

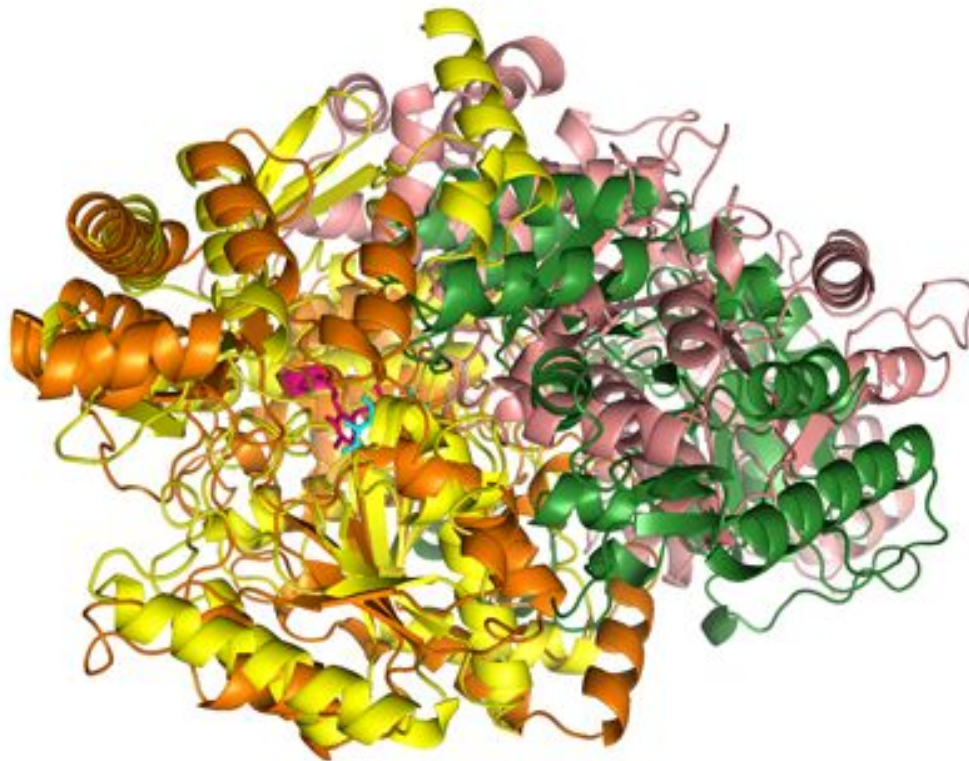
Методы исследования аминокислот и белков



Выполнила: Наумова М. Ахмадеева Л.

Методы выделения и очистки белков

- 1. дробление биологического материала и разрушение клеточных мембран;
- 2. фракционирование органелл, содержащих те или иные белки;
- 3. экстракцию белков (перевод их в растворённое состояние);
- 4. разделение смеси белков на индивидуальные белки



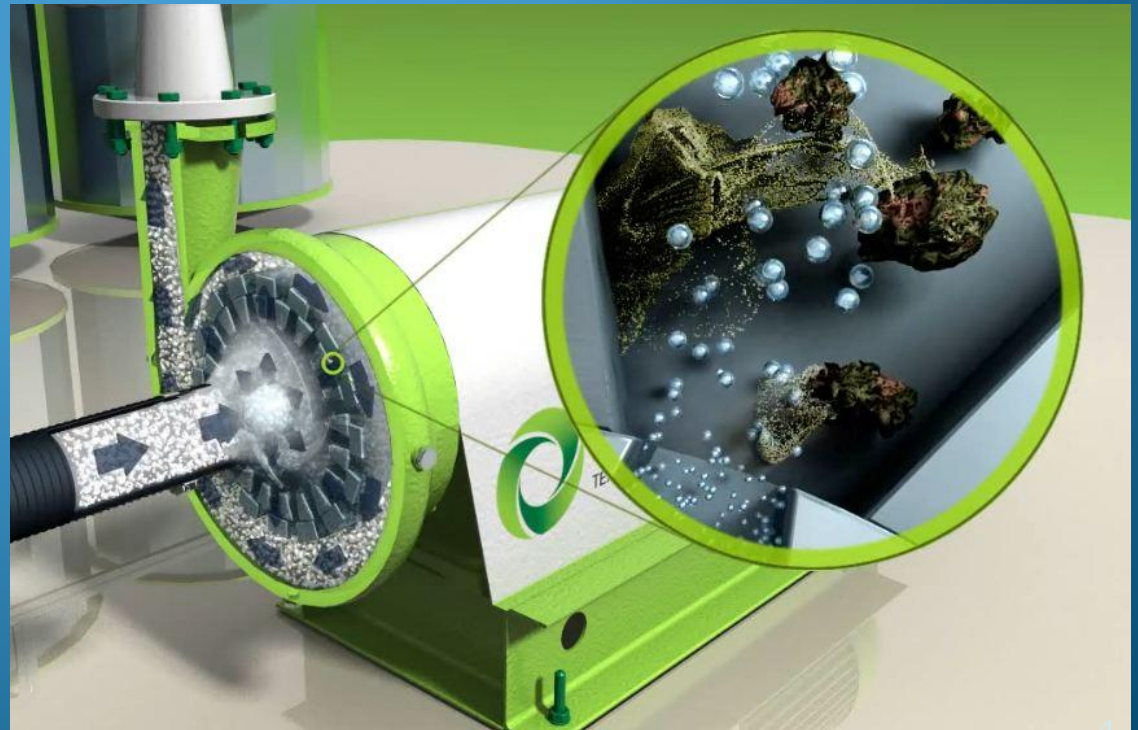
Методы разрушения тканей и экстракции белков

- *Гомогенизация биологического материала*
- *Метод замораживания и оттаивания ткани*
- *Вскрытие ультразвуком*
- *Экстракция белков, связанных с мембранами, и разрушение олигомерных белков на протомеры*



Гомогенизация биологического материала

Ткань, находящуюся в буферном растворе с определённым значением рН и концентрацией солей, помещают в стеклянный сосуд (гомогенизатор) с пестиком. Вращающийся пестик измельчает и растирает ткань о притёртые стенки сосуда.



Метод замораживания и оттаивания ткани

В результате попеременного замораживания и оттаивания образующиеся кристаллы льда разрушают оболочки клеток.



Вскрытие ультразвуком

Возможно вскрытие клеток ультразвуком, но в этом случае возникает реальная опасность дробления крупных молекул ДНК и белков.



Экстракция белков, связанных с мембранами, и разрушение олигомерных белков на протомеры

В раствор добавляют детергенты; чаще всего используют тритон X-100 или додецилсульфат натрия. При действии детергентов обычно разрушаются и гидрофобные взаимодействия между протомерами в олигомерных белках.



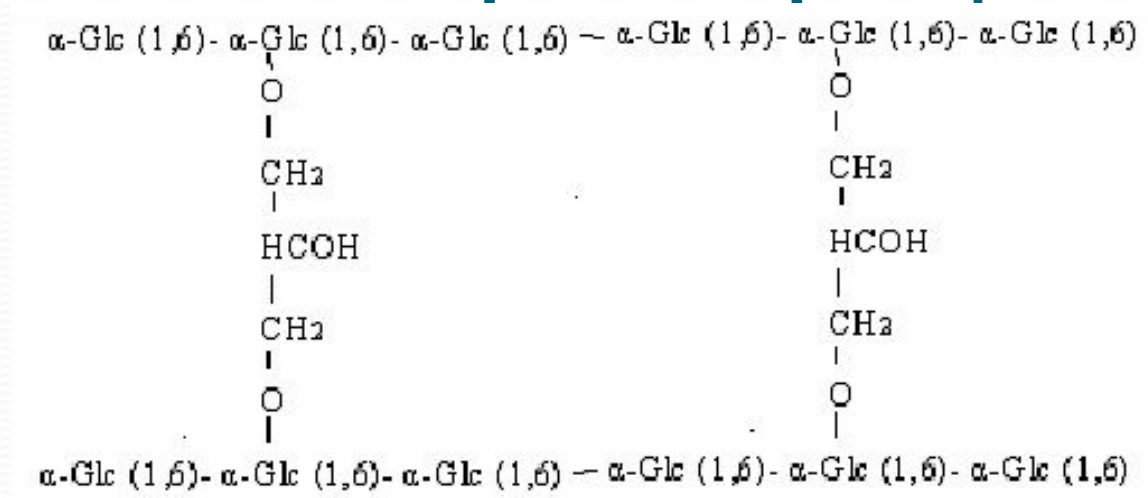
ДИАЛИЗ

- Принцип метода: низкомолекулярные вещества удаляются из раствора белка и замещаются буфером.



Методы очистки белков.

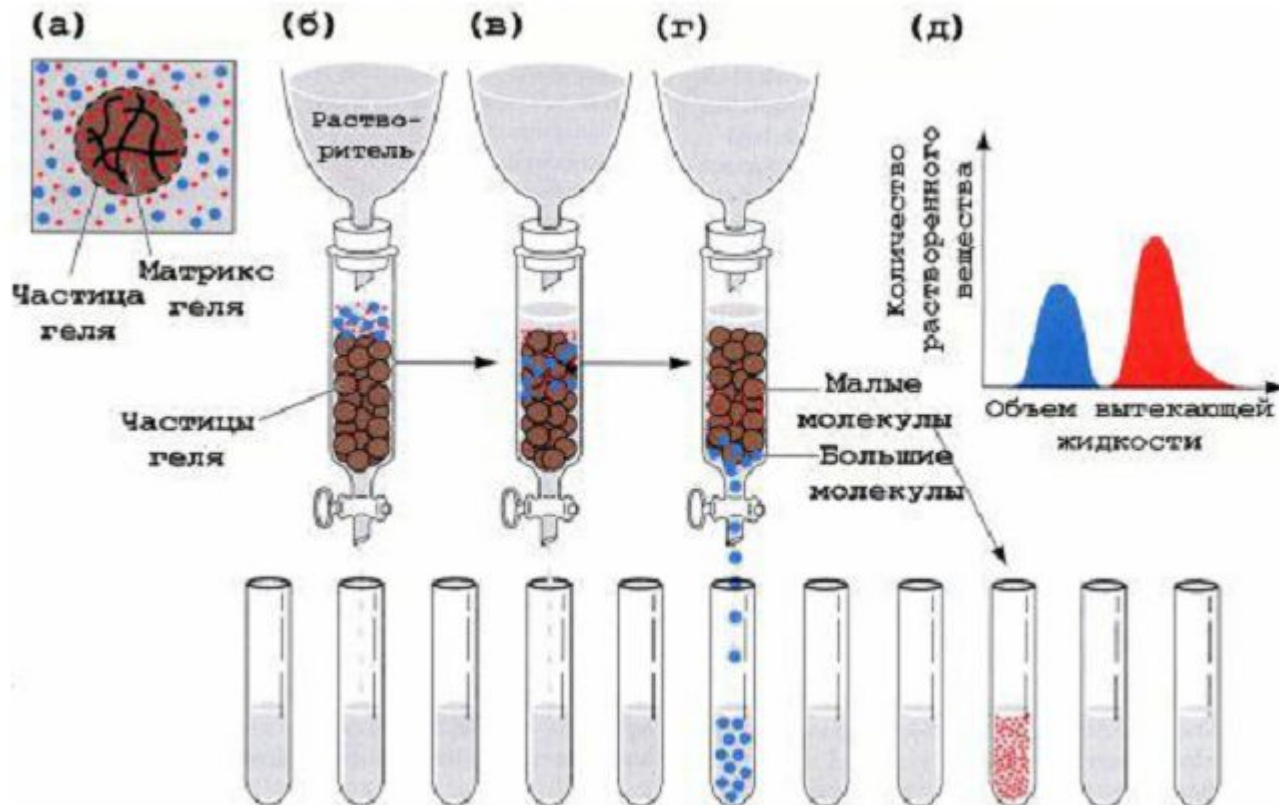
Гель-фильтрация



- Сефадексы (*separation, pharmacia, dextran*) – это поперечношитые декстраны заданными размерами пор.
- Биогели
- Сефароза-поперечношитая агароза

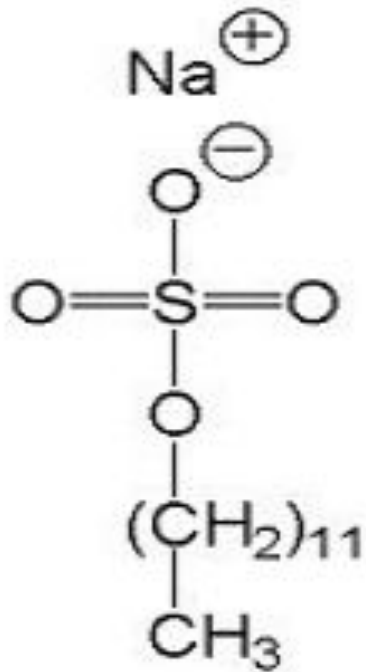
Гель-фильтрация

Большие молекулы не проникают во внутреннюю водную фазу геля и остаются снаружи, двигаясь вместе с подвижной фазой вниз вдоль колонки. Эти молекулы первыми выходят из хроматографической колонки. **Небольшие молекулы**, напротив, свободно диффундируют внутрь зерен и соответственно с меньшей скоростью двигаются вдоль колонки.



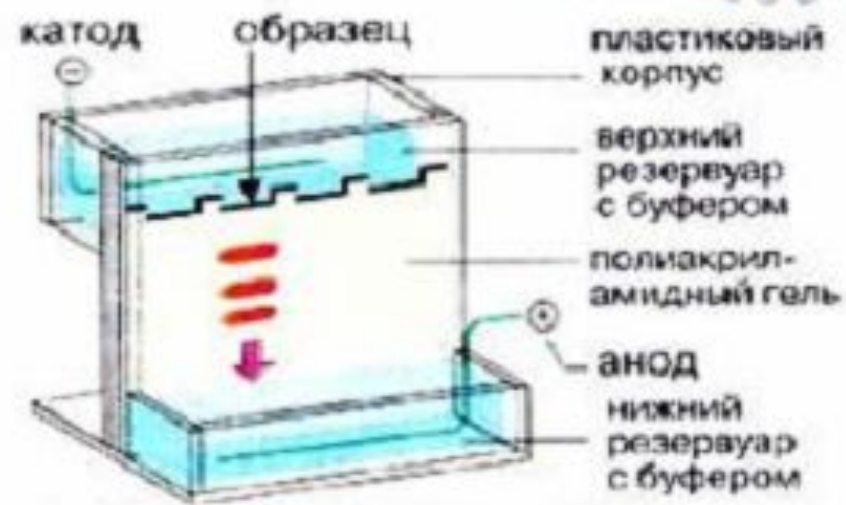
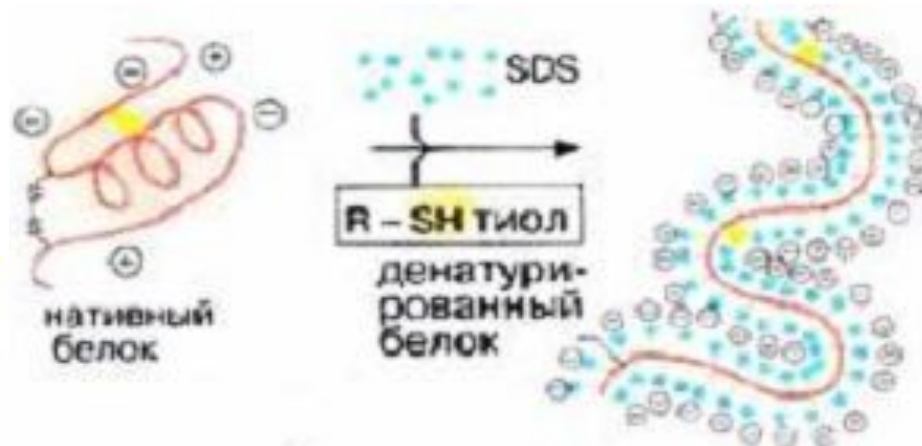
Гель-электрофорез

ПААГ (полиакриламидный гель)



Окрашивание
(кумасси синий,
нитрат серебра)
Флуоресценция
(флуорескамин)
Авторадиография

ДДС-Na
(додecilсульфат натрия)



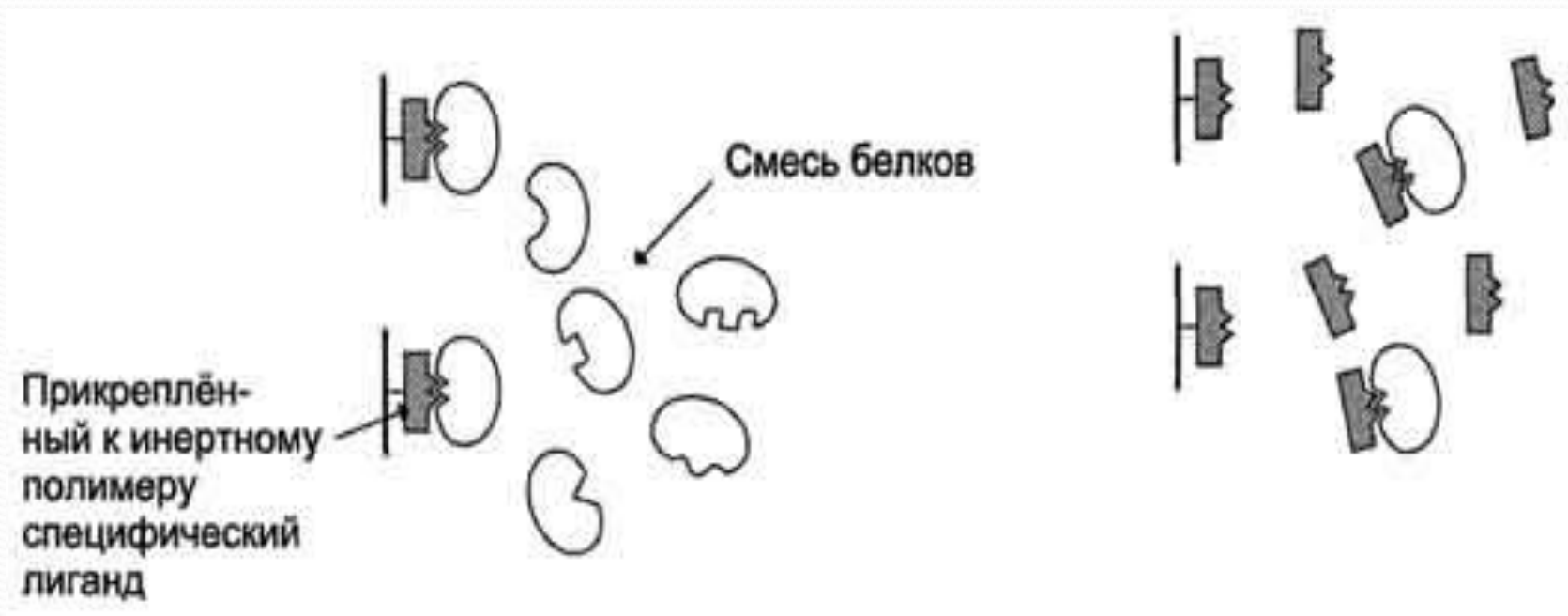
Гель-электрофорез

- *Метод основан на том, что при определённом значении pH и ионной силы раствора белки движутся в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, движутся к аноду (+), а положительно заряженные белки - к катоду (-).*



Аффинная хроматография (хроматография по сродству)

- Аффинная хроматография отличается высокой избирательностью и помогает очистить выделяемый белок в тысячи раз.



Ультрацентрифугирование

- Метод разделения основан на различии в молекулярных массах белков.

- в сахарозном буфере

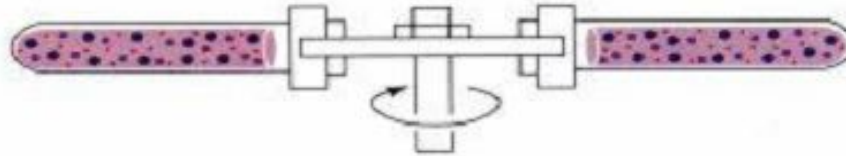


Ультрацентрифугирование

-в растворе хлорида цезия



1. Однородная смесь образца и вещества, формирующего градиент



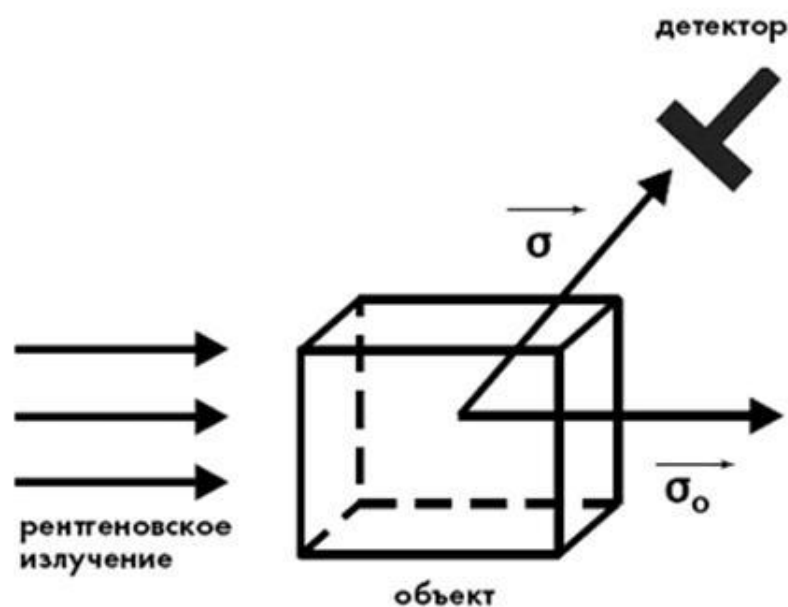
2. Центрифугирование



3. Сформированный градиент и полосы разделенных молекул

Рентгеновский эксперимент. И как же он ставится?

- Исследуемый объект помещают в пучок рентгеновских лучей и измеряют интенсивность рассеянного в различных направлениях излучения.

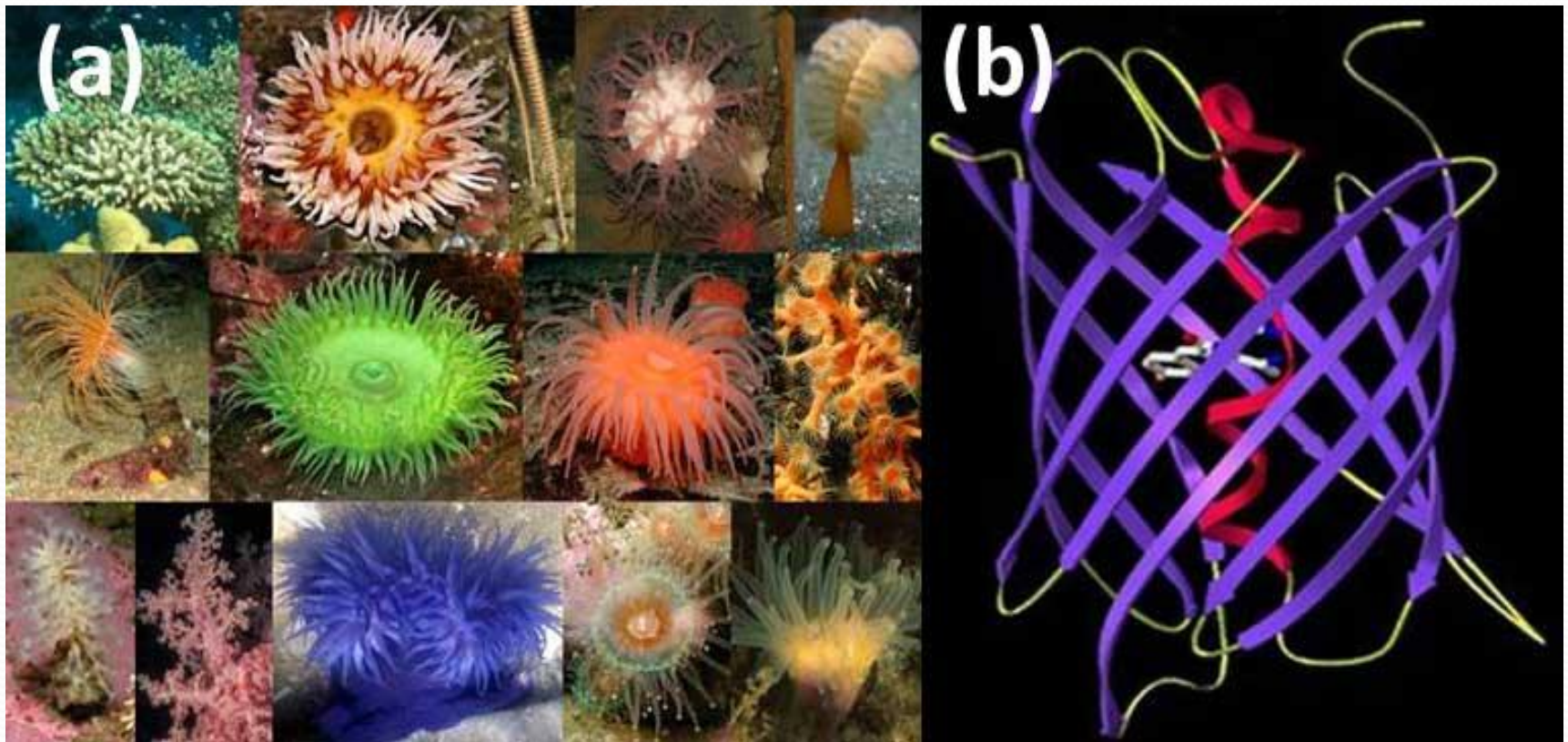


На входе мы имеем неизвестный объект, на выходе дифракционную картину.

Метод основан на дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке и поэтому применим только к веществам в кристаллическом состоянии.

Кристаллизация

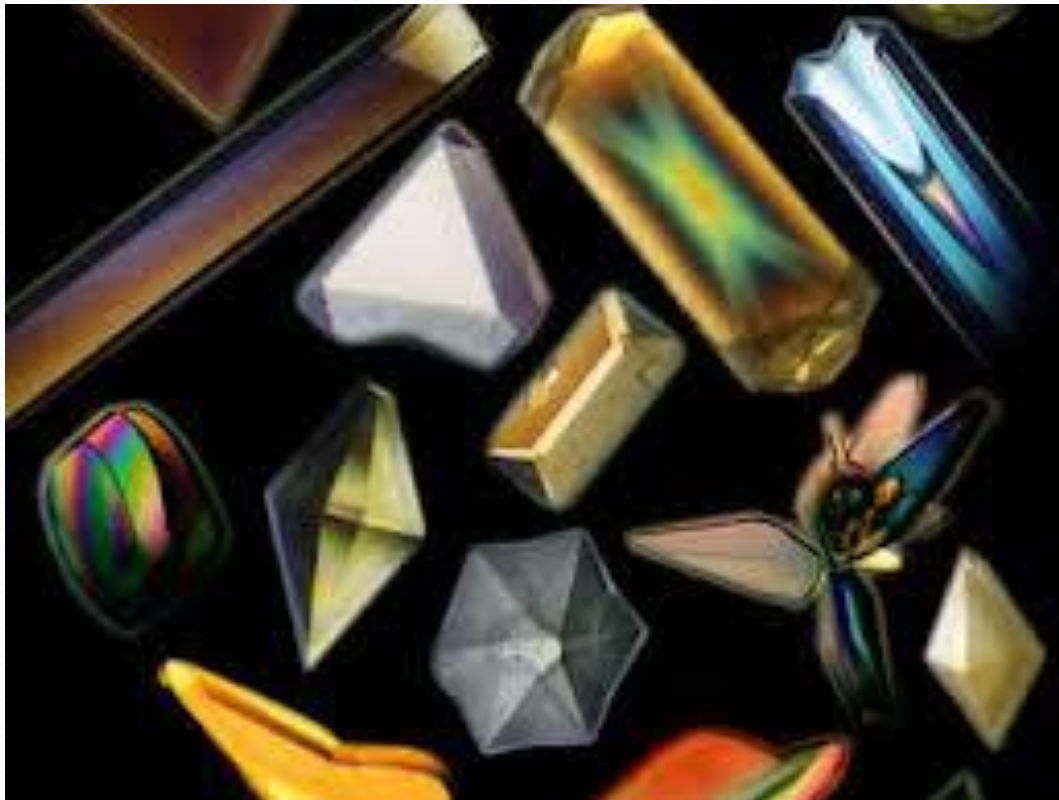
- кристалл – это такой образец исследуемого вещества, в котором много (~10¹²) идентичных молекул находятся в одинаковой ориентации и их центры образуют правильную трехмерную решетку.
- Наличие пересыщенного раствора – необходимое условие кристаллизации



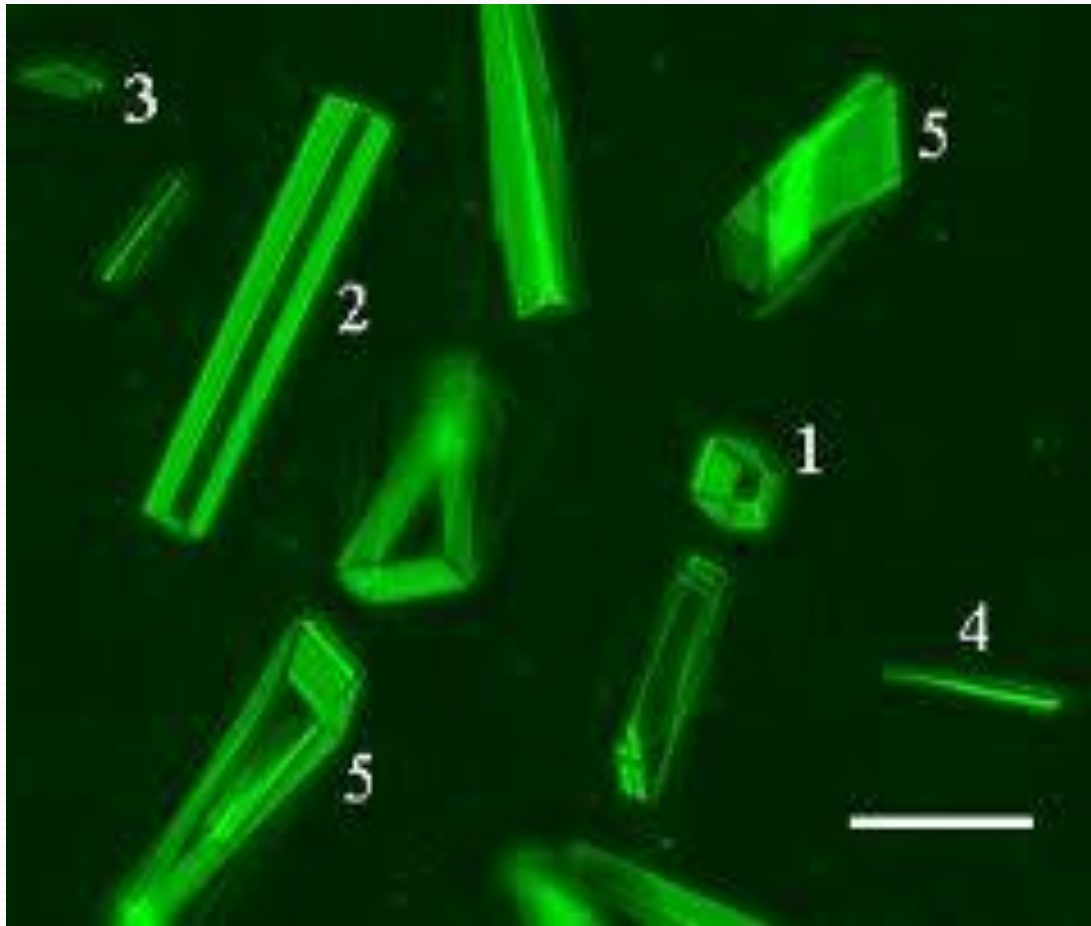
Кристаллизация

Способа получения перенасыщенного раствора:

- 1) Заключается в постепенном удалении растворителя обычным испарением.
- 2) связан с использованием зависимости растворимости от температуры.
- 3) связан с введением в раствор какого-либо вещества, вызывающего понижение растворимости(соли,орг.соединения)



Кристаллизация



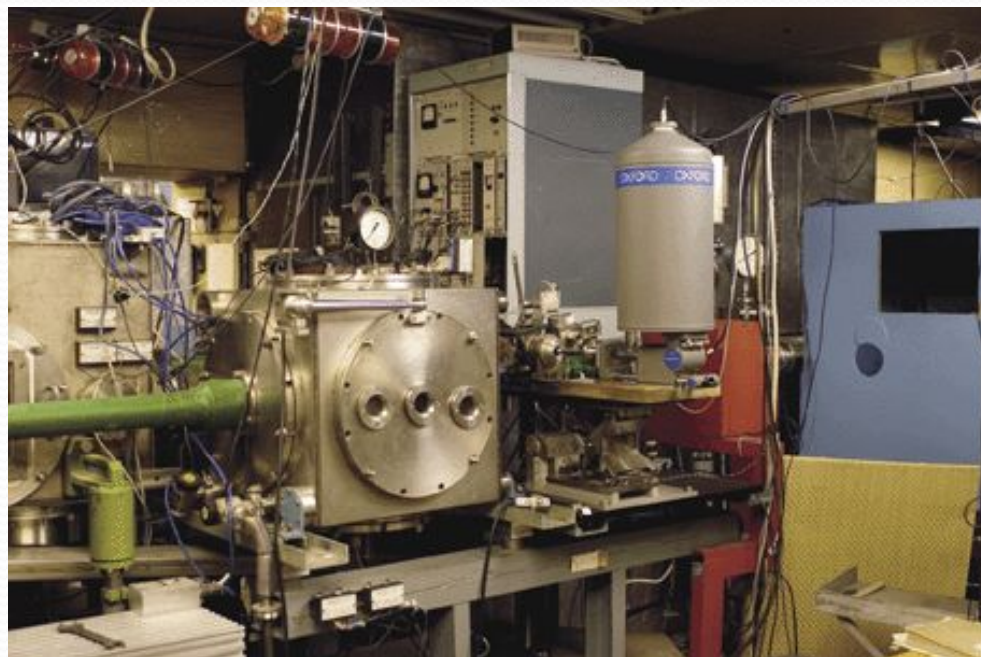
Различные модификации кристаллов белка куриного яйца лизоцима: 1 – тетрагональная модификация, 2 – моноклинная, 3 - триклинная, 4 – игольчатые кристаллы, 5 – кристаллы неизвестных модификаций. Кристаллы получены в одном растворе при смешении солей-осадителей. Изображение получено с помощью микроскопа фазового контраста.

Кристаллизация

Синхротронный ускоритель.



Гигавольтный синхротронный ускоритель.
Звеньевые хомуты KF с быстро
прижимными Al уплотнениями



Станция рентгено-флуорисцентного
элементного анализа «Байкал» Сибирского
центра синхротронного излучения

Литература

- Е. Горячева. Рентгеноструктурный анализ белков
- Методы исследования белков и нуклеиновых кислот (Остерман Л.А.)
- Биохимия: Учеб. для вузов, Под ред. Е.С. Северина., 2003. 779 с.
- <http://www.chem.msu.su/rus/teaching/kolman/84.htm>
- <http://cs6300.userapi.com/u12816816/docs/d105f4de5c84..>
- [http://www.phys.msu.ru/rus/about/sovphys/ISSUES-2008/4\(64\)-2008/64-4/](http://www.phys.msu.ru/rus/about/sovphys/ISSUES-2008/4(64)-2008/64-4/)
- <http://lenta.ru/news/2009/07/30/prots/>