

Методы исследования белковых молекул

Методы биохимических исследований

- В основе биохимической методологии лежит фракционирование, анализ и изучение структуры и свойств отдельных компонентов живого вещества.
- Методы биохимии преимущественно формировались в XX веке; наиболее распространенными являются:
- хроматография, изобретенная М.С.Цветом в 1906г.,
- центрифугирование (Т.Сведберг (Т.Сведберг, 1923 г., Нобелевская премия по химии 1926 г.)
- электрофорез (А.Тизелиус (А.Тизелиус, 1937 г., Нобелевская премия по химии 1948 г.).

Методы разделения и очистки белков

- Высаливание
- Диализ
- Электрофорез
- Ультрацентрифугирование
- Хроматографические методы:
 - Гель – фильтрация или метод молекулярных сит
 - Ионообменная хроматография
 - Аффинная хроматография и др.



Высаливание

- Суть метода состоит в том, что растворимость белка может изменяться при разной концентрации соли или другого осадителя, а также при изменении pH. Такой осадитель разрушает гидратную оболочку белка, падает растворимость белка в воде и он выпадает в осадок.
- Осадителями могут быть: сульфата аммония – $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, ацетон, спирт.
- Изменение растворимости при различных концентрациях соли и pH среды используются для выделения индивидуальных белков.
- Чаще всего используют разные концентрации **соли сульфата аммония – $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$**

Диализ

- Диализ — освобождение коллоидных растворов освобождение коллоидных растворов и растворов высокомолекулярных веществ от растворённых в них низкомолекулярных соединений при помощи полупроницаемой мембраны.
- **При диализе** молекулы растворенного низкомолекулярного вещества проходят через мембрану, а неспособные диализировать (проходить через мембрану) высокомолекулярных соединения остаются в растворе. Материал, прошедший через мембрану, называется **диализат**.

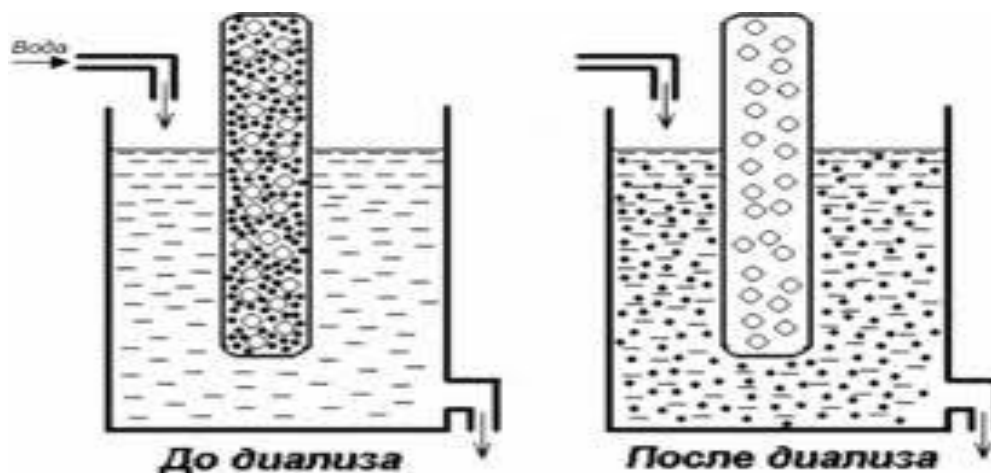
Ультрацентрифугирование — метод разделения и исследования высокомолекулярных соединений с помощью ультрацентрифуги.

- Метод заключается в том, что белки в пробирке помещают в ультрацентрифугу. При вращении ультрацентрифуги скорость оседания белков пропорциональна их молекулярной массе: более тяжелые белки образуют фракции, расположенные ближе ко дну кюветы, более легкие — к поверхности.



Простейший диализатор

- Представляет собой мешочек из коллодия (полупроницаемого материала), в котором находится диализируемая жидкость. Мешочек погружают в растворитель (например в воду). Постепенно концентрации диализирующего вещества в диализируемой жидкости и в растворителе становятся равными. Меняя растворитель, можно добиться практически полной очистки от нежелательных примесей.



Электрофорез.

Электрофорез основан на свойстве заряженных молекул белка перемещаться в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду и молекулярной массе.

Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), форма и электрический заряд.

Причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Электрофорез белков

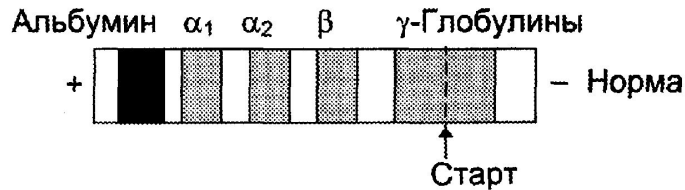
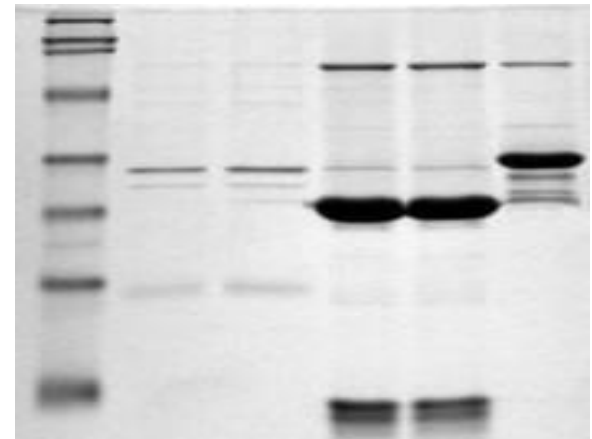


Рис. 1-57. Электрофорез белков сыворотки крови здорового человека на бумаге.

- Под действием электрического поля макромолекулы белка в соответствии со своим суммарным зарядом и массой мигрируют в направлении катода или анода.
- Электрофорез проводят на носителях: бумаге, геле и т.д. Электрофорез на бумаге – скорость миграции белка зависит от заряда;
- Электрофорез в геле - скорость миграции зависит от молекулярной массы.
- Для обнаружения белковых фракций бумагу или гель обрабатывают красителем.
- Окрашенный комплекс белков выявляет расположение различных фракций на носителе.

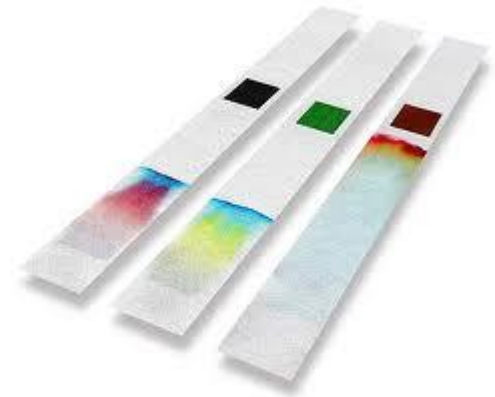
Электрофорез в полиакриламидном геле

- Предварительно белки денатурируют с тем, чтобы скорость миграции зависела только от молекулярной массы.
- Для этого анализируемую смесь обрабатывают додецилсульфатом натрия (ДСН), который представляет собой детергент с сильно выраженными амфифильными свойствами.
- Развернутые полипептидные цепи связывают ДСН и приобретают отрицательный заряд.
- Электрофорез проводят в тонком слое геля.
- После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.
- Фотография полиакриламидного геля, иллюстрирующая разделение белков по молекулярной массе.
Маркеры на левой дорожке.



Хроматография (от греч. χρῶμα — цвет)

- Хроматография — метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.
- В основу хроматографических методов положены разные принципы: гель- фильтрации, ионного обмена, адсорбции, биологического сродства.
- Классификация видов хроматографии по механизму взаимодействия:
- Распределительная хроматография
- Ионообменная хроматография
- Адсорбционная хроматография
- Аффинная хроматография
- Гель – фильтрация и др.

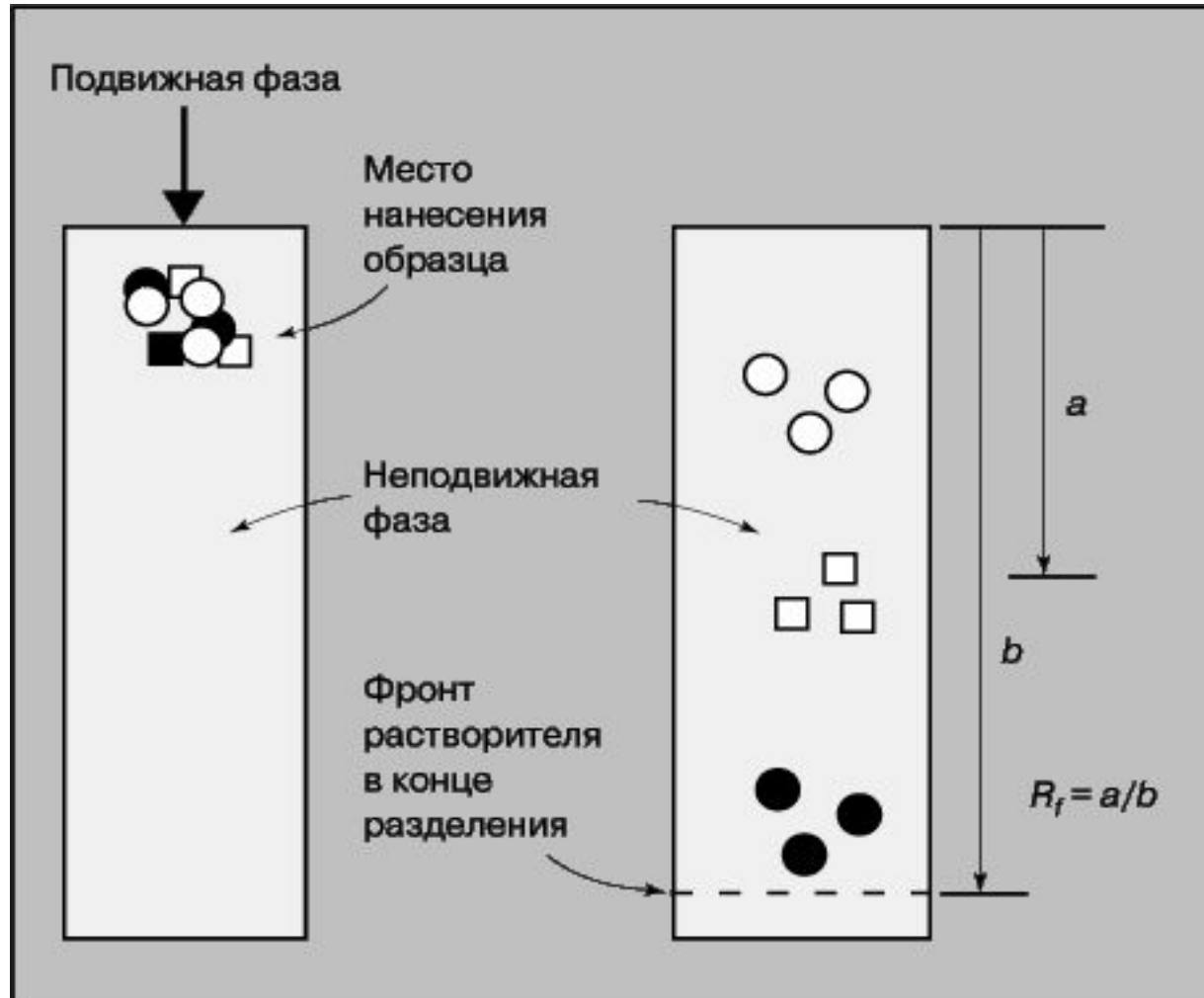




Распределительная хроматография

- Один из типов распределительной хроматографии Один из типов распределительной хроматографии осуществляется на колонках, в которых в качестве неподвижной фазы применяют влажный крахмал Один из типов распределительной хроматографии осуществляется на колонках, в которых в качестве неподвижной фазы применяют влажный крахмал или силикагель.
- Образец растворяют в подходящем растворителе Образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку. Разделяемые вещества Образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку. Разделяемые вещества, подвергающиеся многократному распределению между неподвижной стационарной фазой (водный слой) и движущейся фазой органического растворителя сrazной

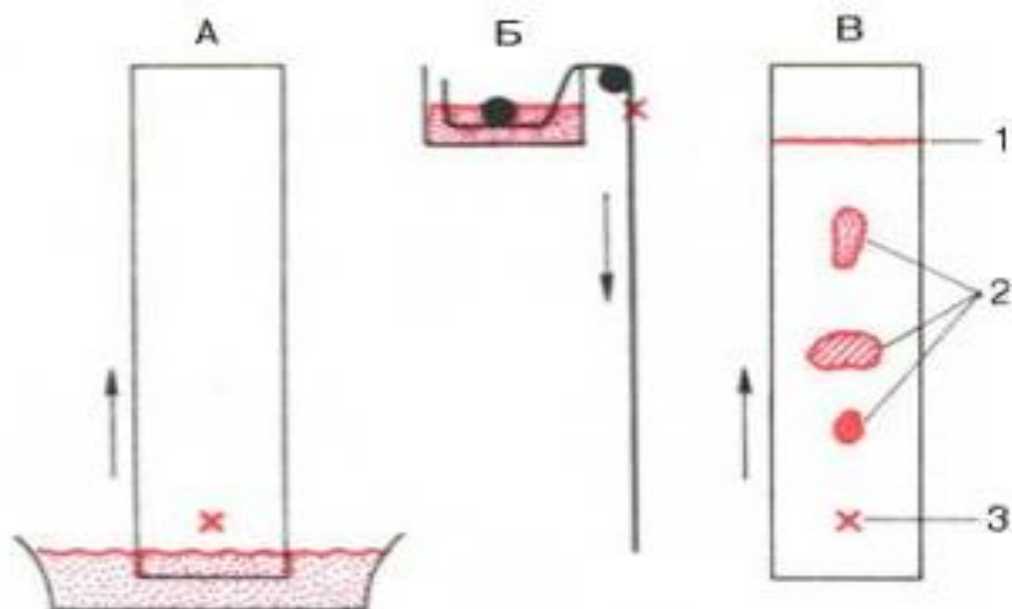
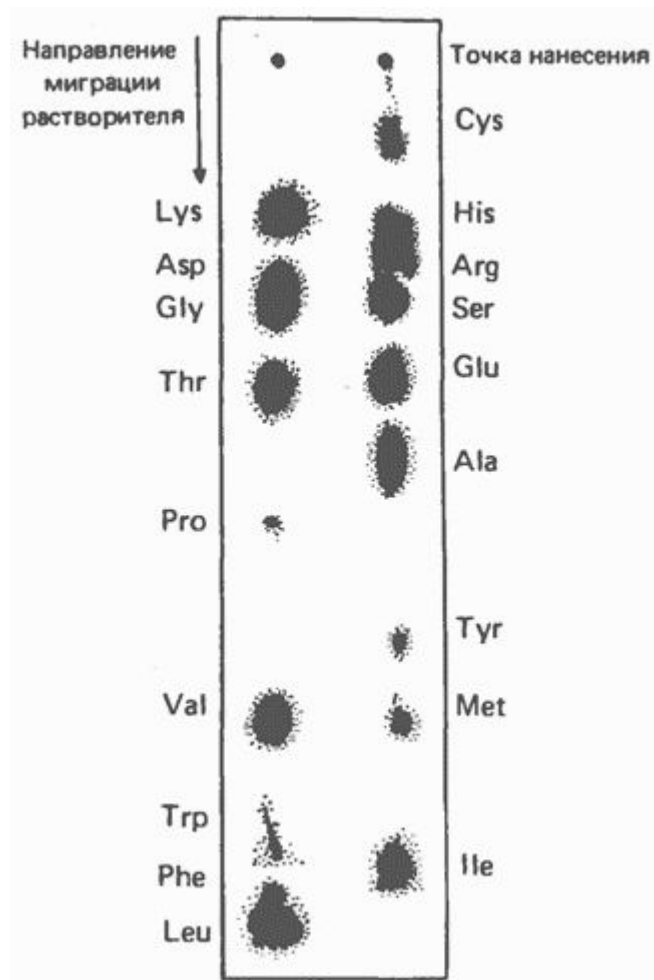
Распределительная хроматография



Распределительная хроматография на бумаге

- Разновидностью распределительной хроматографии является хроматография на бумаге. Она оказалась наиболее доступной для разделения аминокислот, отличающихся гидрофобностью радикалов.
- В качестве неподвижной фазы служит вода, а подвижной - смесь органических растворителей (например, бутанол-уксусная кислота-вода в определенных соотношениях).
- Образец помещают на одном конце бумажной полосы, этим же концом бумагу погружают в смесь, при движении растворителя по бумаге происходит разделение компонентов смеси.
- Хроматограмму проявляют и высушивают, а местоположение каждого из разделяемых веществ определяют химическими или физико-химическими методами.

Хроматография на бумаге



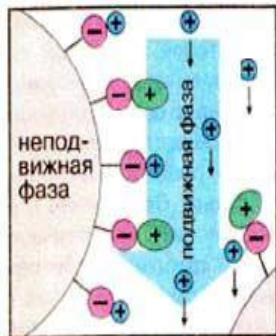
- А – восходящая хроматография;
- Б – нисходящая хроматография (вид сбоку);
- В – хроматограмма с разделенными и окрашенными веществами:
- 1 – фронт растворителя,
- 2 – разделенные вещества,
- 3 – место нанесения образца.

Ионообменная хроматография

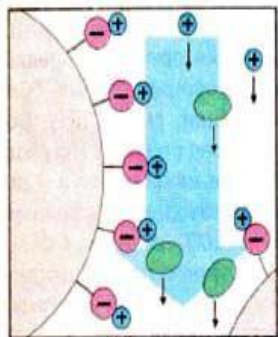
- Этот вариант хроматографии позволяет разделять ионы и полярные молекулы, на основании зарядов разделяемых молекул.
- Данный вид хроматографии позволяет разделить практически любые заряженные молекулы, в том числе: крупные — белки, малые — молекулы нуклеотидов и аминокислот.
- Неподвижная фаза имеет заряженные функциональные группы, которые взаимодействуют с анализируемыми ионизированными молекулами противоположного заряда. Этот вариант хроматографии классифицируется на два типа — катионную и анионную ионообменную хроматографию.

Ионообменная хроматография

1. Основы метода

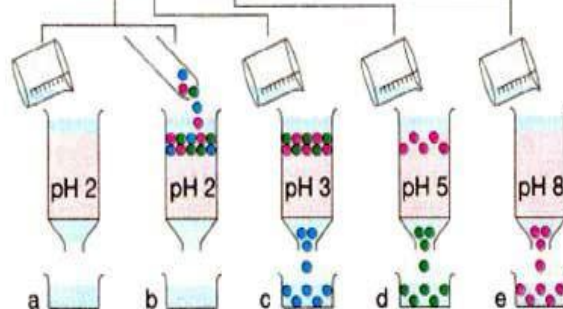
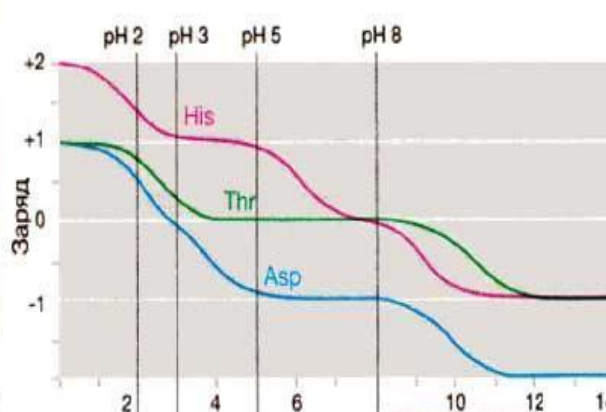


1а. Низкие значения pH



1б. Высокие значения pH

2. Графики диссоциации



3. Элюирование в ступенчатом градиенте pH

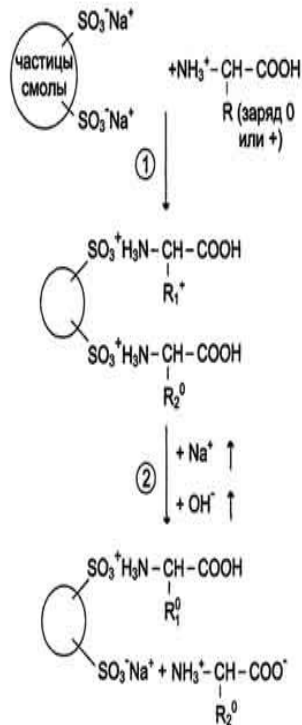
А. Ионообменная хроматография свободных аминокислот

- В зависимости от заряда разделяемых веществ используют подходящую ионообменную смолу, с функциональными группами которой обменивается и задерживается на колонке часть соединений, в то время как другие беспрепятственно элюируются с колонки.
- «Осажденные» на колонке вещества снимают с колонки, применяя более концентрированные солевые растворы или изменяя pH элюента.

Разделение аминокислот методом ионообменной хроматографии

- При разделении аминокислот методом ионообменной хроматографии в качестве *неподвижной фазы* используются гранулы полимера, несущие сульфогруппы (SO_3^-). Эти группы ионизированы во всем диапазоне pH и несут отрицательный заряд.
- Для подготовки к работе ионообменник помещают в колонку и промывают Na^+ -содержащим буферным раствором с pH 2. При этом сульфогруппа (красный цвет) связывает ионы натрия.
- Если теперь нанести на колонку раствор аминокислот (1а), то положительно заряженные аминокислоты (зеленый цвет) вытеснят ионы натрия и будут сорбированны на ионите.
- Поскольку аминокислоты не несут заряда в изоэлектрической точке, их элюируют с колонки буфером с более высоким значением pH (1б).
- В качестве примера приведен эксперимент (3) по разделению аспарагиновой кислоты, треонина и гистидина. Графики титрования (2) наглядно объясняют, почему три аминокислоты элюируются в указанной последовательности. Строго говоря, аминокислоты элюируются при величинах pH, значительно ниже изоэлектрических точек, поскольку за связывание с ионообменником конкурируют Na^+ -ионы буферного раствора.

- Смесь аминокислот разделяют в колонке с катионообменной смолой, которая содержит прочно связанные с ней отрицательно заряженные группы (например, остатки сульфоновой кислоты $-\text{SO}_3^-$), к которым присоединены ионы Na^+ .



В катионообменник вносят смесь аминокислот в кислой среде (рН 3,0), где аминокислоты в основном представляют катионы, т.е. несут положительный заряд. Положительно заряженные аминокислоты присоединяются к отрицательно заряженным частицам смолы. Чем больше суммарный заряд аминокислоты, тем прочнее её связь со смолой. Так, аминокислоты лизин, аргинин и гистидин наиболее прочно связываются с катионообменником, а аспарагиновая и глутаминовая кислоты - наиболее слабо.

Высвобождение аминокислот из колонки осуществляют вымыванием (элюированием) их буферным раствором с увеличением концентрации NaCl и рН. При увеличении рН аминокислоты теряют протон, в результате уменьшается их положительный заряд, а следовательно и прочность связи с отрицательно заряженными частицами смолы.

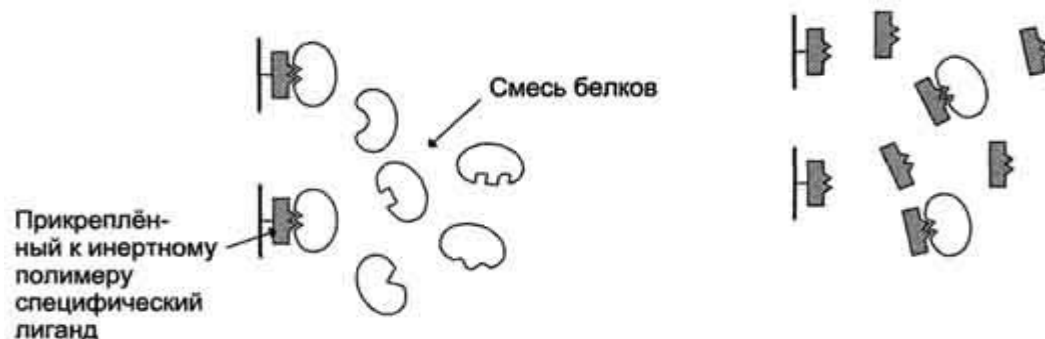
Каждая аминокислота выходит из колонки при определённом значении рН и ионной силы. Собирая с нижнего конца колонки раствор (элюат) в виде небольших порций, можно получить фракции, содержащие отдельные аминокислоты.

Адсорбционная хроматография.

- Разделение компонентов смеси (образца) основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте.
- В качестве адсорбентов В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия или кремния.
- Адсорбент Адсорбент в виде суспензии Адсорбент в виде суспензии с растворителем Адсорбент в виде суспензии с растворителем (чаще всего буферным раствором) вносят в колонку и равномерно в ней упаковывают.
- Образец в небольшом объеме растворителя Образец в небольшом объеме растворителя наносят на колонку – компоненты разделяемой смеси адсорбируются на

Аффинная хроматография

- Наиболее специфичный метод выделения индивидуальных белков, основанный на взаимодействии белков с лигандами, прикрепленными (иммобилизованными) к твердому носителю.
- В качестве лиганда может быть использован субстрат или кофермент. Через колонку, заполненную лигандом, пропускают смесь белков.
- К лиганду присоединяется только белок специфично взаимодействующий с ним, все остальные белки выходят с элюатом.
- Белок, адсорбированный на колонке, можно смыть раствором с измененным pH или ионной силы.



Гель - фильтрационная хроматография (ситовая, гель- проникающая)

- Разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы.
- При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (бóльшей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. В отличие от адсорбционной хроматографии, при гель-фильтрации стационарная фаза остается химически инертной и с разделяемыми веществами не взаимодействует.

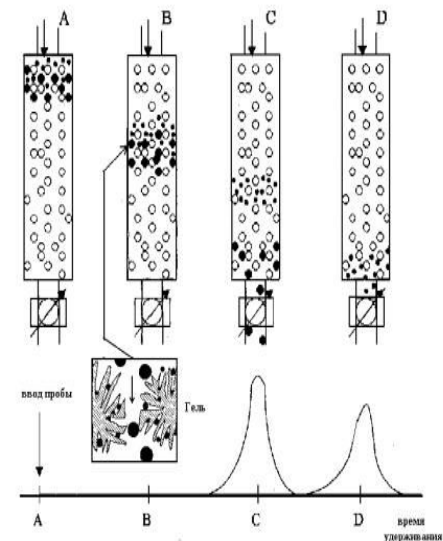
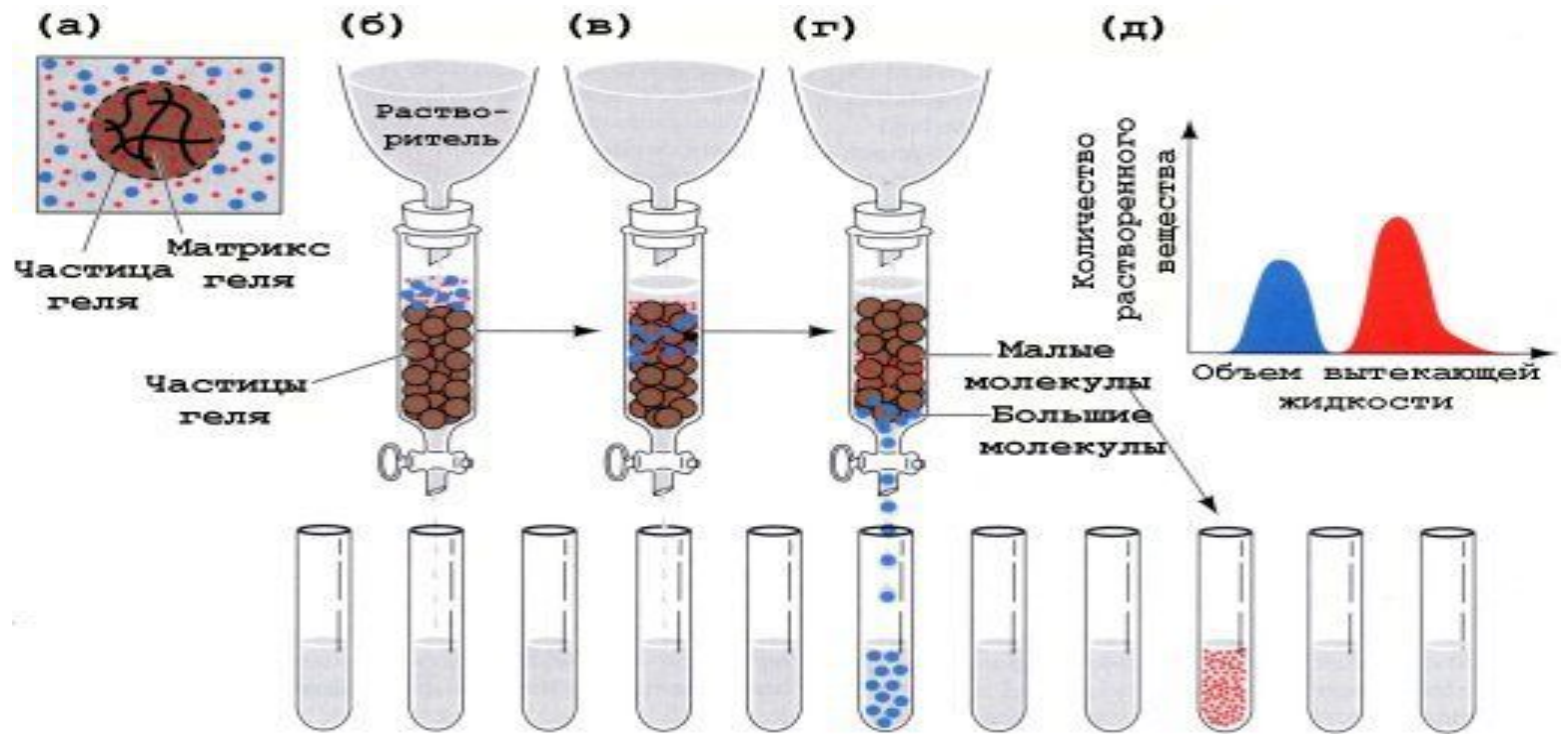


Рис. 1.20. Принцип разделения и детектирования пробы в эксклюзионной хроматографии. А – ввод образца; В – разделение по размерам; С – выход крупных макромолекул; D – выход мелких макромолекул

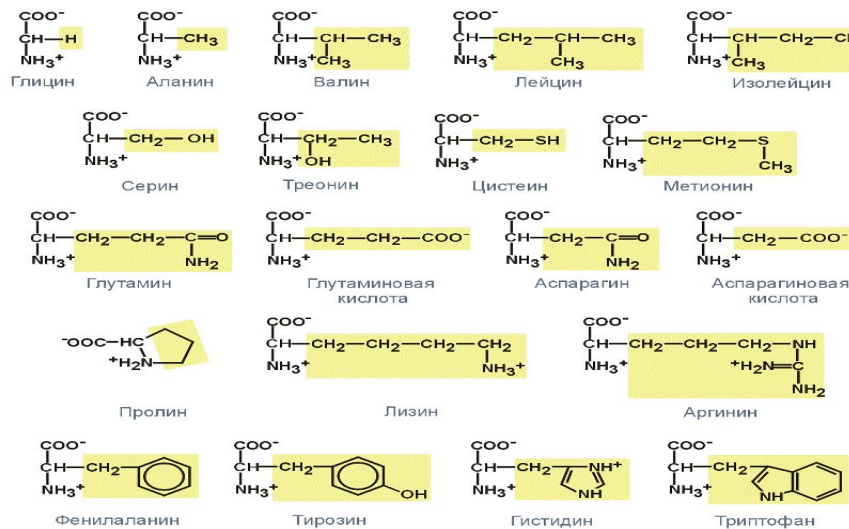
Гель-хроматография



- Хроматографическую колонку заполняют гранулами геля (сефадекса), который имеет поры определенной величины. В колонку вносят смесь белков. Белки, размер которых меньше, чем размер пор сефадекса, задерживаются в колонке, так как «застревают» в порах, а остальные свободно выходят из колонки. Размер белка зависит от его молекулярной массы.

Методы разделения АМК

- Ионнообменная хроматография
- Хроматография на бумаге
- Электрофорез



Какими методами можно разделить:

- **Гексапептид и белок** - по молекулярной массе или по заряду разными методами.
- **Альбумин и продукты его гидролиза** можно разделить по молекулярной массе и суммарному заряду (гель – фильтрацией, электрофорезом и ионообменной хроматографией).

• Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка высаливанием

- Называется процесс выделения белков из водных растворов нейтральными растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. При добавлении больших концентраций солей к раствору белка происходит дегидратация белковых частиц и снятие заряда; при этом белки выпадают в осадок.
- Степень выпадения белков в осадок зависит от ионной силы раствора осадителя, размера частиц белковой молекулы, величины ее заряда, гидрофильности. Разные белки осаждаются при различных концентрациях солей. Поэтому в осадках, полученных путем постепенного повышения концентрации солей, отдельные белки находятся в различных фракциях. Высаливание белков является обратимым процессом, и после удаления соли белок вновь приобретает природные свойства. Поэтому высаливанием пользуются в клинической практике при разделении белков сыворотки крови, а также при изолировании и очистке различных белков.
- Исследуемый материал: яичный белок.
- Реактивы: насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, измельченный порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 %-ный раствор NaOH , 1 %-ный раствор CuSO_4
- Ход работы.
- В пробирку наливают 20 капель неразведенного яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, содержимое перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, при этом выпадает осадок яичного глобулина. Через 5 мин осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другой белок – яичный альбумин. Для высаливания альбумина к фильтрату добавляют измельченный порошок сульфата аммония до полного насыщения, то есть до тех пор, пока не прекратится растворение соли. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают и с фильтратом проделывают биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белка.