны два способа решения этой проблемы. Во-первых, добавление какого-либо тиолового

соединения, например β -меркаптоэтанола, сводящего до минимума действие фенолоксидаз. Во-вторых, добавление порошкообразного поливинилпирролидона, адсорбирующего фенольные соединения.

Если экстракт, содержащий значительную часть исследуемого белка, получен, из него удалены частицы и небелковый материал, можно приступить к очистке белка.

Методы очистки белков

Концентрирование

Вначале следует упомянуть некоторые приемы, часто используемые при работе с белковыми растворами. Например, концентрирование белковых растворов. Его можно проводить путем осаждения белка с последующим растворением осадка в меньшем объеме. Обычно при этом используют сульфат аммония или ацетон. Концентрация белка в исходном растворе должна быть не меньше 1 мг/мл. Можно использовать адсорбцию белков из очень разбавленных растворов на ионообменнике с последующей элюцией небольшим объемом солевого раствора. Для быстрого концентрирования небольших объемов белковых растворов можно использовать сухой гельфильтрующий носитель (например, сефадекс), полиэтиленгликоль или высокозамещенную КМ-целлюлозу как водоотнимающие средства. Образец помещают в диализный мешок, который погружают в порошок, поглощающий воду. Наиболее продуктивным методом концентрирования является *ультрафильтрация*. Метод основан на применении полупроницаемых мембран с определенными размерами пор, при этом вода и малые молекулы проходят через мембрану, а по другую сторону мембраны остается концентрированный раствор белка. Это достигается в специальных ячейках (объемом до 1 л) с перемешиванием раствора и с применением сжатого инертного газа. Этот же принцип лежит в основе ультрафильтрации на полых волокнах, используемых для концентрирования больших объемов растворов.

Диализ

Концентрирование и диализ тесно связаны между собой. При диализе низкомолекулярные вещества удаляются из образца и замещаются буфером.

Традиционным является способ диализа через целлофановую пленку. В продаже имеются диализные трубки различного диаметра, обычно они не пропускают молекулы крупнее 15 000-20 000 Да. Для более полного удаления низкомолекулярных веществ в процессе диализа необходима смена буферного раствора в диализате. Диализ является длительной процедурой, ставят его обычно на ночь. Удаление солей и замену буфера предпочтительней проводить более быстрым методом гельфильтрации. Для этих целей наиболее широко применяется сефадекс G-25. Объем образца не должен превышать 1/5 объема колонки, скорость элюции - не более 50 мл/ч на 1 см³ поперечного сечения. Удобно в лаборатории иметь ряд заранее подготовленных колонок для быстрого обессоливания.

Таблица 1

Параметры колонок с сефадексом G-25 для обессоливания белковых растворов

Размеры колонки*	Тип носителя	Объем колонки, см ³	Объем образца, см ³	Скорость потока, мл·ч ⁻¹	Время процесса, мин
1×8	Тонкий	8	1-1,5	40	7
6×10	Средний	60	2-10	200	15
8×30	Средний	240	10-30	250	30
8×60	Средний	480	30-80	250	45
16×90	Грубый	1440	80-300	500	90
50×100	Грубый	5000	300-1000	1500	90

* Площадь поперечного сечения × высота, см

Тепловая денатурация

На начальном этапе очистки для разделения белков иногда используют тепловую обработку. Она эффективна, если белок относительно устойчив в условиях нагревания, в то время как сопутствующие белки денатурируют. При этом варьируют рН раствора, продолжительность обработки и температуру. Для выбора оптимальных условий предварительно проводят серию небольших опытов.

После проведения первых этапов очистки белки далеки от гомогенного состояния. В полученной смеси белки отличаются друг от друга растворимостью, молекулярной массой, величиной суммарного заряда молекулы, относительной стабильностью и т.д. Эти различия и могут быть положены в основу методов дальнейшего разделения белков. Очистка белка – процесс многоступенчатый и на каждой ступени мы получаем фракцию более богатую выделяемым белком, чем на предыдущей стадии. Такой процесс часто называют *фракционированием*.

Осаждение белков

Разделение белков на основе их различной растворимости является классическим методом. Так фракционирование солями основывается на избирательном разделении белков вследствие их различной растворимости в растворах солей. Соль подбирается в соответствии со следующими требованиями: она должна обладать достаточной растворимостью, которая не меняется значительно в зависимости от температуры, при добавлении соли не должен заметно меняться рН раствора, она легко отделяется от белка и не оказывает денатурирующего действия. Наиболее часто употребляемой солью для фракционирования белков является сульфат аммония. Обычно проводят фракционное осаждение белков возрастающими концентрациями сульфата аммония. При описании методов выделения количество сульфата аммония выражают в процентах насыщения и часто употребляют выражения вроде "фракция, осажденная между 55 и 60% насыщения". Правильно рассчитать количество соли, которое нужно добавить к данному объему раствора, чтобы получить указанный процент насыщения, не простое дело. Поскольку при растворении соли меняется объем жидкости, количество соли, которое нужно добавить к данному объему жидкости, не пропорционально требуемому проценту насыщения. Обычно пользуются специальной номограммой, с помощью которой можно определить количество соли, необходимое для перехода от одной степени насыщения к другой, или расчетными таблицами.

Высаливание при добавлении необходимого количества сульфата аммония для осаждения всех белков является эффективным способом концентрирования - при

условии, что образец, который нужно сконцентрировать, не слишком разбавлен. Для получения раствора, приблизительно 85%-ного насыщения удобно растворить 60 г сульфата аммония в 100 мл. При такой концентрации немногие белки имеют растворимость выше 1 мг/мл. Но если исходная концентрация белка в растворе ниже 1 мг/мл, то перед высаливанием следует повысить ее, например, с помощью ультрафильтрации.

Осаждение белков органическими растворителями

Это один из старых методов. Он играет важную роль при очистке белков в промышленных масштабах. Чаще всего используют такие растворители как этанол и ацетон, реже – изопропанол, метанол, диоксан. Основной механизм процесса: по мере возрастания концентрации органического растворителя снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул фермента. Происходит снижение растворимости белков до уровня, при котором начинается агрегация и осаждение.

Важным параметром, влияющим на осаждение, является размер молекулы белка. Чем больше молекула, тем ниже концентрация органического растворителя, вызывающая осаждение белка.

Используемый растворитель должен полностью смешиваться с водой, не реагировать с белками и обладать хорошим осаждающим действием. Одно из преимуществ фракционирования с помощью органических растворителей заключается в том, что его можно проводить при температуре ниже нуля, так как все смешивающиеся с водой растворители образуют смеси, замерзающие при температуре значительно ниже 0°C. Это очень важное свойство, так как в ходе фракционирования необходимо поддерживать низкую температуру. Наиболее часто для осаждения белков используется ацетон. Он обладает меньшим денатурирующим действием, чем этанол, отчасти потому, что при минусовой температуре требуются несколько более низкие его концентрации, чтобы получить такое же осаждение, как и при использовании этанола. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении.

Методика осаждения состоит в следующем: образец обычно охлаждают до 0° С в ледяной бане со льдом. Концентрация белка может быть 5-30 мг/мл, а концентрация соли не должна быть высокой. Высокая концентрация соли снижает электростатическую агрегацию, и требуются более высокие концентрации растворителя, что увеличивает вероятность денатурации. При низкой концентрации соли может образоваться тонкая взвесь, которую трудно осадить. Оптимальная концентрация соли – 0,05-0,2 М. Растворитель добавляют медленно, чтобы избежать разогрева. Большинство белков осаждается при добавлении 20-50% растворителя (по объему). Следует отметить, что «процентное содержание» не совсем точный термин. Если к 50 мл ацетона добавить 50 мл воды, то общий объем жидкости составит только 95 мл. После уравнивания смеси в течение 10-15 минут осадок отделяют центрифугированием. Затем осадок растворяют в холодном буфере. Обычно объем буфера в 2 раза превышает объем осадка. Небольшие количества органического растворителя (около 10% по объему) не мешают дальнейшему фракционированию.

Если температура при фракционировании органическими растворителями высока, происходит денатурация белка. Однако некоторые ферменты обладают высокой стабильностью, и денатурация носит избирательный характер.

Гельфльтрация

С помощью метода гельфльтрации можно быстро разделить макромолекулы в соответствии с их размерами. Носителем для хроматографии является гель, который состоит из поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) для удобства наполнения колонок. Так *сефадексы* - это поперечно-сшитые декстраны (α -1 \rightarrow 6-глюканы микробиального происхождения) с заданными размерами пор. Сшиты цепи декстрана трехуглеродными мостиками с помощью эпихлоргидрина.

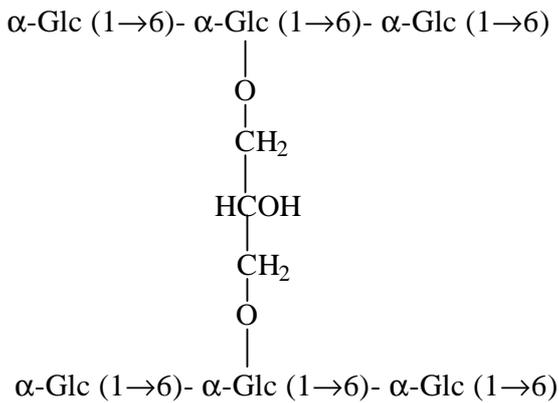


Рис. 2. Структура сефадексов

Чем больше поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий. Полученный таким образом гель играет роль молекулярного сита. При пропускании раствора смеси веществ через колонку, наполненную набухшими гранулами сефадекса, крупные частицы, размер которых превышает размер пор сефадекса, будут двигаться быстро. Мелкие молекулы, например, соли, будут двигаться медленно, поскольку в процессе движения они проникают внутрь гранул. Колонка, наполненная сефадексом, характеризуется общим объемом V_0 , который складывается из внутреннего объема V_B , находящегося внутри гранул, объема наружного V_H , занимающего пространство между гранулами, и объема V_M , отражающего массу геля:

$$V_0 = V_B + V_H + V_M$$

Распределение вещества между внутренним и внешним объемами характеризуется коэффициентом распределения K_r , равным

$$K_r = \frac{V_{\text{э}} - V_H}{V_B}$$

Если вещество не проникает внутрь глобул, объем элюции равен наружному объему и $K_r=0$. Если же вещество равномерно распределено внутри гранул и между ними, объем элюции равен сумме внутреннего и наружного объемов и $K_r=1$.

Существуют различные марки сефадексов, отличающиеся размером пор, обозначаемые как G-10, 15, 25, 50, 75 и т.д. Чем меньше номер, тем больше число поперечных сшивок

содержит молекула, тем меньше воды поглощает гранула при набухании. С ростом номера марки сефадекса растут поры гранул и увеличиваются границы молекулярной массы веществ, способных проникать внутрь гранул, а, следовательно, и способных к разделению. Каждая марка сефадекса выпускается с различной величиной частиц: сверхтонкий, тонкий, средний и грубый. Как правило, в аналитической работе используются сверхтонкий и тонкий, а в препаративной - средний и грубый.

Кроме сефадексов для гельфильтрации белков используют сополимеры акриламида с бисакриламидом, получившие название *биогелей* (P-2, P-4, P-6 и т.д.), и сефарозу – поперечно-сшитую агарозу (агароза - это нейтральный компонент агара). Все они делят белки по размеру молекул, как и сефадексы.

Основная проблема, связанная с использованием сефадекса и полиакриламида, заключается в мягкости их гранул. Даже очень слабое давление, возникающее в колонке во время хроматографии, вызывает деформацию гранул. Этим недостатком лишены *сефакрилы* – декстраны, содержащие дополнительные поперечные сшивки, образованные бисакриламидом. Эта новая продукция фирмы Amersham Bioscience вытесняет даже наиболее жесткие поперечно-сшитые агарозы, такие как CL-сефарозы.

Как правильно заполнять колонку гелем, наносить образец, определять свободный объем колонки студенты учатся на практикуме по биоорганической химии. Наиболее важные рекомендации: размеры колонки должны в 30-100 раз превышать объем наносимого образца, концентрация белка в образце - составлять 10-20 мг/мл, длина колонки - в 20-40 раз превышать ее диаметр.

Таблица 2

Области применения выпускаемых гелей

Фирменное название геля, производитель	Тип геля	Область разделения по относительной молекулярной массе (для глобулярных белков)
Сефадексы G-10*	Декстран	-700
<i>Amersham Bioscience</i> G-15	«	-1 500
G-25	«	1 000-5 000
G-50	«	1 500-30 000

Фирменное название геля, производитель	Тип геля	Область разделения по относительной молекулярной массе (для глобулярных белков)
G-75	«	3 000-70 000
G-100	«	4 000-150 000
G-150	«	5 000-400 000
G-200	«	5 000-800 000
Био-гели P-2	Полиакриламид	200-2 6000
<i>Bio-Rad</i> P-4	«	500-4 000
P-6	«	1 000-5 000
P-10	«	5 000-17 000
P-30	«	20 000-50 000
P-60	«	30 000-70 000
P-100	«	40 000-100 000
P-150	«	50 000-150 000
P-200	«	80 000- 300 000
P-300	«	100 000-400 000
Сефарозы 6B	Агароза	$-2 \cdot 10^6$
<i>Amersham Bioscience</i> 4B	«	300 000- $20 \cdot 10^6$
2B	«	$2 \cdot 10^6$ - $25 \cdot 10^6$
CL-6B	Поперечно-	10 000- $4 \cdot 10^6$
CL-4B	сшитая	60 000- $20 \cdot 10^6$
CL-2B	агароза	70 000- $40 \cdot 10^6$
Сефакрилы S-300	Декстран/ бис-	10 000-800 000
<i>Amersham Bioscience</i> S-400	акриламид	20 000- $2 \cdot 10^6$
S-500		$> 10^6$

* Гели сефадекса не рекомендуется использовать на нижнем пределе указанного диапазона

Разделение белков путем адсорбции

Белки обычно избирательно адсорбируются на твердых фазах самых различных типов. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография, широко

используются для разделения белков. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень очистки белков. Важнейшими адсорбентами белков являются *ионообменники*, фосфат кальция (гидроксилапатит) и разнообразные *аффинные сорбенты*.

а) ионообменники

В отличие от низкомолекулярных веществ, белки предъявляют к сорбентам особые требования. Главное из них – это “рыхлость” структуры сорбента, чтобы белок мог проникнуть внутрь частиц и достичь центров связывания. Кроме того, материал сорбента не должен взаимодействовать с белком. Этим требованиям не отвечают полистирольные смолы, и для разделения белков используют ионообменники на основе целлюлозы, декстранов и агароз.

Белки связываются ионообменником с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и кластерами заряженных групп на ионообменнике. Степень модификации КМ или ДЭАЭ-целлюлозы высока – до 0,5 ммоль/см³. Заряды, конечно, нейтрализованы противоионами, такими как ионы металлов, хлорид - ионы и ионы буфера. Белок должен вытеснить противоионы, отсюда происходит термин “ионный обмен”.

Количество белка, которое может связать ионообменник в расчете на единицу объема, может быть очень большим. У ионообменников на основе целлюлозы это количество зависит в основном от размеров белковых молекул, – чем мельче молекулы белка, тем в большей степени он адсорбируется. Молекулы белков с молекулярной массой более 10⁶ не задерживаются большинством целлюлозных ионообменников.

Наиболее известные ионообменники:

а) На основе целлюлозы

Катионообменник КМ-целлюлоза (карбоксиметилцеллюлоза)

Заряженная группа $\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$

Анионообменник ДЭАЭ-целлюлоза (диэтиламиноэтилцеллюлоза)

+

Заряженная группа $\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$

Катионообменник Фосфоцеллюлоза
Заряженная группа $-O-PO_3^-$

Анионообменник ТЭАЭ-целлюлоза (триэтиламиноэтилцеллюлоза)
+
Заряженная группа $O-C_2H_4N(C_2H_5)_3$

б) На основе декстранов
Катионообменник КМ-сефадекс (карбоксиметилсефадекс)

Заряженная группа $O-CH_2-COO^-$

Катионообменник СП-сефадекс (сульфопропилсефадекс)

Заряженная группа $O-(CH_2)_3-SO_3^-$

в) На основе сефарозы (предназначены для разделения крупных молекул)

Катионообменник КМ-сефароза (карбоксиметилсефароза)

Заряженная группа $O-CH_2-COO^-$

Анионообменник ДЭАЭ-сефароза (диэтиламиноэтилсефароза)

+
Заряженная группа $O-C_2H_4NH(C_2H_5)_2$

Ионообменники на основе сефадекса и сефарозы комбинируют ионный обмен с эффектом молекулярного сита.

Выбор ионообменника

Можно привести примеры выбора ионообменника для очистки белка с известной изоэлектрической точкой. Предполагается, что белок стабилен при pH 5,5-8,5.

Таблица 3

Выбор ионообменника для белков с известной изоэлектрической точкой

Изоэлектрическая точка	Ионный обмен	pH буфера
8,5	Катион	<7,0
7,0	Катион	<6,0
6,0	Анион	>8,0
5,5	Анион	>6,5

Имеется в виду, что при значениях рН буфера ниже изоэлектрической, белок имеет положительный заряд и адсорбируется на катионообменнике и наоборот.

На практике условия адсорбции выбирают эмпирически, так как чаще всего изоэлектрическая точка белка неизвестна. Хотя изоэлектрическую точку фермента можно определить методом изоэлектрического фокусирования в сочетании со специфическим окрашиванием на ферментативную активность, но иногда проще провести эксперимент с применением ионообменников.

Для испытания адсорбционной способности ДЭАЭ-целлюлозы обычно используют 20 мМ трис-буфер рН 8,0. Для этого достаточно небольшой колонки объемом около 2 мл. Если фермент не адсорбировался на ДЭАЭ-целлюлозе, то: а) возможно все-таки произошла его очистка, так как могли адсорбироваться балластные белки, б) фермент, вероятно, будет сорбироваться на катионообменнике (КМ-целлюлозе).

Снимают белки 10 М NaCl, при такой ионной силе элюируются практически все белки. Затем проводят проверку, чтобы убедиться, что фермент сошел с колонки. Следующим этапом работы является подбор условий элюции для разделения белков.

Следует обратить внимание на некоторые особенности работы с ионообменниками. Образец необходимо наносить в том же буфере, который используют для уравнивания колонки. Для перевода в нужный буфер используют диализ или гель-фильтрацию. Например, 1 мл препарата пропускают через колонку с сефадексом G-25 объемом 10 мл, уравновешенную нужным буфером, за 10 мин. Концентрация белка в образце может достигать 30 мг/мл. В ионообменной хроматографии применяют короткие и толстые колонки, длина которых в 4-5 раз превышает их диаметр. Никогда не следует наносить образец, в котором есть осадок, его надо сначала отделить центрифугированием. Осадок может привести к закупорке колонки.

Кроме колоночной хроматографии не следует забывать о методах адсорбции “в объеме”, когда белки смешиваются с носителем, например, в стакане, а элюцию (обычно ступенчатым градиентом) проводят на стеклянном фильтре. Это очень быстрый и потому полезный метод в тех случаях, когда время имеет первостепенное значение.

Элюция адсорбированного белка

Теоретически существуют два способа элюции белков. 1) Изменение рН буфера до величины, при которой связывание белка с адсорбентом ослабевает; для анионообменников используют более низкие значения рН, а для катионообменников – более высокие. 2) Повышение ионной силы, что вызывает ослабление электростатического взаимодействия между белком и адсорбентом. На практике метод 1 не всегда дает хорошие результаты из-за буферных свойств самих белков, а в некоторых случаях и адсорбента. Более распространенные способы элюции – солевые градиенты (ступенчатые и линейные). Обычно используют хлориды калия или натрия, линейный градиент создают при помощи простого смесителя, работающего на принципе сообщающихся сосудов. При повышении концентрации соли белки начинают двигаться вниз, но перемещаются с меньшей скоростью, чем соль, поэтому каждая часть белковой зоны испытывает действие повышенной концентрации соли. Это приводит к тому, что зоны сужаются.

Аффинная хроматография

Под *аффинной* хроматографией понимают использование иммобилизованного на адсорбенте лиганда, осуществляющего специфический отбор белков, которые связываются с этим лигандом. После адсорбции фермент может быть элюирован либо неспецифическим образом, например, повышением концентрации соли, либо специфическим в результате замещения белка лигандом из раствора. Следовательно, аффинная хроматография включает две специфические стадии – “*аффинную адсорбцию*” и “*аффинную элюцию*”. Хотя и существуют некоторые готовые нерастворимые материалы, имитирующие субстрат или настоящие субстраты (крахмал для амилаз, хитин для хитиназ и т.д.), но чаще аффинные адсорбенты необходимо синтезировать. Лигандов может быть много (субстраты и квазисубстраты, ингибиторы и их аналоги), поэтому фирмы-производители пошли по пути изготовления носителя с реакционными группами, к которым затем присоединяют необходимый лиганд. Таким

носителем является, например, сефароза, обработанная бромцианом (бромциан вступает в реакцию с гидроксильной группой агарозной матрицы).



Активированная агароза быстро взаимодействует с первичными аминами. Например, белки присоединяются по аминогруппе ε-лизина.

Основные требования к аффинной адсорбции

1. Лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало серьезных затруднений.
2. Удлиняющий мостик между матрицей и лигандом должен облегчать доступ белка к лиганду.
3. Неспецифическое взаимодействие не должно быть слишком сильным, чтобы сопутствующие белки не могли связаться с адсорбентом.
4. Связь лиганда с матрицей должна быть стабильна в условиях хроматографии и в процессе регенерации адсорбента.

Следует заметить, что аффинная адсорбционная хроматография является исключительным методом, если вся процедура уже тщательно отработана, однако создание необходимых адсорбентов может быть очень трудоемким процессом.

Гидрофобная хроматография

В ходе создания носителей для аффинной хроматографии были проведены контрольные опыты, в которых изучалось поведение матриц, содержащих удлиняющие мостики, но без лиганда. Оказалось, что в некоторых случаях ферменты прочно связывались с гексаметиленовыми мостиками. Этот факт послужил основой для развития методов *гидрофобной хроматографии*, основанных на связывании белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белковой глобулы. Гидрофобные взаимодействия усиливаются с повышением концентрации соли. Максимальное усиление вызывают соли, проявляющие наибольшую активность при высаливании, такие как сульфат аммония. Это объясняется тем, что в основе обоих процессов лежат

одинаковые механизмы. При высаливании основной причиной агрегации является усиление гидрофобных взаимодействий между белками. Следовательно, при высоких концентрациях соли большинство белков будут адсорбироваться на гидрофобных группах, связанных с матрицей. Элюцию проводят понижающимся градиентом концентрации соли. Белки, которые прочно адсорбируются обычно удаляют с колонки, добавляя в элюирующий раствор этиленгликоль.

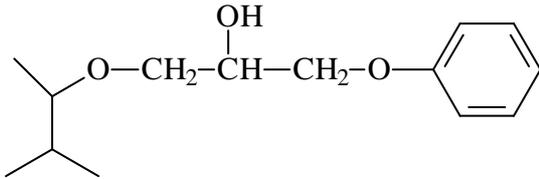


Рис.3. Структура фенилсульфата – наиболее доступного гидрофобного сорбента.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, HPLC)

Интерес к колоночной хроматографии с подвижной жидкой фазой резко возрос с появлением аппаратуры для жидкостной хроматографии при высоких давлениях. Отличительной особенностью этого метода является наличие в аппаратуре специальных насосов, позволяющих с достаточно большой скоростью продавливать жидкую фазу через колонку, имеющей диаметр частиц от 3 до 15 мкм, а также наличие чувствительных детекторов для обнаружения разделенных веществ.

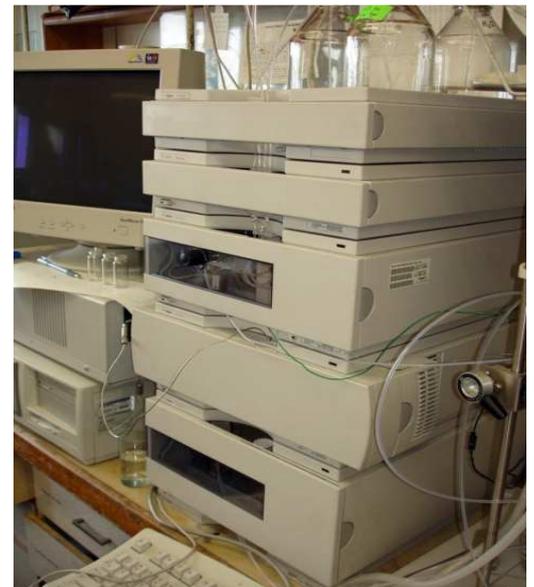


Рис. 4. Хроматограф ВЭЖХ (Agilent 1100)



Рис. 5. Хроматограф Acta FPLC

Хроматографы для ВЭЖХ (HPLC) включают несколько блоков: дегазатор (для удаления растворенного кислорода из растворителей), насос, термостат (где помещается колонка), детектор (УФ, рефрактометр, амперометрический, кондуктометрический и другие).

На хроматограф могут быть установлены различные колонки: ионообменные, гельфильтрационные, гидрофобные и т.д.

Хроматография среднего давления (Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC)

При разделении высоколабильных белков, иногда высокое давление нежелательно, поэтому применяют хроматографию при среднем давлении. Хроматографы FPLC (рис. 5) обеспечивают те же функции, что и HPLC.

Электрофорез

Разделять смеси белков посредством электрофореза начали еще в первые годы XX века, но долгое время он применялся исключительно в аналитических целях и только в последние годы – для препаративных. Электрофорез редко включают в схемы очистки. Во-первых, из-за дороговизны аппаратуры, во-вторых, электрофоретическое разделение зависит от разницы в величине зарядов разделяемых белков, как и в случае ионообменной хроматографии эффективного и не столь дорогого метода.

Физический принцип метода электрофореза заключается в следующем. Молекула белка в растворе при любом pH, отличающемся от её изоэлектрической точки, имеет некий средний заряд. Это приводит к тому, что белок движется в электрическом поле. Движущая сила определяется величиной напряженности электрического поля E умноженной на суммарный заряд частицы z . Этой силе противостоят силы вязкости среды, пропорциональные коэффициенту вязкости η , радиусу частицы r (стоксовскому радиусу) и скорости v .

$$E \cdot z = 6\pi\eta r v$$

Удельная подвижность $u=v/E$ может быть выражена как

$$u = z / 6\pi\eta r v.$$

Таким образом, молекулы приобретают разные скорости в зависимости от величины заряда и размеров, и в этом - сущность процесса электрофореза.

Для проведения электрофореза необходимы:

1) “канал”, в котором идет разделение: колонка (вертикальный электрофорез), плоская ванна, прямоугольный блок (горизонтальный электрофорез);

2) связь канала с электродами, которая осуществляется через резервуар с буфером; соединительный фитиль (обычно влажная бумага), который соединяет концы геля с буфером.

а) *Электрофорез в свободном растворе (зонный электрофорез) и с поддерживающей средой*

Первым вариантом электрофореза был электрофорез с подвижной границей (в свободном растворе) в специальном аппарате Тизелиуса. Этот вариант требовал десятки мг белка, позволял различать не более 8 компонентов даже при разделении очень сложных смесей, что обусловлено диффузией, приводящей к перекрыванию белковых зон. Он требовал много усилий и внимания.

Затем был разработан электрофорез на бумаге и других целлюлозных материалах. Уменьшилось количество белка, упростилось оборудование. Обычно электрофорез проводят при нейтральных или слабощелочных рН, когда большинство белков мигрирует к аноду.

Смитис впервые применил в качестве поддерживающей среды крахмальный гель, увеличив степень разрешения. Несколькими годами позже Орнстейн предложил синтетическую гелевую среду – поперечно-сшитый полиакриламид (ПААГ).

$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH}_2$ акриламид,

$(\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH})_2-\text{CH}_2$ NN'-метиленбисакриламид, который используют для «сшивки» линейных полимеров акриламида.

Применение этого материала позволило получать более контролируемые, чем у крахмального геля, размеры пор. Размеры пор варьируют концентрацией метиленбисакриламида. Обычно используют 7-15% ПААГ. Гель-электрофорез позволяет белки, имеющие близкие электрофоретические подвижности, разделять по их размерам.

Б) Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)

Ступенчатый электрофорез (Disc-Electrophoresis)

Этот вид электрофореза был предложен Орнстейном Дэвисом еще в самом начале становления метода электрофореза в полиакриламидном геле. Для проведения диск-электрофореза необходимо контролировать 4 параметра:

- структуру геля
- рН буфера геля
- ионную силу буфера
- природу ионов в геле и в электродном буфере

Сущность метода состоит в использовании двух гелей концентрирующего (с крупными порами), с рН буфера 6,8 и разделяющего (с более мелкими порами), с рН буфера 8,8

Использование такой системы позволяет концентрировать препарат белка до входа его в разделяющий гель, тем самым улучшается разрешение электрофореза.

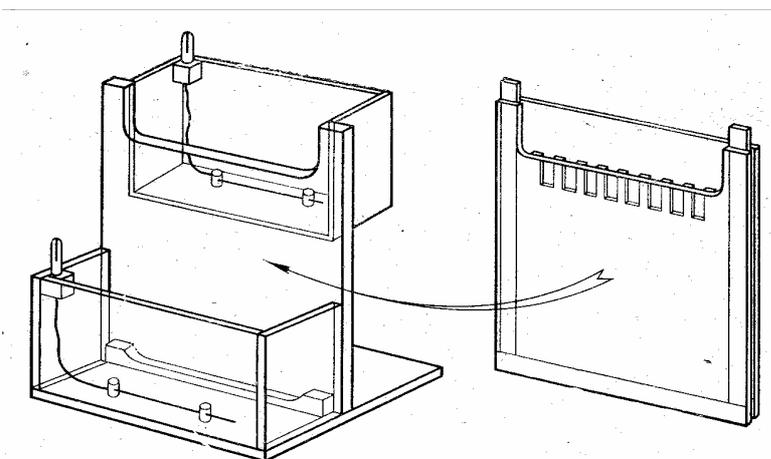


Рис.6. Прибор Стадиера для электрофореза в вертикальных пластинах

Электрофорез белков в простой системе удобно использовать для их разделения, но не для характеристики. Электрофоретическая подвижность каждого белка в простой системе зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации полипептидной цепи. Для установления строгой количественной корреляции между одним из этих параметров и электрофоретической подвижностью белка нужно исключить влияние всех остальных. Электрофорез в ПААГ в присутствии анионного детергента додецилсульфата

натрия (ДДС-Na) позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра – их молекулярной массы. Такая система была разработана Лэммли. Для этого белки обрабатывают трехкратным избытком ДДС-Na. За счет гидрофобных взаимодействий детергент примерно одинаково связывается с большинством белков в соотношении 1,4 мг ДДС-Na на 1 мг белка (1 моль ДДС-Na на 2 аминокислотных остатка). Каждая молекула ДДС-Na несет отрицательный заряд, и огромный избыток их превосходит собственный суммарный заряд белка. Денатурированный неразветвленный полипептид в этих условиях представляет собой стержень с сильным отрицательным зарядом. Белки, содержащие дисульфидные мостики предварительно обрабатывают β -меркаптоэтанолом, чтобы разрушить все S-S-связи. Соотношение размер/заряд в присутствии ДДС-Na становится практически одинаковым для любого белка, и деление происходит по молекулярной массе, так как поры геля работают как молекулярные сита.



Рис. 7. Прибор для одномерного электрофореза (источник питания и камера)

в) Электрофорез в градиентных гелях

В последнее время стали применять электрофорез в градиенте пористости ПААГ, т.е. в гелях с изменяющимися вдоль направления миграции белков размерами пор. Он сходен с электрофорезом в присутствии ДДС-На в том отношении, что разделение идет по размерам молекул, а не по заряду. Концентрация акриламида изменяется по длине пластинки от 30% в нижней части, до 3% в верхней части. Рабочий буфер имеет высокое значение рН, поэтому белки мигрируют к аноду до тех пор, пока из-за размеров пор геля он не сможет двигаться дальше. Размеры молекул в этом варианте метода – нативные, а не субъединичные, как в предыдущем. В ходе электрофореза зоны растворенного белка остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут заряд того же знака, что и молекулы белка, но не взаимодействуют с ним. Скорость миграции красителя несколько выше, поэтому, когда окрашенная зона доходит до конца геля, электрофорез прекращают. Разделившиеся зоны белков немедленно фиксируют в смеси уксусной кислоты с этанолом, чтобы избежать диффузии. После фиксации проводят окрашивание белковых полос. Красители обладают высокой чувствительностью, и окраска полос происходит пропорционально количеству белка в зоне. Используют такие красители как *кумасси синий* (G-250, R-250), *амидочерный*. Длительной является процедура отмывки геля водой для удаления излишка красителя. Иногда делят белки, заранее *меченные хромофором* (например, флуорескаминем, SYPRO), и обнаруживают их по флуоресценции в УФ-области спектра. Недавно предложен очень чувствительный способ окрашивания белков *нитратом серебра*. Серебро связывается с белками, затем следуют этапы восстановления и усиления окраски. Используют также и радиоактивную метку (радиоактивным углеродом или йодом).

Регистрацию полос в этом случае проводят методом автордиографии с помощью рентгеновской пленки. Это самый чувствительный метод регистрации белковых полос.

Специфическое окрашивание ферментов возможно, только когда электрофорез проводится в неденатурирующих условиях, при которых фермент сохраняет свою активность. Пластины гелей для таких целей разрезают, более удобны в этом случае -

толстые крахмальные гели. Иногда с геля делается бумажная реплика, которая затем окрашивается.

Для количественной оценки содержания белков после разделения используется

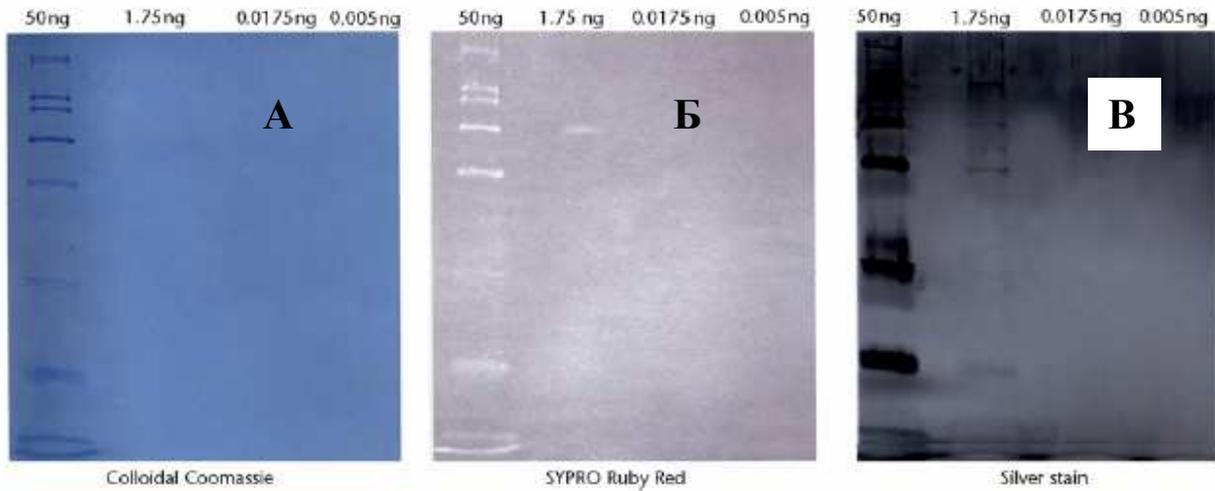


Рис. 8. Окраска белков после электрофореза различными красителями. А- Коллоидным Кумасси G-250, Б- SYPRO Ruby Red, В - серебром сканирование гелей лазерным сканером.

Изоэлектрическое фокусирование

Рассмотрим термины, используемые в этом методе.

Изоэлектрическая точка – это значение рН, при котором суммарный заряд вещества равен нулю.

Амфолиты (амфотерные электролиты) – это соединения, обладающие как кислотными, так и основными свойствами. В зависимости от рН среды их суммарный заряд приобретает положительное, отрицательное или нулевое значение. С помощью изоэлектрофокусирования можно фракционировать только вещества с амфотерными свойствами. Таковыми являются белки. Кроме амфолитов-образцов существуют амфолиты-носители, которые создают градиент рН.

Если обычный электрофорез основан на разделении белков по их подвижности при данном значении рН, то изоэлектрическое фокусирование заключается в том, что создается система с градиентом рН. Белки, движущиеся в электрическом поле, достигают в этой системе такой области, в которой значение рН равно их изоэлектрической точке.

При этом значении суммарный заряд белка равен 0, и он не способен перемещаться в электрическом поле.

Синтетические амфолиты - носители (иногда их называют амфолинами) представляют собой гетерогенную смесь различных полиаминополикарбоновых кислот довольно низкого молекулярного веса. Аминогруппа может быть первичной, вторичной и третичной. Условия синтеза направлены на образование множества гомологов и изомеров. Этот ряд соединений обладает непрерывным спектром изоэлектрических точек от рН 3 до рН 10. Состав смеси, от которого зависит интервал значений рН, можно регулировать фракционированием. Для создания градиента рН смесь амфолитов помещают в стабилизированную среду и подают напряжение.

При аналитическом изоэлектрофокусировании распространенным стабилизатором является полиакриламидный или агарозный гель. Препаративное изоэлектрическое фокусирование чаще всего проводят в вертикальной колонке, стабилизация которой осуществляется с помощью градиента сахарозы. Мелкопористые гели для стабилизации непригодны, так как белки невозможно извлечь из таких гелей. Можно использовать гели с очень крупными порами типа агарозы. Его можно извлечь из колонки, разрезать

на диски и вымыть белки.

Рассмотрим поведение белка с изоэлектрической точкой (pI) равной 6 в трубке со стабилизированной средой и с постоянным возрастанием рН от значения 3 -вверху до 10 – внизу.

Через колонку проходит ток. Анод находится сверху, катод снизу. Молекулы белка в области с рН выше его изоэлектрической точки заряжаются отрицательно и мигрируют к аноду. Если же молекулы белка находятся в области с рН ниже его изоэлектрической точки, они заряжаются положительно и движутся к катоду. В

итоге белок фокусируется в зоне с рН 6, т.е. его изоэлектрической точке. Смесь белков при изоэлектрическом фокусировании дает изоэлектрический спектр.

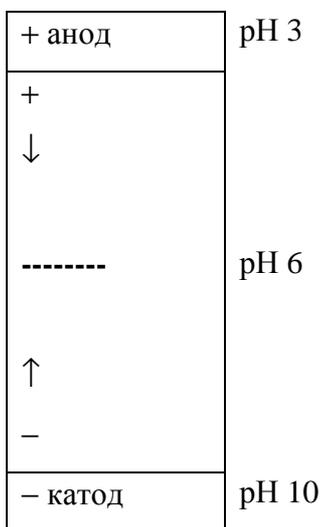


Рис. 9. Схема изоэлектрофокусирования

Образец вносят или в виде узкой зоны или распределяют по всему объему колонки или пластинки. Содержание белка в зоне при препаративном разделении может составлять 25 мг. Белки в изоточке могут выпадать в осадок. Этого можно избежать, добавляя в систему мочевины или неионогенные детергенты.

Для установления pI белка после разделения методом аналитического изоэлектрофокусирования необходимо: 1) обнаружить положение белка (например, с помощью бумажной реплики и последующего специфического прокрашивания), 2) измерить рН в месте локализации белка на поверхности геля с помощью специального электрода, датчики которого имеют диаметр всего лишь 3 мм.

Изоэлектрическое фокусирование обладает наивысшей разрешающей способностью при разделении смеси белков, хотя этот метод не позволяет разделять белки в зависимости от величины их молекул, как, например, электрофорез. Особое преимущество этого метода отражено в термине «фокусирование». В других методах разделения белков диффузия и перемешивание зон белков возрастают во времени. При изоэлектрическом фокусировании диффузия ограничена. Как только белковая молекула диффундирует и попадает в зону, отличающуюся по значению рН от её изоэлектрической точки, она становится заряженной и мигрирует в обратном направлении.

Одна из проблем изоэлектрического фокусирования состоит в том, что некоторые белки связываются с компонентами амфолитов, а это приводит к изменению изоэлектрической точки комплекса по сравнению с изоэлектрической точкой свободного белка. В результате могут появиться слабые дополнительные полосы, так как сами амфолиты тоже представляют собой дискретные компоненты. Таким образом, хотя наличие одной полосы при изоэлектрическом фокусировании служит хорошим критерием гомогенности, появление нескольких более слабых полос еще не говорит о гетерогенности препарата.

Капиллярный электрофорез

На сегодняшний день капиллярный электрофорез является одним из наиболее перспективных методов анализа. Простота, доступность и информативность метода, а также постоянное его совершенствование сделают его в ближайшем будущем наиболее востребованным аналитическим методом в повседневной лабораторной практике.

Система для капиллярного электрофореза включает: кварцевый капилляр, источник высокого напряжения, устройство ввода пробы, детектор и устройство вывода

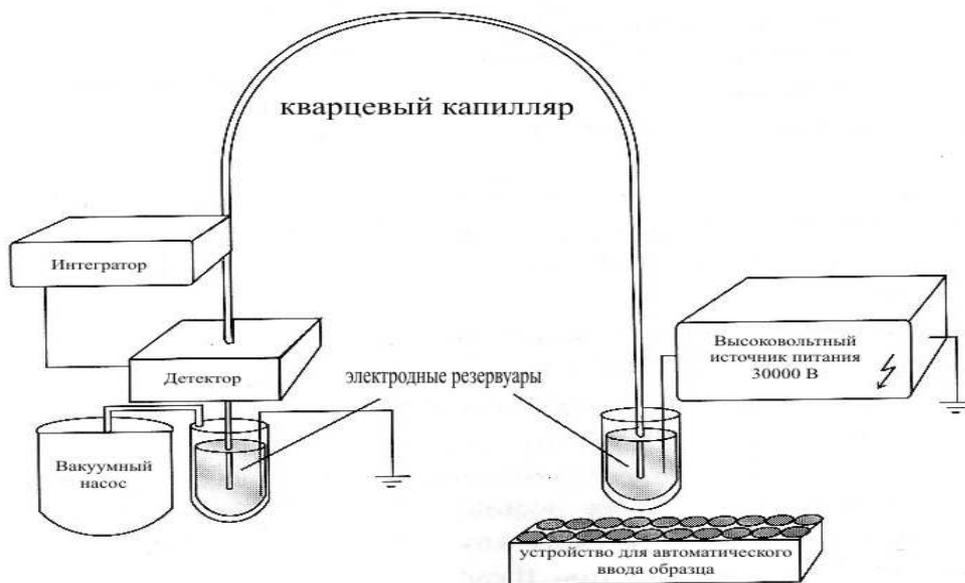


Рис. 10. Принципиальная схема прибора капиллярного электрофореза

информации. Все дополнительные приспособления позволяют автоматизировать подачу образцов, термостатировать капилляр и сделать более удобной обработку получаемой информации.

На рис. 10 представлена схема системы капиллярного электрофореза в простейшем варианте.

Капилляр заполняется раствором электролита (рабочего буфера), своими концами капилляр опущен в два сосуда, содержащих тот же электролит. В сосуды введены электроды, к которым прикладывается разность потенциалов. Под действием разности потенциалов в капилляре быстро устанавливается стационарное состояние. В капилляр со стороны анода вводится небольшой объем раствора пробы. Компоненты пробы, имеющие заряды, будут перемещаться в соответствии с присущими им

электрофоретическими подвижностями. Таким образом, происходит разделение исходной смеси, и на выходе капилляра вблизи катода формируются зоны, содержащие индивидуальные компоненты. Появление компонентов регистрируется с помощью детектора, полученная запись называется электрофореграммой. Описанный вариант носит название *капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ)*. На базе капиллярного электрофореза разработаны и другие аналитические методы: мицеллярная электрокинетическая хроматография, капиллярная электрохроматография, изотахофорез, капиллярный гель-электрофорез, капиллярная изоэлектрическая фокусировка и др.

Двумерные системы электрофореза.

Для сложных смесей белков используют повторное разделение в направлении, перпендикулярном первому (рис. 11). Например, полоску геля после разделения изоэлектрофокусированием, накладывают на край ПААГ, содержащего ДДС-Na (SDS) и проводят электрофорез в перпендикулярном направлении. Таким образом, в первом направлении белки разделяются в соответствии с их изоэлектрическими точками, а во втором – в соответствии с размерами субъединиц. Этот метод позволяет провести одновременное разделение до 5000 белков.

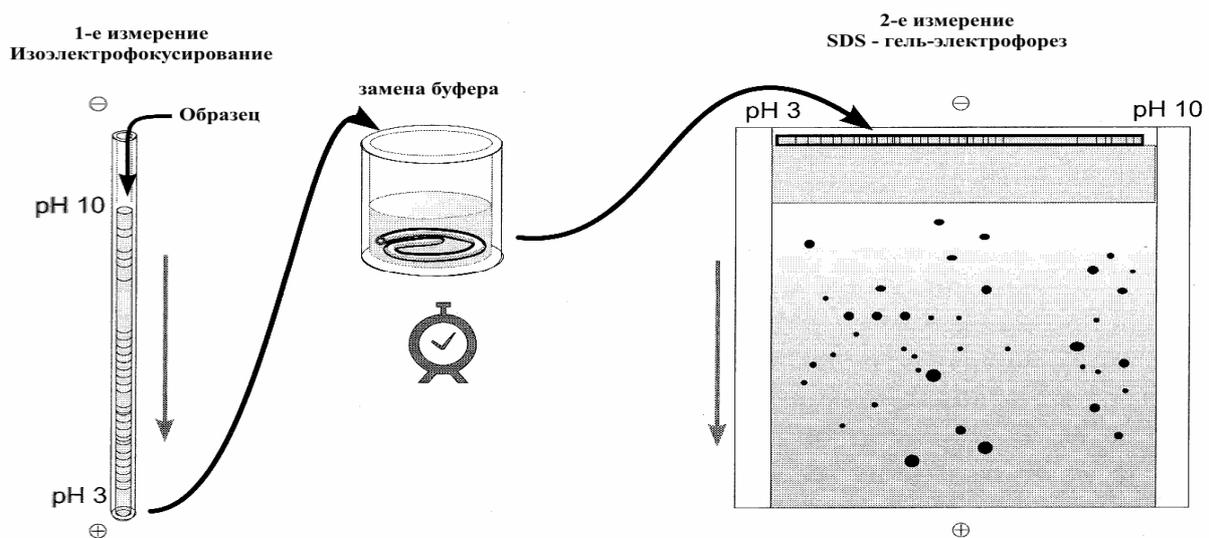


Рис. 11. Схема проведения двумерного электрофореза

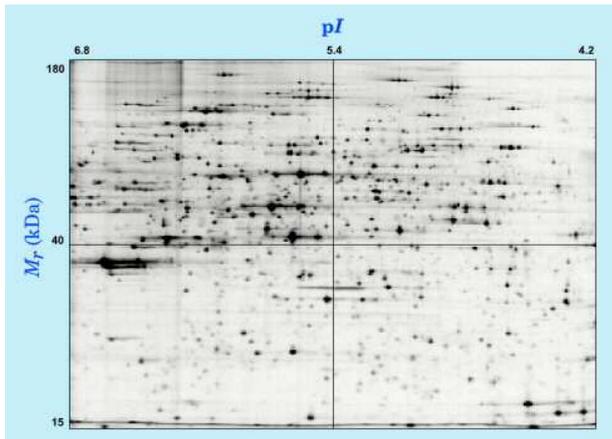


Рис.12. Разделение смеси белков методом двумерного электрофореза



Рис.13. Прибор для проведения двумерного электрофореза Amersham Bioscience (циркуляционный термостат с охлаждением, камера для изоэлектрофокусирования и электрофореза в ПААГ, высоковольтный источник питания)

Кристаллизация белков

Кристаллизация белков используется: а) как завершающая стадия очистки, б) для доказательства гомогенности белка, в) как метод стабилизации при хранении (многие фирмы продают чистые ферменты в виде суспензии кристаллов, помещенных в раствор сульфата аммония), г) для определения третичной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа.

Кристаллы растут из пересыщенных растворов вследствие агрегации высокоупорядоченным образом. Выращивание кристаллов занимает много времени, особенно чтоб получить более крупные кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного

анализа. Чаще всего в таблице, отражающей ход очистки белка, кристаллизация представлена в качестве последнего этапа. Это указывает на то, что фермент получен в достаточно чистом состоянии, и такой кристаллический препарат пригоден для длительного хранения. Но кристаллы могут образовываться и в очень разнородных смесях белков. Если примеси не находятся в перенасыщенном состоянии, то агрегировать будет тот белок, который присутствует в этом состоянии, и могут образоваться его кристаллы.

Например, метод очистки кроличьей альдолазы заключался в том, что к мышечному экстракту добавляли сульфат аммония до 50% насыщения, осадок удаляли. В надосадочной жидкости альдолаза составляла около 15% от всех белков. При увеличении концентрации сульфата аммония до 52% насыщения альдолаза начинала медленно кристаллизоваться. Отсюда следует, что само образование кристаллов фермента не может служить доказательством того, что раствор, из которого он выпал, содержит чистый фермент.

Методы кристаллизации

Чтобы началась кристаллизация, необходимо создать такие условия, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. Для этой цели используют осадители (вещества, уменьшающие растворимость): сульфат аммония, полиэтиленгликоль, органические растворители. Обычно требуется тщательное изучение условий кристаллизации конкретного белка: pH, концентрации буфера и осадителя, ионов металлов.

Используют следующие приемы:

1. равновесный диализ против осадителя,
2. диффузия паров летучих веществ (метод «висящей капли»).

Осадитель помещают на дно стаканчика, капля концентрированного раствора белка находится на внутренней стороне стеклышка, закрывающего этот стакан. За счет диффузии паров происходит медленное возрастание концентрации осаждающего вещества

3. метод свободной диффузии

Концентрированные растворы белка и осадителя наслаиваются, идет диффузия. В отличие от метода 2 происходит быстрое пересыщение белкового раствора и образование центров кристаллизации. При дальнейшей диффузии идет понижение концентрации белка и осадителя.

Очень важна скорость образования зародышей кристаллов, которая зависит от концентрации белка, а чем меньше кристаллов, тем больше их размер. Скорость же роста кристаллов зависит от растворимости белка, т.е. от концентрации растворителя. Иногда чтобы вырастить большие кристаллы, в раствор белка вносят затравку – мелкие кристаллы этого белка.

Кристалл белка может храниться полгода в специальном растворе, который не содержит белка. Подбирается такая концентрация осадителя, при которой кристалл не растворялся бы и не трескался. Кроме того, в раствор добавляют азид натрия или толуол против бактериального заражения.

В биохимических журналах результаты очистки ферментов принято представлять в форме таблицы.

Таблица 4

Очистка фермента

Стадии очистки	Объем (мл)	Суммарный белок (мг)	Общая активность (ед.)	Удельная активность (ед./мг белка)	Степень очистки (раз)	Выход (%)
Экстракт	200	2500	1800	0,72	1	100
Осаждение сульфатом аммония	100	1800	1600	0,9	1,23	88
Сефадекс G-50	50	800	1480	1,85	2,56	93
ДЭАЭ-целлюлоза	40	240	1100	4,6	6,4	61
Фенил-сефароза	10	35	820	23,4	32,5	45
Моно Q	3	8	510	63,7	88,5	28

Доказательства гомогенности белка

Цель анализа конечного продукта, полученного в результате очистки, заключается в том, чтобы выяснить, содержит ли он один или большее число белков, и обнаружить в нем примеси, даже если они присутствуют в очень малых количествах. Так гель-электрофорез позволяет выявить 1% примеси.

1. Электрофорез как в нативных, так и в денатурирующих условиях, является методом №1 для доказательства гомогенности белка.

2. Определение молекулярной массы с помощью масс-спектрометрии (метод №2)

3. Метод изоэлектрофокусирования,

4. Ультрацентрифугирование используется как основной или дополнительный метод при анализе липопротеинов или других, связанных с мембранами белков. В опытах по скоростной седиментации хорошо разделяются компоненты с различными коэффициентами седиментации. Небольшие количества примеси детектируются по отклонению экспериментальных данных от теоретической прямой зависимости между логарифмом концентрации и квадратом расстояния от седиментирующей частицы до оси вращения.

5. О гомогенности препарата можно судить по данным N-концевого анализа, при условии, что N-концевая аминокислота не заблокирована и нет примесных белков с идентичной N-концевой аминокислотой.

6. Аминокислотный состав может дать сведения о гетерогенности препарата, если точно известны количества двух или более аминокислот и молекулярная масса белка. Например, количества тирозина и триптофана можно определить спектрофотометрически. Если молярное содержание этих аминокислот нельзя выразить простым отношением (к примеру, оно составляет 5:6, а получают 5,2:6,5), то в препарате присутствует примесь.

7. Кристаллизация. Использование кристаллизации как критерия гомогенности не является однозначным.

Выделение гомогенного белка завершено и можно приступить к его характеристике.

Завершая этот раздел, посвященный очистке белков, можно привести высказывание австралийского биохимика Р.Скоупса: «Очистка белка – это не просто каторжный труд и не поиски случайной удачи, а вполне уважаемое и приносящее удовлетворение занятие».

Тестовые задания

ОБВЕДИТЕ КРУЖКОМ НОМЕР ПРАВИЛЬНОГО ОТВЕТА:

1. СТАБИЛЬНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ СВЯЗАНА С
 - 1) высокой молекулярной массой
 - 2) наличием в структуре дисульфидных мостиков
 - 3) субъединичной структурой

2. ИЗМЕЛЬЧЕННАЯ ТКАНЬ В БУФЕРНОМ РАСТВОРЕ (СМЕСЬ ДО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ) НАЗЫВАЕТСЯ
 - 1) экстрактом
 - 2) супернатантом
 - 3) гомогенатом

3. НЕИОННЫЙ ДЕТЕРГЕНТ ТРИТОН X-100 ПРИМЕНЯЕТСЯ
 - 1) как водоотнимающее средство при кристаллизации белков
 - 2) при экстракции белков, связанных с мембраной
 - 3) как ингибитор эндогенных фенолоксидаз растений

4. 100 МЛ РАСТВОРА БЕЛКА С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ 1 МГ/МЛ В 1 М NaCl СКОНЦЕНТРИРОВАН УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЕЙ ДО 10 МЛ. КОНЕЧНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ РАСТВОРА НАД МЕМБРАНОЙ
 - 1) белок 10 мг/мл, 1М NaCl
 - 2) белок 1 мг/мл, 0,1М NaCl
 - 3) белок 10 мг/мл, 0,1М NaCl

5. НАИБОЛЕЕ УПОТРЕБИМАЯ СОЛЬ ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ
 - 1) карбонат натрия
 - 2) сульфат аммония
 - 3) хлорид бария

6. ПРИ ОСАЖДЕНИИ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ ВЫСОКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ СОЛИ В РАСТВОРЕ

- 1) повышает скорость осаждения
- 2) снижает электростатическую агрегацию молекул белка
- 3) не влияет на процесс осаждения

7. МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ РАЗДЕЛЯЮТ МАКРОМОЛЕКУЛЫ В СООТВЕТСТВИИ С ИХ

- 1) зарядом
- 2) размерами
- 3) растворимостью

8. ДЛЯ СИНТЕЗА АФФИННЫХ СОРБЕНТОВ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) обработанную бромцианом сефарозу
- 2) обработанный метиленбисакриламидом биогель
- 3) обработанный эпихлоргидрином сефадекс

9. ПРИ ПААГ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДДС-Na ДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПРОИСХОДИТ

- 1) по заряду
- 2) в зависимости от радиуса белковой глобулы
- 3) по молекулярной массе

10. КАКИЕ ВЕЩЕСТВА МОЖНО ФРАКЦИОНИРОВАТЬ С ПОМОЩЬЮ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

- 1) амфотерные
- 2) высокомолекулярные
- 3) гидрофобные

11. ИЗ ЭКСТРАКТА, СОДЕРЖАЩЕГО 500 МГ ОБЩЕГО БЕЛКА И 100 ЕД. АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА, ПОЛУЧЕН ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ 2 МГ БЕЛКА И 80 ЕД. АКТИВНОСТИ. С КАКИМ ВЫХОДОМ (ПО АКТИВНОСТИ) ПОЛУЧЕН ФЕРМЕНТ И КАКОВА ЕГО СТЕПЕНЬ ОЧИСТКИ

- 1) выход 80%, степень очистки 100
- 2) выход 50%, степень очистки 50
- 3) выход 80%, степень очистки 200

12. АМФОЛИТЫ-НОСИТЕЛИ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) полиакриламидным гелем
- 2) поперечно сшитой агарозой
- 3) гетерогенной смесью полиаминокарбоновых кислот

13. ДЛЯ ПРОЯВЛЕНИЯ БЕЛКА ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ГЕЛЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО ОБРАБАТЫВАЮТ

- 1) раствором красителя, смесью кислоты и спирта, водой
- 2) смесью кислоты и спирта, раствором красителя, водой
- 3) водой, смесью кислоты и спирта, раствором красителя

УСТАНОВИТЕ СООТВЕТСТВИЕ:

14. НАЗВАНИЕ ГЕЛЯ

- 1) биогели
- 2) сефадексы
- 3) сефарозы

ТИП ГЕЛЯ

- А) агароза
- В) полиакриламид
- С) декстран

Ответ

15. ТИП ОБМЕНА

- 1) катионообменник
- 2) анионообменник

ИОНООБМЕННИКИ

- А) КМ-целлюлоза
- В) ДЭАЭ-сефадекс
- С) СП-сефадекс
- Д) ТЭАЭ-целлюлоза

Ответ

Литература

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Изд-во Мир., 1982. 1117 с.
2. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Изд-во Мир., 1985. 358 с.
3. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Изд-во Наука, 1981. 536 с.
4. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Изд-во Наука, 1985. 536 с.
5. Westermeier R. Electrophoresis in Practice. Weinheim-New York: WILEY-VCH, 2001. P.350.
6. Практикум по биоорганической химии Науч. Ред. В.А.Стоник . Владивосток: Изд-во ДВГУ., 2002. 156 с.
7. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. Purification and some properties of β -1,3-glucanase from the crystalline style of bivalve *Spisula sachalinensis* // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 32. P. 111-115.
8. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. The distribution of the laminarinases in marine invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. 1970. V. 32. P. 459-464.
9. Сова В.В., Елякова Л.А., Иванова Е.П., Федосов Ю.В., Михайлов В.В. Индуцированная β -1,3-глюканаза из морской бактерии *Alteromonas* sp. // Биохимия. 1994. Т. 59. № 9. С. 1369-1377.
10. Kozhemyako V.B., Rebrikov D.V., Lukyanov S.A. et al. Molecular cloning and characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from the mollusk *Spisula sachalinensis* Comp. Biochem. Physiol. 2004. В 137. P. 169-178.