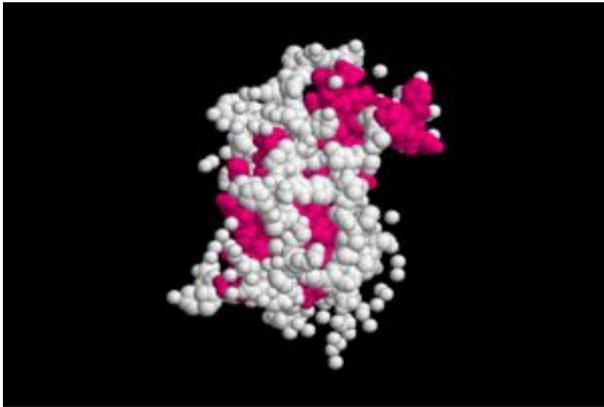


# БЕЛКИ

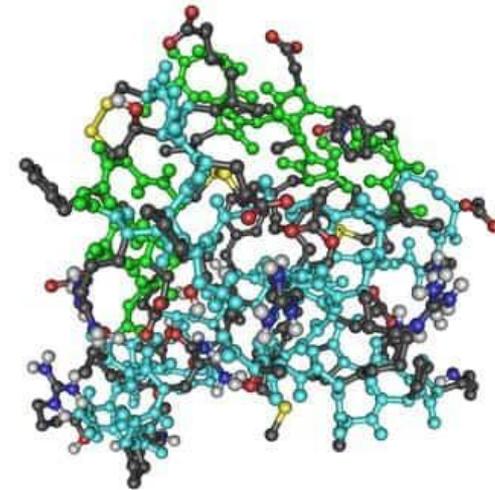
---

Белки (или белковые вещества) составляют основу и структуры и функции как одной клетки так многоклеточных живых организмов.



Соматропин – гормон роста, выделяемый гипофизом головного мозга.

Инсулин – гормон поджелудочной железы, ответственный за глюкозный обмен



# МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

Для подробного исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также для изучения их химического состава и структуры неизменным условием является получение белков из природных источников в химически чистом, гомогенном состоянии.

Последовательность операций по выделению белков обычно состоит в следующем: измельчение биологического материала (гомогенизация); извлечение белков, точнее, перевод белков в растворенное состояние (экстракция); выделение исследуемого белка из смеси других белков, т.е. очистка и получение индивидуального белка.

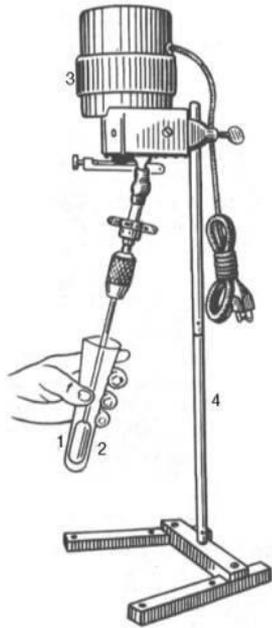
---

Белковые вещества весьма чувствительны к повышению температуры и действию многих химических реагентов (органические растворители, кислоты, щелочи). Поэтому обычные методы органической химии, применяемые для выделения того или иного вещества из смеси (нагревание, перегонка, возгонка, кристаллизация и др.), в данном случае неприемлемы. Белки в этих условиях подвергаются денатурации, то есть теряют некоторые существенные природные (нативные) свойства, в частности растворимость, биологическую активность. Разработаны эффективные методы выделения белков в «мягких» условиях, при низкой температуре (не выше 4° С), с применением щадящих нативную структуру химических реагентов.

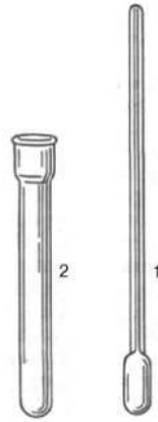
## ГОМОГЕНИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Перед выделением белков из биологических объектов (органы и ткани животных, микроорганизмы, растения) исследуемый материал тщательно измельчают до гомогенного состояния, т.е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры. Эту процедуру, называемую гомогенизацией. Проводят её при помощи ножевых гомогенизаторов типа Уорринга или пестикового гомогенизатора Поттера – Эльвегейма. Для выделения ряда белков из плотных животных и растительных объектов часто используют валковые или шаровые мельницы. Успешно применяется также метод попеременного замораживания и оттаивания ткани, в основе действия которого лежит разрушение клеточной оболочки, вызванное кристаллами льда.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ  
ГОМОГЕНИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

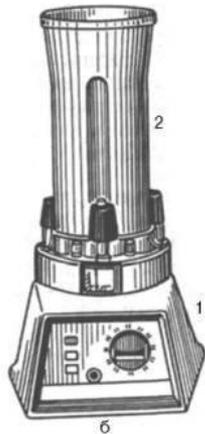


а

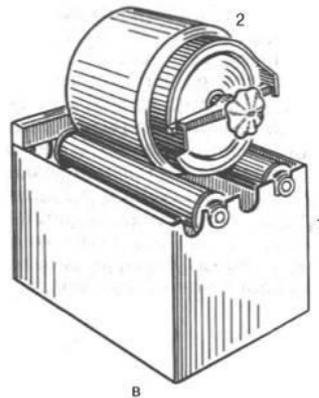


а – пестиковый ручной  
гомогенизатор: 1 – пестик; 2 –  
корпус; 3 – мотор; 4 – штатив;

б – механический гомогенизатор: 1  
– корпус с электродвигателем и  
пусковым устройством; 2 – камера  
для измельчения материала;



б



в

в – шаровая мельница: 1 – корпус с  
электродвигателем и пусковым  
устройством; 2 – камера для  
измельчения материала.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ  
ГОМОГЕНИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Для дезинтеграции тканей используют также ультразвук, пресс-методы (замороженный биоматериал пропускают через мельчайшие отверстия стального пресса под высоким давлением) и метод «азотной бомбы», при котором клетки (в частности, микробные) сначала насыщают азотом под высоким давлением, затем резко сбрасывают давление – выделяющийся газообразный азот как бы «взрывает» клетки.

---

## ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ

Современные методы измельчения тканей обычно сочетают с одновременной экстракцией белков из гомогенатов тканей.

Большинство белков тканей хорошо растворимо в 8 – 10%-ных растворах солей. При экстракции белков широко применяют различные буферные смеси с определенными значениями рН среды, органические растворители, а также неионные детергенты – вещества, разрушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами и между белковыми молекулами.

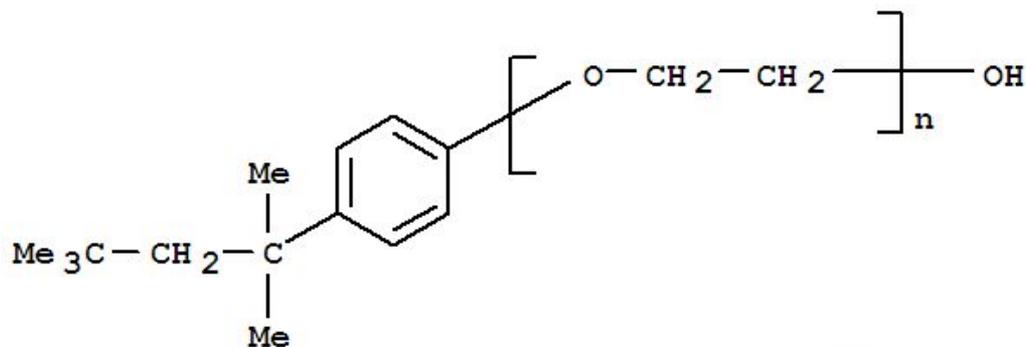
Из органических соединений широко используют растворы глицерина (давно) и слабые растворы сахарозы (особенно для солюбелизации). На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает рН среды, поэтому в белковой химии применяют фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси со значениями рН от кислых до слабощелочных, которые способствуют как растворению, так и стабилизации белков.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ  
ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ

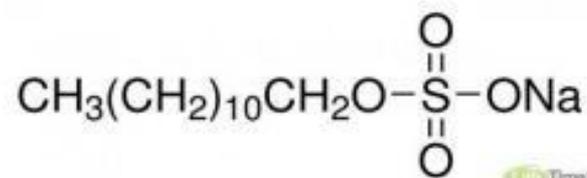
Особенно широкое распространение получили трис-буферные системы, представляющие собой смеси 0,2 М раствора трис-(оксиметил)-аминометана  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$  (сокращенно обозначают «трис») с 0,1 М раствором хлороводородной кислоты в разных соотношениях. Для выделения белков сыворотки крови используют способы их осаждения этанолом (метод Кона), ацетоном, бутанолом и их комбинации. Почти все органические растворители разрывают белок-липидные связи, способствуя лучшей экстракции белков.

Для получения из биологического материала белков в чистом, гомогенном, состоянии применяют различные детергенты, способствующие расщеплению белок-липидных комплексов и разрыву белок-белковых связей. В частности, для освобождения белков (ферментов), прочно связанных с биомембранами митохондрий или других субклеточных структур, применяют тритон X-100, додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия.

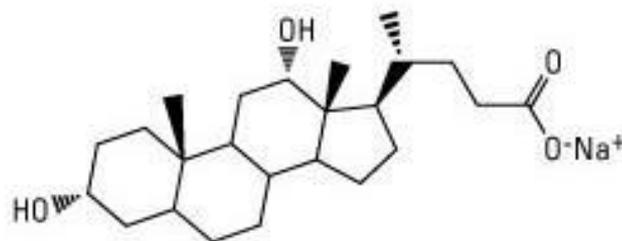
МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ  
ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ



тритон X-100



lab-time.all.biz



дезоксихолат натрия

додецилсульфат натрия

## Фракционирование и очистка белков

После достижения полной экстракции белков, то есть перевода белков в растворенное состояние, приступают к разделению – фракционированию смеси белков на индивидуальные белки. Для этого применяют разнообразные методы: высаливание, тепловую денатурацию, осаждение органическими растворителями, хроматографию, электрофорез, распределение в двухфазных системах, кристаллизацию и др.

---

Растворение белков в воде связано с гидратацией каждой молекулы, что приводит к образованию вокруг белковой глобулы водных (гидратных) оболочек, состоящих из ориентированных в определенной форме в пространстве молекул воды. По химическим и физическим свойствам вода, входящая в состав гидратной оболочки, отличается от чистого растворителя. В частности, температура замерзания ее составляет  $-40^{\circ}\text{C}$ . В этой воде хуже растворяются сахара, соли и другие вещества. Растворы белков отличаются крайней неустойчивостью, и под действием разнообразных факторов, нарушающих гидратацию, белки легко выпадают в осадок. Поэтому при добавлении к раствору белка любых водоотнимающих средств (спирт, ацетон, концентрированные растворы нейтральных солей щелочных металлов), а также под влиянием физических факторов (нагревание, облучение и др.) наблюдаются дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок.

**Высаливание.** При добавлении растворов солей щелочных и щелочноземельных металлов происходит осаждение белков из раствора. Обычно белок не теряет способности растворяться вновь в воде после удаления солей методами диализа или гельхроматографии. Высаливанием белков обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения и удаления балластных белков или выделения исследуемого фермента. Различные белки высаливаются из растворов при разных концентрациях нейтральных растворов сульфата аммония. Поэтому метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок при 50% насыщении) и альбуминов (выпадают при 100% насыщении).

На величину высаливания белков оказывают влияние не только природа и концентрация соли, но и рН среды и температура. Считают, что главную роль при этом играет валентность ионов. Действие разных ионов принято сравнивать не по молярной концентрации соли, а по так называемой ионной силе ( $\mu$ ), которая равна половине суммы произведений концентрации каждого иона ( $c$ ) на квадрат его валентности ( $V$ ):

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c \cdot V^2$$

Методы выделения и очистки белков  
Фракционирование и очистка белков

Более тонкое разделение белков плазмы крови человека на фракции достигается при использовании различных концентраций этанола при низкой температуре (от  $-3$  до  $-5^{\circ}\text{C}$ ) по методу Кона. В этих условиях белки сохраняют свои нативные свойства. Указанным методом часто пользуются для получения отдельных фракций крови, используемых в качестве кровезаменителей.

В последнее время наибольшее распространение получили хроматографические и электрофоретические методы разделения белков.



Диаграмма фракционирования белков плазмы крови человека этаноном (по методу Кона).

## **Хроматография.**

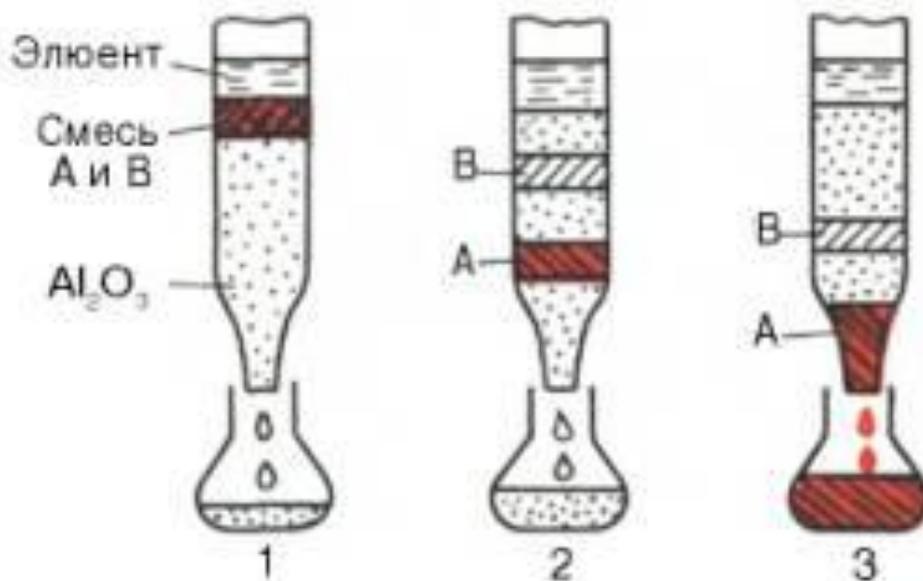
Принцип хроматографии, разработанный в 1903 г. русским ученым М. С. Цветом, основан на способности пигментов (или любых других окрашенных и неокрашенных веществ) специфически адсорбироваться на адсорбенте, заключенном в колонке.

В результате происходит разделение анализируемых веществ и их концентрирование в строго определенном слое адсорбента. Затем через колонку пропускают подходящие элюенты, которые ослабляют силы адсорбции и выносят с током раствора индивидуальные вещества. Последние последовательно собирают в коллекторе фракций (принцип сорбции-десорбции).

Чрезвычайно эффективным средством фракционирования белков из смеси оказалась колоночная хроматография с гидроксилпатитом, различными ионообменными смолами и производными целлюлозы в качестве носителей. При выделении и очистке белков используют четыре основных типа хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную и аффинную (хроматография по сродству) – в соответствии с разными физическими и химическими механизмами, лежащими в основе каждого из них. Хроматография широко применяется не только для выделения белков, но и для разделения множества других органических и неорганических веществ, входящих в состав живых организмов.

Адсорбционная хроматография. Разделение компонентов смеси (образца) основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте. В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия или кремния. Адсорбент в виде суспензии с растворителем (чаще всего буферным раствором) вносят в стеклянную вертикальную трубку (колонку) и равномерно в ней упаковывают. Образец в небольшом объеме растворителя наносят на колонку — аппаратура рассматривается в практических руководствах по биохимии).

Методы выделения и очистки белков  
Фракционирование и очистка белков



Абсорбционная хроматография (схема). Разделение двух разных веществ (А и В), перемещающихся по колонке с разной скоростью.

1 - нанесение образца на колонку; 2 - середина опыта; 3 - окончание опыта.

Компоненты разделяемой смеси адсорбируются на адсорбенте. Затем приступают к стадии освобождения – десорбции компонентов из колонки, применяя подходящие элюенты. Сбор фракций осуществляют при помощи автоматического коллектора фракций.

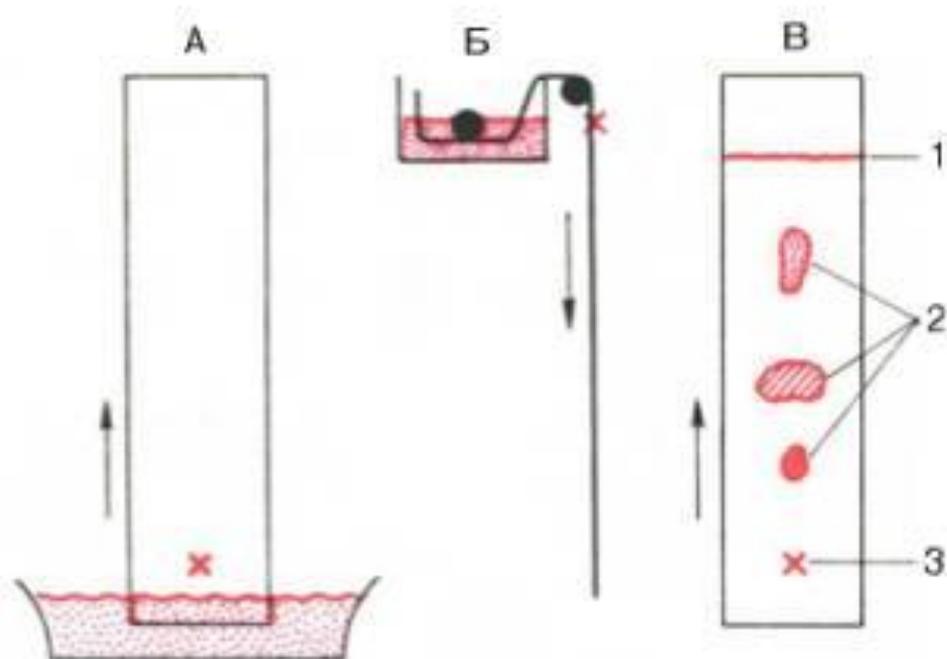
---

## Распределительная хроматография.

В отличие от адсорбционной твердая фаза служит только опорой (основой) для стационарной жидкой фазы. Один из типов распределительной хроматографии, как и адсорбционная, осуществляется на колонках, в которых в качестве стационарной фазы применяют влажный крахмал или силикагель. Образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку; разделяемые вещества, подвергаясь многократному распределению между неподвижной стационарной фазой (водный слой) и движущейся фазой органического растворителя, с разной скоростью перемещаются ко дну колонки. Собранные при помощи коллектора фракции пробы, содержащие одно вещество, соединяют для выделения этого вещества в чистом виде.

Разновидностью распределительной хроматографии является хроматография на бумаге, широко используемая в биохимических лабораториях, в том числе клинических, для разделения пептидов, аминокислот и других веществ. В качестве стационарной фазы при этом служит вода, адсорбированная целлюлозными цепями фильтровальной бумаги. Образец помещают на одном конце бумажной полосы, этим же концом бумагу погружают в подходящую смесь органических растворителей (например, бутанол–уксусная кислота–вода в определенных соотношениях). При движении растворителя по бумаге благодаря силе капиллярности происходит разделение компонентов смеси. Проявленную хроматограмму высушивают, а местоположение каждого из разделяемых веществ определяют химическими или физико-химическими методами.

Методы выделения и очистки белков  
Фракционирование и очистка белков



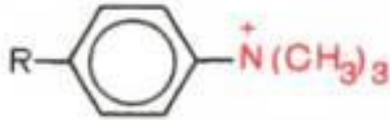
Хроматография на бумаге (схема).

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.

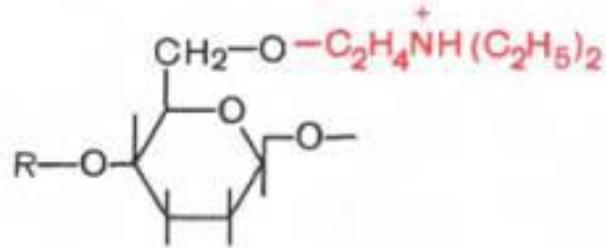
## Ионообменная хроматография.

Ионообменные смолы являются полимерными органическими соединениями, содержащими функциональные группы, способные вовлекаться в ионный обмен. Различают положительно заряженные анионообменники, представленные органическими основаниями и аминами, и отрицательно заряженные катионообменники, содержащие фенольные, сульфонили карбоксильные группы. Из сильно- и слабоосновных анионообменников чаще используют производные полистирола и целлюлозы, несущие функциональные группы:

---



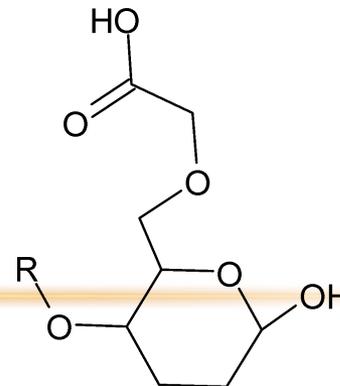
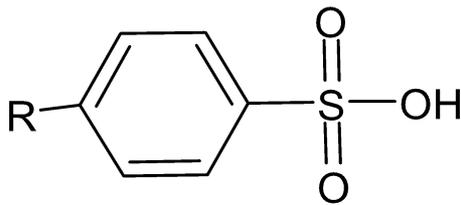
Триметиламинополистирол



Диэтиламиноэтилцеллюлоза  
(ДЭАЭ-целлюлоза)

Аналогичные функциональные группы содержат триэтиламиноэтил (ТЭАЭ)- и аминоэтил (АЭ)-целлюлозы.

Катионообменники представлены сульфонируемыми полистиролами (производные винилбензола или дивинилбензола) и карбоксиметилцеллюлозой, имеющими следующие функциональные группы:



Методы выделения и очистки белков  
Фракционирование и очистка белков

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

Новейшие методы ионообменной хроматографии, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), широко используются в фармакологии (при создании и определении лекарственных веществ), в клинической биохимии (при определении биологически активных веществ в физиологических жидкостях), в биотехнологических процессах и производствах и других областях: они позволяют определять вещества в нано-, пико- и фемтограммных количествах.

## Аффинная хроматография (хроматография по сродству).

Основана на принципе избирательного взаимодействия белков (или других макромолекул) с закрепленными (иммобилизованными) на носителе специфическими веществами – лигандами, которыми могут быть субстраты или коферменты (когда выделяют какой-либо фермент), антигены (или антитела), гормоны или рецепторы и т. д. Благодаря высокой специфичности белков к иммобилизованному лиганду, связанному с носителем (которым заполняют хроматографическую колонку), присоединяется только один какой-либо белок из смеси.

Снятие с колонки этого белка осуществляют элюированием буферными смесями с измененным рН или измененной ионной силой, а также введением в состав элюента детергентов, ослабляющих связи между белками и лигандами. Несомненным достоинством метода является возможность одноэтапно выделить заданный белок или другой биополимер высокой степени чистоты. При помощи аффинной хроматографии, например, удалось сравнительно легко выделить очищенные препараты аминокетил-тРНК-синтетаз на полиакрилгидридагаровом геле, к которому в качестве лигандов были присоединены определенные тРНК (транспортные РНК).

Гель-хроматография. В препаративных целях, особенно при очистке белков от примесей, широко используют метод молекулярных сит, или гель-хроматографию. При обработке эпихлоргидрином полисахарида декстрана образуются различной степени выраженности поперечные связи, приводящие к формированию крупных гидрофильных зерен, нерастворимых в воде и называемых сефадексами. Благодаря большому сродству к воде зерна сильно набухают в водной среде с образованием геля, которым заполняют хроматографическую колонку. Разделение веществ этим методом основано на том, что большие молекулы не проникают во внутреннюю водную фазу геля, являющуюся стационарной, и остаются снаружи, двигаясь вместе с подвижной фазой вниз вдоль колонки; небольшие молекулы, напротив, свободно диффундируют внутрь зерен, образуя равновесную систему между подвижной и стационарной фазами, и соответственно с меньшей скоростью двигаются вдоль колонки.

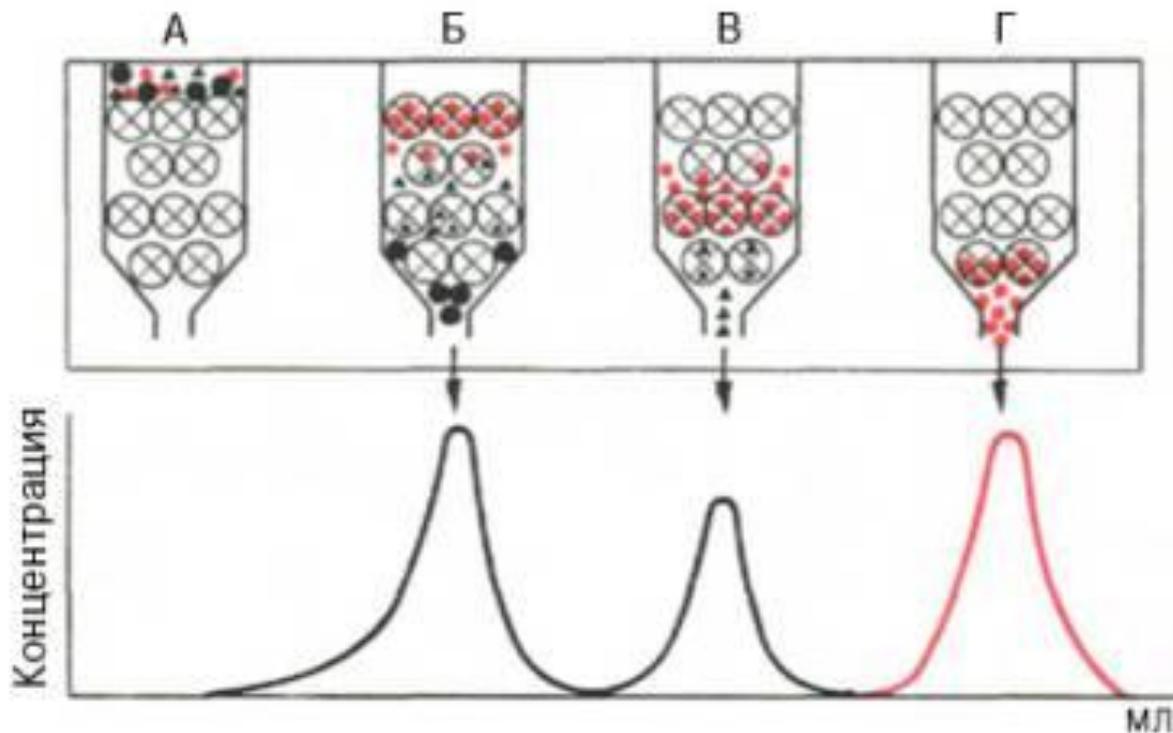
Обычно момент появления веществ в вытекающем из колонки с сефадексом элюенте выражают формулой:  $V = V_0 + KV_i$

где  $V$  – объем элюирующей жидкости вещества с данным  $K$ , мл;  
 $V_0$  – свободный объем колонки или общий объем внешнего растворителя (вне зерен геля), мл;  $V_i$  – объем растворителя внутри геля, мл;  $K$  – коэффициент распределения для растворенного вещества между растворителем внутри зерен геля и окружающим растворителем. Если анализируемую пробу, содержащую одно растворенное вещество с  $K = 1$  и второе с  $K = 0$ , внести в колонку с сефадексом, то второе вещество появится в элюирующей жидкости сразу после выхода из колонки  $V_0$ , а первое – только после выхода объема  $V_0 + V_i$ .

Поскольку молекулы белков, обладающие большими молекулярной массой и размерами, не диффундируют внутрь зерен сефадекса, они первыми вымываются из колонки после выхода свободного объема колонки  $V_0$ , в то время как все остальные вещества (включая низкомолекулярные примеси) вымываются после выхода объема, равного  $V_0 + K \cdot V_i$ .

Метод нашел широкое применение в препаративной энзимологии. С помощью сефадекса можно разделить белки с разной молекулярной массой.

Методы выделения и очистки белков  
Фракционирование и очистка белков



Гель-хроматография на колонке с сефадексом (схема).

Большие светлые кружки с крестиками - зерна сефадекса; малые черные и красные кружки и треугольники - белки с различной молекулярной массой; А - колонка в начале работы; Б, В, Г - колонка в различные периоды времени. На графике элюции четко видно разделение белковых компонентов.

**Электрофорез.** Метод свободного электрофореза, детально разработанный лауреатом Нобелевской премии А. Тизелиусом, основан на различии в скорости движения (подвижности) белков в электрическом поле, которая определяется величиной заряда белка при определенных значениях рН и ионной силы раствора. В последнее время более широкое распространение получили методы зонального электрофореза белков на различных носителях, в частности на твердых поддерживающих средах: гелях крахмала и полиакриламида, целлюлозе. Преимущества их по сравнению с методом свободного электрофореза состоят в том, что исключается размывание границы белок-растворитель в результате диффузии и конвекции, не требуется налаживания сложной аппаратуры для определения положения границы, а для анализа необходимо небольшое количество белка (подробно эти методы и соответствующая аппаратура рассматриваются в практических руководствах по биохимии).

Одним из наиболее распространенных методов фракционирования белков (как и методов оценки гомогенности) является диск-электрофорез (от английского discontinuous – прерывистый, перемежающийся) в полиакриламидном геле, при котором используют пары буферных растворов с различными значениями рН и разной степени пористости геля. Следует отметить высокую разрешающую способность гель-электрофореза. Если при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге открываются всего 6 фракций, то при электролизе в крахмальном геле – 10, а в полиакриламидном геле – до 18 разных белковых фракций.

Для выявления белков при электрофорезе в гелях их обрабатывают одним из следующих красителей: бромфеноловым синим, амидо черным 10В, кислотным синим 83, кумасси бриллиантовым голубым R-250 и др. Интенсивность окраски и соответственно относительное содержание каждой белковой фракции обычно определяют денситометрически путем прямого сканирования на денситометре. В последние годы стали применять методы электрофореза белков с градиентом концентрации геля, что значительно повышает разрешающую способность, особенно при фракционировании белков с высокой молекулярной массой, превышающей 50000–100000.

Весьма перспективными методами разделения белков (как и определения ряда физико-химических свойств) оказались разные варианты метода **изоэлектрического фокусирования** – изотахофореза, основанные на проведении электрофореза в поддерживающих средах (на колонке или в тонком слое) с градиентом рН. Точное местоположение на колонке каждого белка из смеси определяется значением его изоэлектрической точки, то есть состоянием, при котором суммарный электрический заряд белковой частицы при данном значении рН равен нулю. При использовании метода изоэлектрического фокусирования применяют смеси синтетических полиаминополикарбоновых кислот (амфолины) для создания градиента рН в диапазоне от 3,0 до 10,0.

В последние годы широкое распространение для фракционирования белков получили различные сочетания изоэлектрофокусирования и диск-электрофореза в полиакриламидном геле – методы двухмерного электрофореза, которые позволяют параллельно анализировать сотни и даже тысячи белковых фракций.

## **Очистка белков от низкомолекулярных примесей**

Применение в определенной последовательности ряда перечисленных методов позволяет получить белок в очищенном состоянии, не лишенный, однако, некоторых примесей солей. Для полного освобождения белков от низкомолекулярных примесей в настоящее время используют методы диализа, гельхроматографии, кристаллизации, ультрафильтрации.

При диализе применяют полупроницаемые мембраны (целлофан, коллодийная пленка), диаметр пор которых варьирует в широких пределах. Белки, как правило, не диффундируют через такую мембрану, в то время как низкомолекулярные вещества легко проникают через нее в окружающую среду.

Методы выделения и очистки белков  
Фракционирование и очистка белков  
Очистка белков от низкомолекулярных примесей

Метод кристаллизации белков основан на достижении критической точки начала осаждения белка из раствора сульфата аммония при медленном повышении температуры. Уже получены сотни кристаллических белков. Однако не всякий кристаллический белок является гомогенным, поскольку при одной и той же концентрации раствора сульфата аммония могут кристаллизоваться близкие по размерам и массе разные белки.

Наилучшие результаты при освобождении белков от низкомолекулярных примесей получают с помощью гельхроматографии и ультрафильтрации. Последняя основана на продавливании растворов белка через специальные мембраны, задерживающие белковые молекулы, что позволяет не только освободить белковые растворы от низкомолекулярных примесей, но и концентрировать их.