



2004



Очистка белков

(Разделение белков из гетерогенной белковой смеси)

- I. Разделение на основе растворимости белков
- II. Разделение на основе формы, размера молекулы и Mr.
 - 1) Диализ
 - 2) Гель-фильтрация
 - 3) Ультрацентрифугирование
 - 4) SDS - ПААГ электрофорез



Ультрацентрифугирование

$$s = \frac{V}{W^2 \cdot r}$$

s - константа седиментации;

V - скорость перемещения границы *растворитель-белок* (см/с);

W - угловая скорость ротора (рад/с);

r - радиус ротора (см).

S - единица измерения величины константы седиментации (Сведберг).



Очистка белков

(Разделение белков из гетерогенной белковой смеси)

III. Разделение на основе молекулярного заряда

- 1) Ион-обменная ХГ
- 2) Высоко-эффективная жидкостная ХГ (ВЭЖХ)
(HPLC - High Performance Liquid Chromatography)
- 3) Электрофорез
 - а) гель-ЭФ
 - б) Изоэлектрическое фокусирование
 - в) Капиллярный ЭФ

IV. Разделение с помощью специфического связывания

- 1) Аффинная хроматография
- 2) Осаждение антителами



Очистка белка от низкомолекулярных примесей

Диализ

Кристаллизация

Обессоливание (*с помощью гель-фильтрации*)

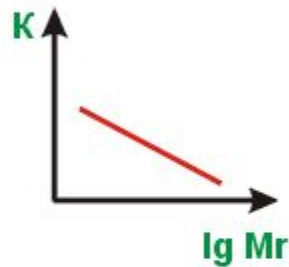
Ультрафильтрация



Оценка степени очистки белка

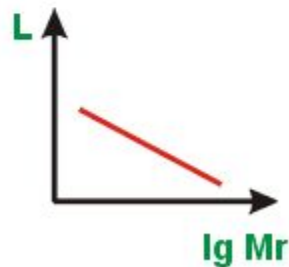
Способы определения молекулярной массы белка

1. Метод седиментационного анализа
2. Гель-фильтрация



$$K = \frac{V_e - V_o}{V_s}$$

3. Электрофорез в ПААГ с SDS



$L(\text{см})$ - длина пробега от линии старта



Последовательность изучения структуры белка

I. Анализ первичной структуры

1. Определение АК состава белка
 - 1.1. Горячий кислотный гидролиз
 - 1.2. Аминокислотные анализаторы
2. Определение АК последовательности

Порядок изучения первичной структуры

1. Определение числа протомеров в молекуле белка.
2. Разрушение S-S связей и проведение селективного гидролиза, позволяющего получить фрагменты ПП цепи.
3. Установление порядка чередования АК в каждом фрагменте.
4. Определение порядка следования фрагментов в ПП цепи.

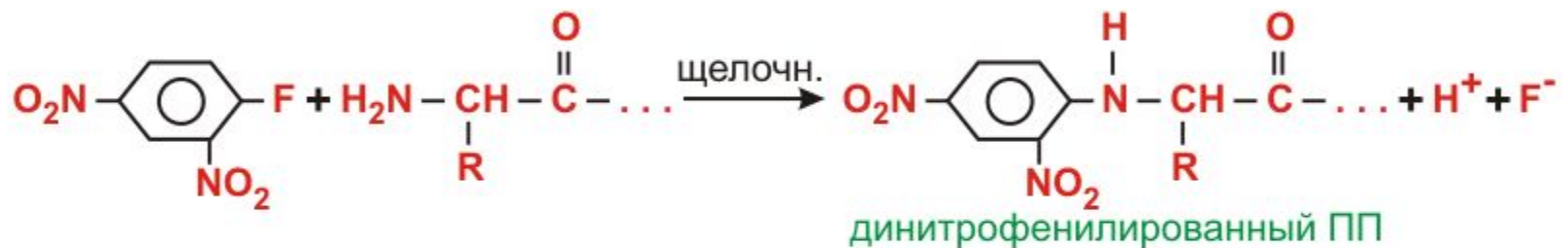


Последовательность изучения структуры белка

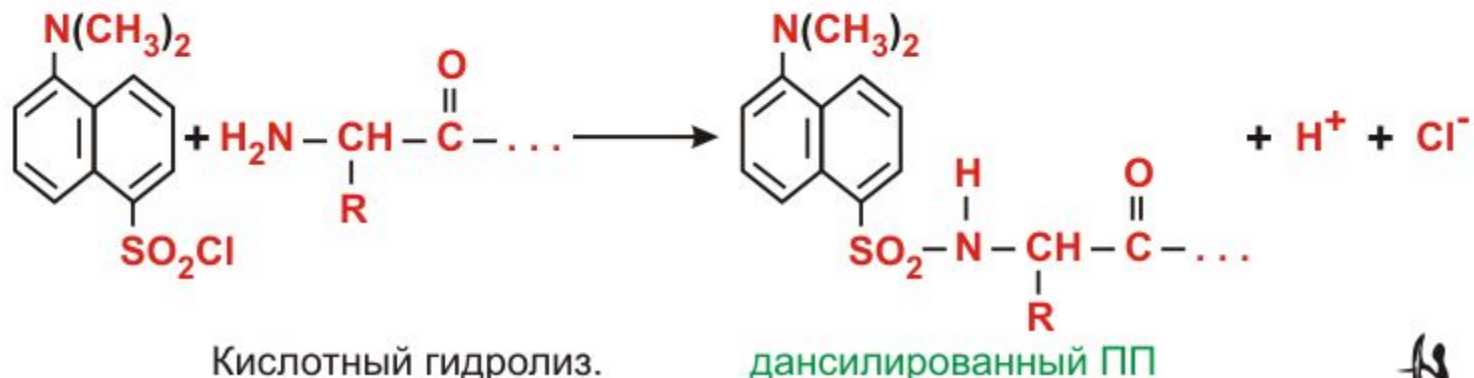
3. Установление порядка чередования АК внутри короткого ПП фрагмента

Идентификация N-конца ПП цепи

3.1. Реакция Sanger с фтординитробензолом



3.2. Реакция с дансилхлоридом



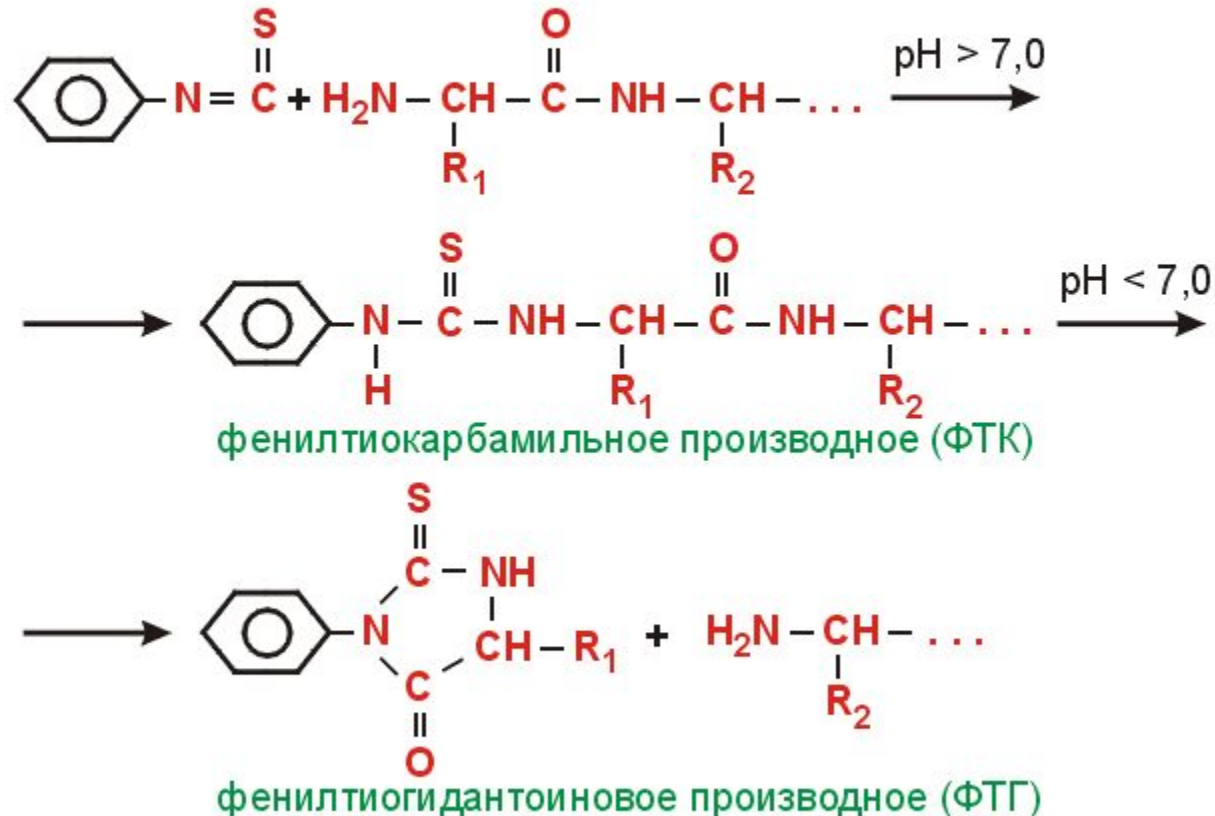
Кислотный гидролиз.
ХГ аминокислот



Последовательность изучения структуры белка

3. Установление порядка чередования АК внутри короткого ПП фрагмента

3.3. Реакция Эдмана с фенилизотиоцианатом



3.4. Аминопептидазы



2004