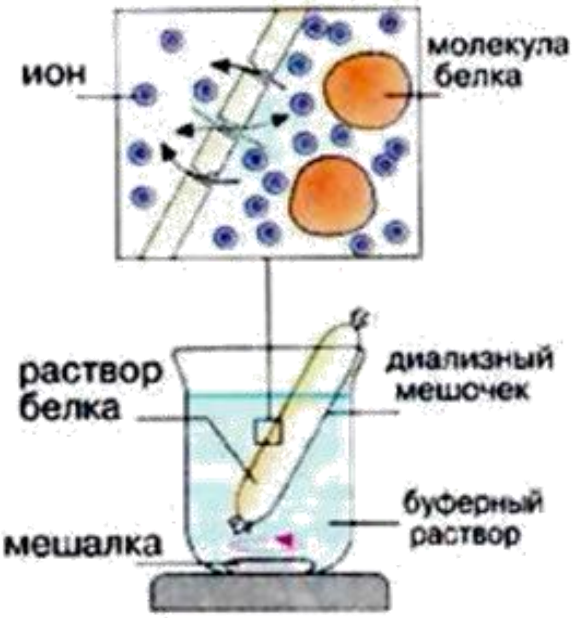
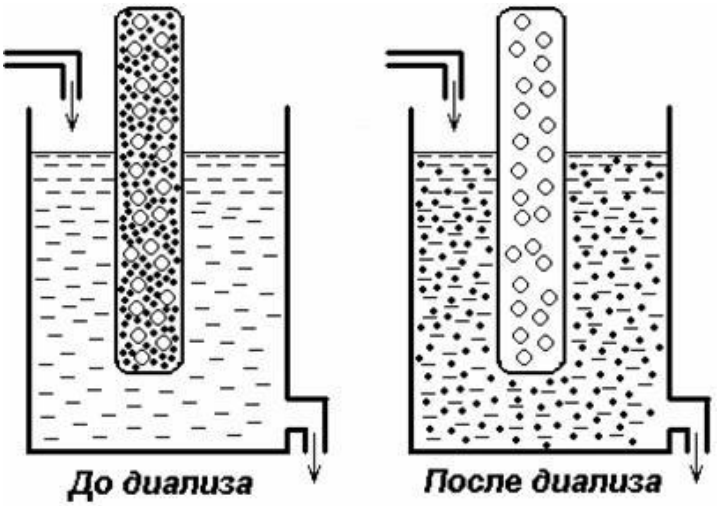
Тема: Виділення, очистка, розділення білків

Діаліз





Для відділення низькомолекулярних домішок або заміни складу середовища використовують діаліз. Метод заснований на тому, що молекули білка через свої розміри не можуть проходити через напівпроникні мембрани, в той час як низькомолекулярні речовини рівномірно розподіляються між обсягом, обмеженим мембраною, і оточуючим розчином. При діалізі застосовують напівпроникні мембрани (целофан, колоїдна плівка), діаметр пор яких варіює в широких межах. У лабораторії підлягаючий діалізу розчин білка поміщають в мішок з целофану та занурюють останній в посудину з водою. Безперервний потік води через посудину призводить до повного переходу в нього всіх проходять через целофан речовин, а білки залишаються всередині.

Центрифугування

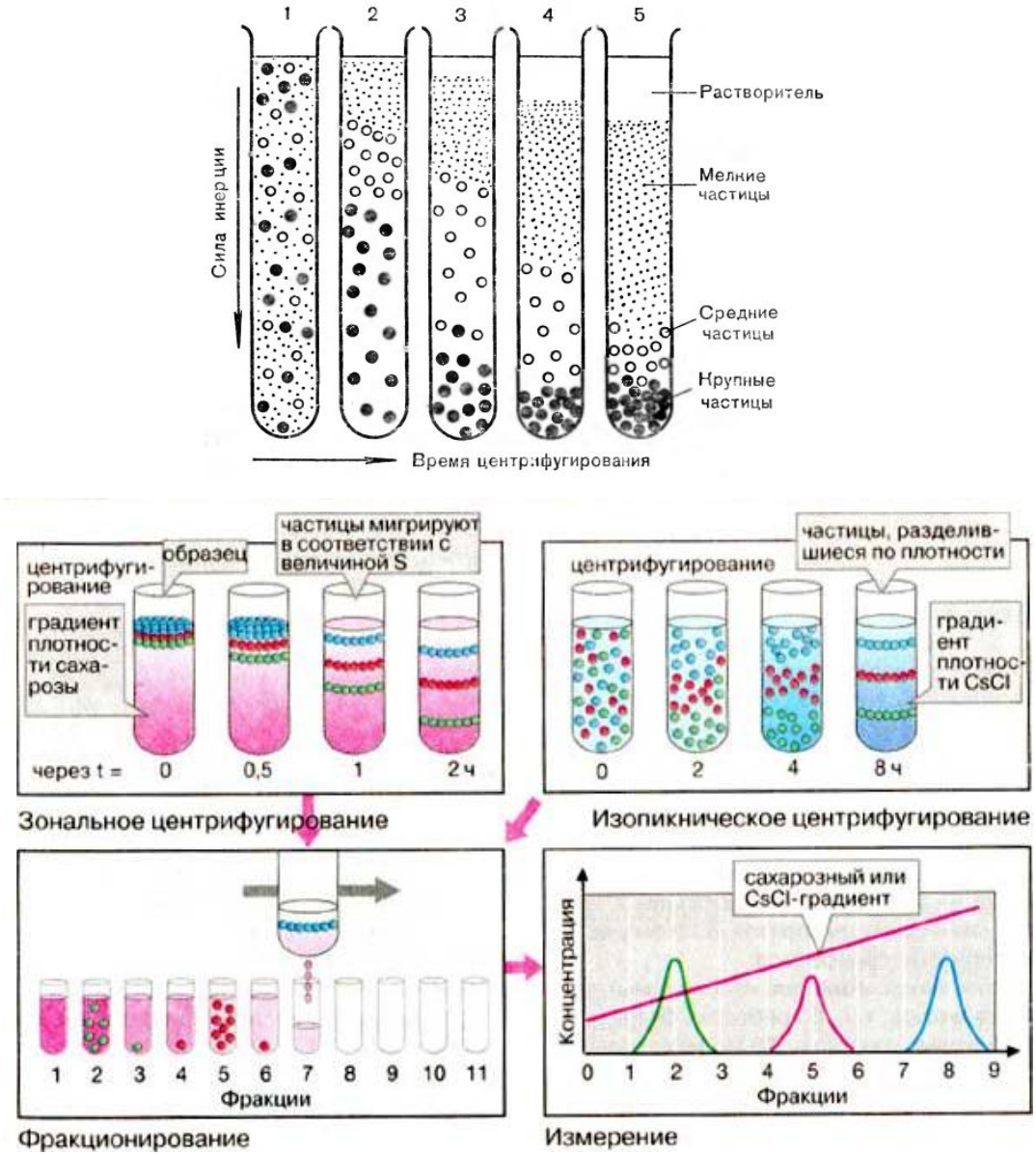


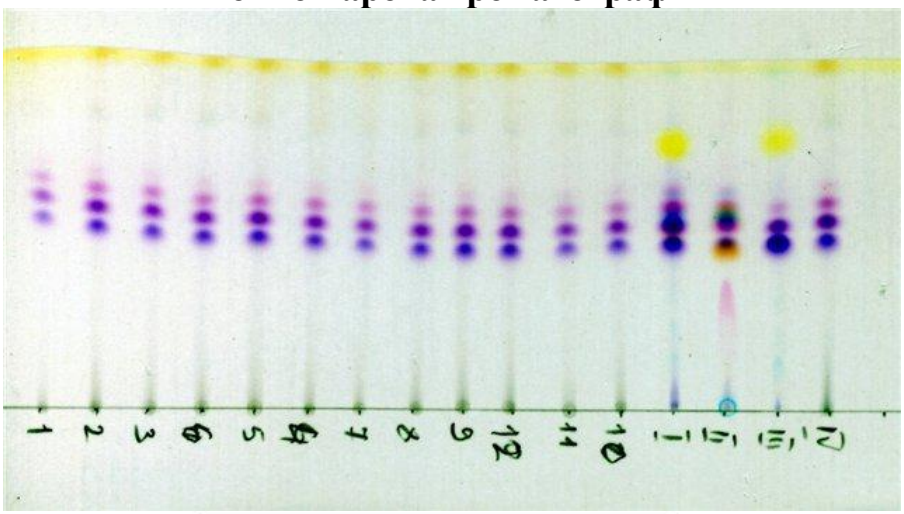
Рис.2: Центрифугування в градієнті густини.

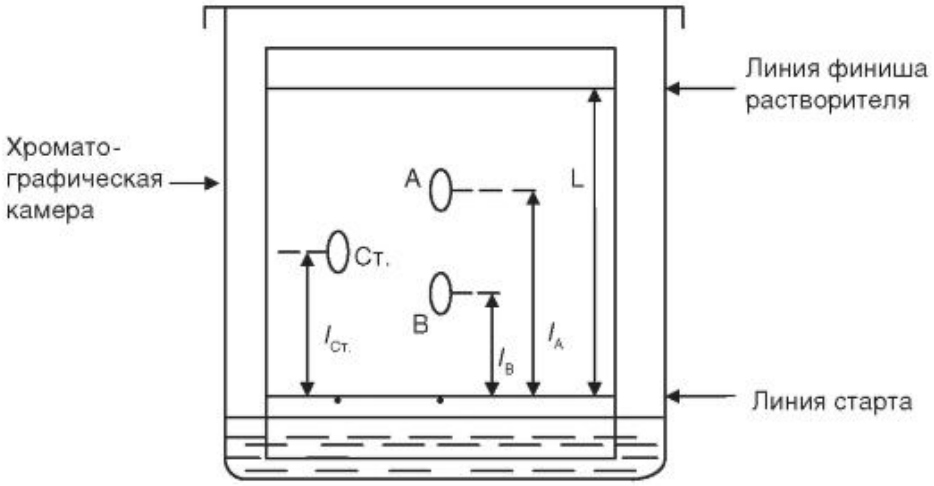
Частинки в розчині осідають або спливають в залежності від густини розчину. Чим більше різниця, тим швидше йде розподіл часток. Коли густина частинок і розчину однакові, частки лишаються нерухомими. При малої різниці частинки можна розділити в центрифузі, яка створює відцентрову силу, що у багато разів перевищує силу земного тяжіння. Для цих цілей використовуються два методи центрифугування.

При зональному центрифугуванні аналізуюча проба нашаровується тонким шаром поверх буферного розчину. У процесі центрифугування частинки проходять через розчин. Центрифугування припиняють перш, ніж частинки досягнуть дна. Потім його проколюють і збирають ряд фракцій.

При ізопікничному центрифугуванні пробу (наприклад ДНК, РНК або віруси) рівномірно розподіляють у всьому об'ємі розчину (зазвичай CsCl). З часом кожна частка потрапляє в область, відповідну її власної плавучої щільності. Центрифугування припиняють, коли встановлюється рівновага.

Тонкошарова хроматографія





Хроматографія — метод розділення, очищення, аналізу і фізико-хімічного дослідження речовин. Він ґрунтується на різниці у швидкості розподілу досліджуваних речовин між двома контактуючими фазами, одна з яких частіше нерухома (сорбент із розвиненою поверхнею), а друга має постійний напрямок руху (елюент). Потік рухомої фази (газу чи рідини) фільтрується через шар сорбенту або переміщається вздовж нього.

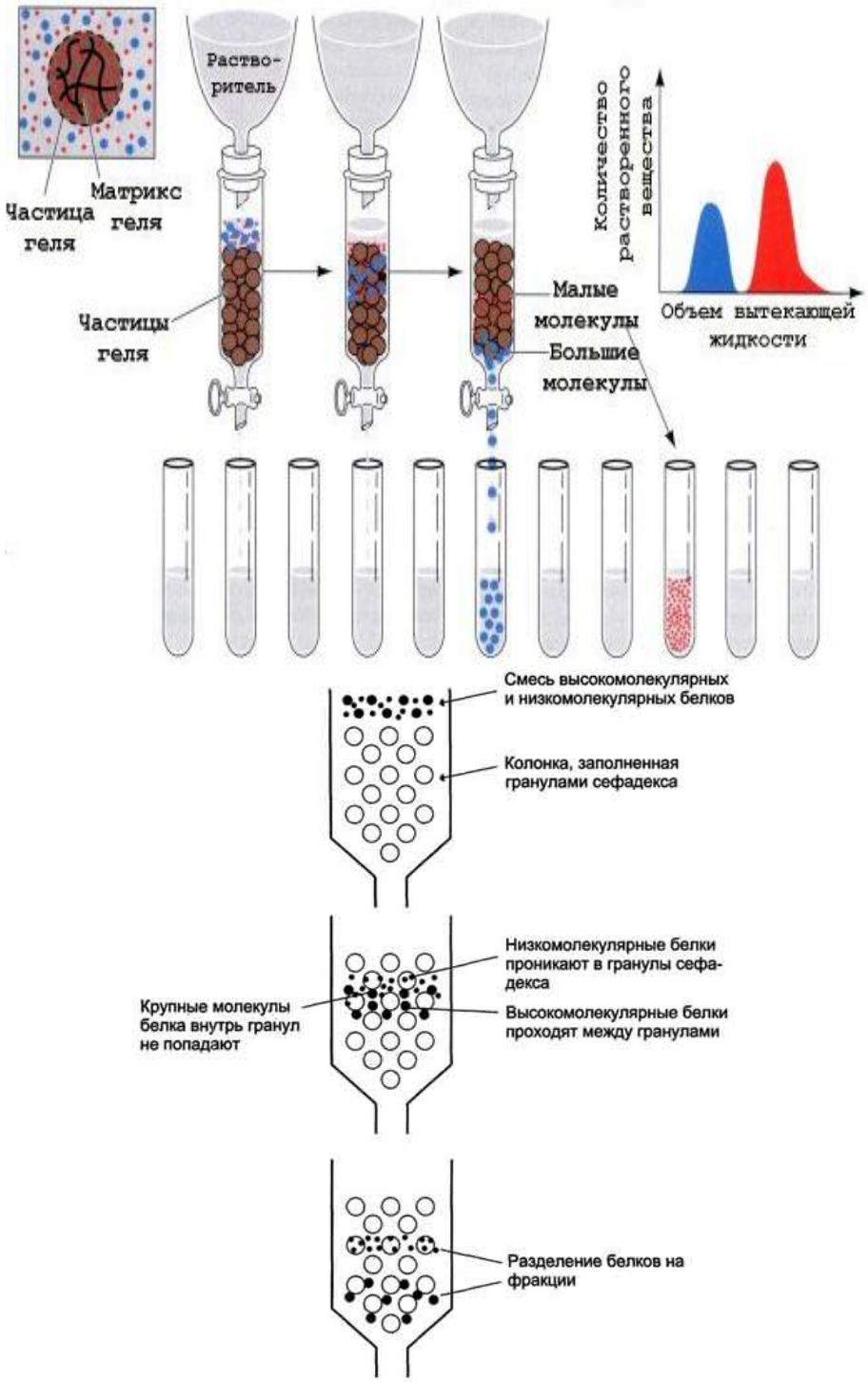
Аналітична Тонкошарова хроматографія широко застосовується в органічній хімії для поточного аналізу сумішей (сумарний час експерименту 2-10хв). Нерухомою фазою служить силікагель нанесений на пластинку (найчастіше товсту алюмінієву фольгу). Як рухому фазу застосовують органічні розчинник.

Важливою характеристикою ступеня поділу досліджуваних сполук у хроматографії є величина R_f - відношення відстані від центру плями до лінії старту до відстані, пройденого розчинником від лінії старту до фінішу.

$$R_f = L_i/L$$

Величина R_f є характеристикою природи досліджуваного з'єднання і залежить від сорбенту, розчинника, використовуваних для розділення. Для надійності ідентифікації речовин при визначенні R_f часто використовують "свідки". Для цього на папері разом з розділяємою сумішшю речовин хроматографують стандартні речовини ("свідки").

Гель-хроматографія



Гель-хроматографія - різновид хроматографії, в ході якої молекули речовин поділяються за розміром за рахунок їх різної здатності проникати в пори нерухомої фази. Гель-проникаюча хроматографія (гель-фільтрація) дозволяє розділяти білки за розміром і формою молекул. Поділ проводять в хроматографічних колонках, заповнених сферичними частинками набряклого гелю (розміром 10-500 мкм) з полімерних матеріалів. Частинки гелю проникні завдяки внутрішнім каналам, які характеризуються певним середнім діаметром. Суміш білків вносять в колонку з гелем і елюірують буферним розчином. Білкові молекули, не здатні проникати в гранули гелю (позначені синім кольором), будуть переміщатися з високою швидкістю. Середні і невеликі білки (червоного кольору) будуть в тій чи іншій мірі утримуватися гранулами гелю. На виході колонки елюат збирають у вигляді окремих фракцій. Обсяг виходу того чи іншого білка залежить в основному від його молекулярної маси.

Іонно-обмінна хроматографія

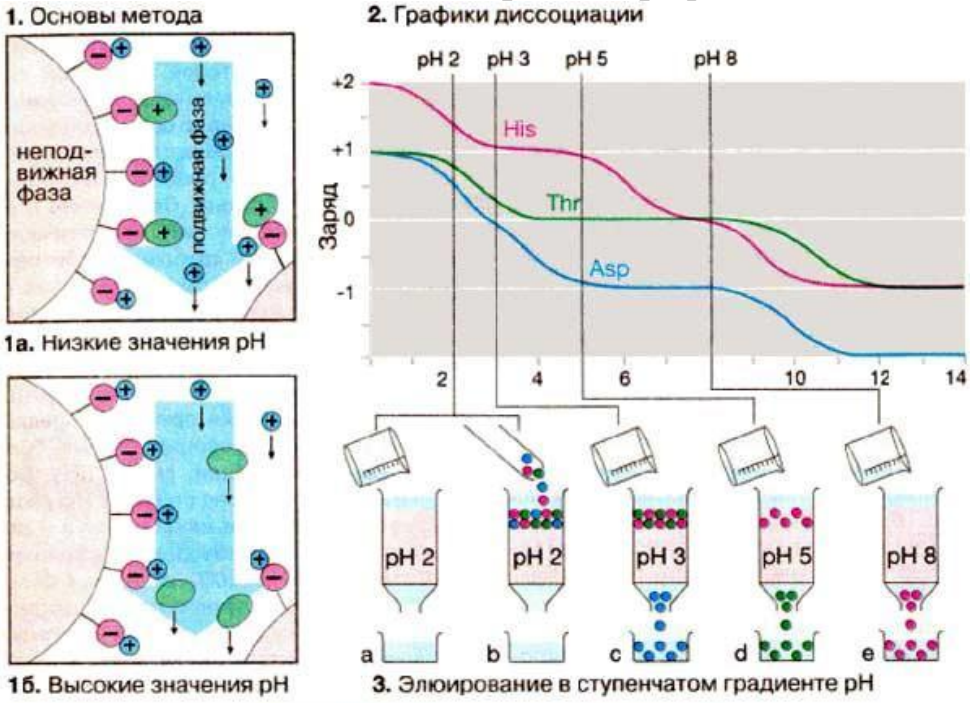


Рис.1. Приклад поділу амінокислот, що мають різний заряд.

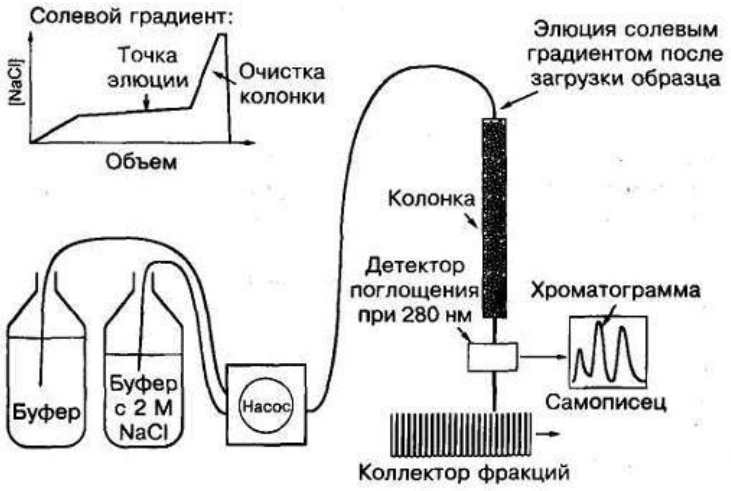
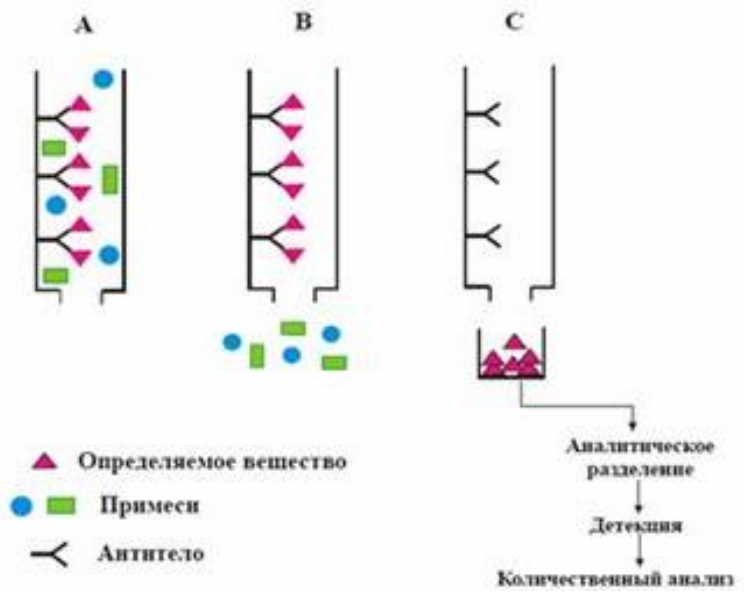


Рис. 3 Типова установка іоно-обмінної рідинної хроматографії для очищення білків. Після завантаження зразка насос створює сольовий градієнт для елюції зразка.

Іонообмінна хроматографія дозволяє розділити молекули, грунтуючись на іонних взаємодіях. Нерухома фаза має заряджені функціональні групи, які взаємодіють з аналізованими іонізованими молекулами протилежного заряду. Цей варіант хроматографії класифікується на два типи - катіоно та аніоно іонообмінну хроматографію.

Даний вид хроматографії дозволяє розділити практично будь заряджені молекули, у тому числі: великі - білки, малі-молекули нуклеотидів і амінокислот. Часто іонообмінну хроматографію використовують як перший етап очищення білків.

Афінна хроматографія



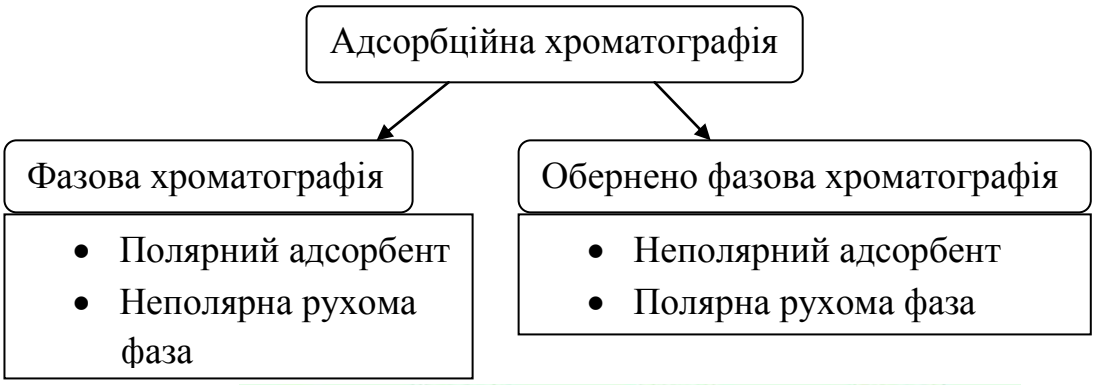
Це найбільш специфічний метод виділення індивідуальних білків, заснований на виборчій взаємодії білків з лігандами, прикріпленими (іммобілізованими) до твердого носія. В якості ліганду може бути використаний субстрат або кофермент, якщо виділяють будь фермент, антигени для виділення антитіл і т.д. Через колонку, заповнену іммобілізованим лігандом, пропускають розчин, що містить суміш білків. До ліганду приєднується тільки білок, специфічно взаємодіє з ним; всі інші білки виходять з елюатом.

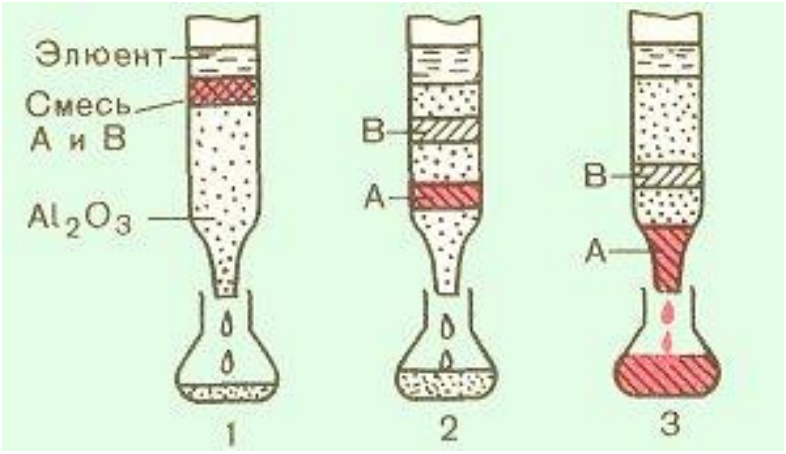
Білок, адсорбований на колонці, можна зняти, промивши її розчином зі зміненим значенням pH або зміненої іонною силою. У деяких випадках використовують розчин детергенту, що розриває гідрофобні зв'язки між білком і лігандом.

Афінна хроматографія відрізняється високою вибірковістю і допомагає очистити білок в тисячі разів. Процес розділення речовин з використанням АХ включає декілька самостійних етапів:

- вибір матриці для АХ та її активація;
- іммобілізація на поверхні активованої матриці біологічно активних сполук, які називаються афінними лігандами, в якості яких можуть бути білки, пептиди, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, вітаміни, амінокислоти і т.д .;
- хроматографічний аналіз, у процесі якого і відбувається специфічне і оборотне комплексоутворення афіанта з певною біологічно активною сполукою;
- і, нарешті, руйнування утворився комплексу та елюювання специфічно адсорбованого речовини.

Адсорбційна хроматографія





У нормально-фазової хроматографії нерухома фаза - полярна (найчастіше силікагель), а рухлива фаза - неполярна (гексан, або суміші гексану з більш полярними органічними розчинниками - хлороформом, спиртами і т.д.).

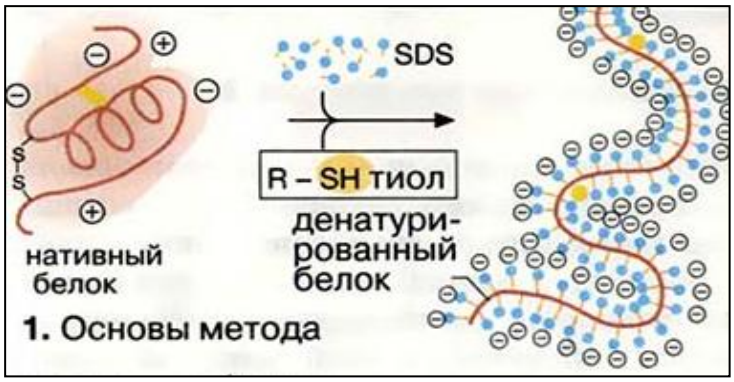
Утримування речовин зростає із збільшенням їх полярності. Поділу компонентів досягають, міняючи елюруючу силу рухомої фази, яка залежить від енергії взаємодії компонентів рухомої фази з поверхнею нерухомої фази. У нормально-фазової хроматографії елюіруюча здатність рухомої фази збільшується з ростом її полярності.

У обернено-фазової хроматографії нерухома фаза – неполярна (гідрофобні силікагелі з прищепленими групами C_8, C_{18}); рухома фаза – полярна (суміші води і полярних розчинників: ацетонітрилу, метанолу, тетрагидрофурана та ін.). Утримування речовин зростає із збільшенням їх гідрофобності (неполярні). Найменшою елюіруючу здатність має вода, а для підвищення елюіруючої здібності в рухомій фазі вводять ацетонітрил, метанол та інші розчинники. Чим більше вміст органічного розчинника, тим вище елюіруюча здатність рухомої фази.

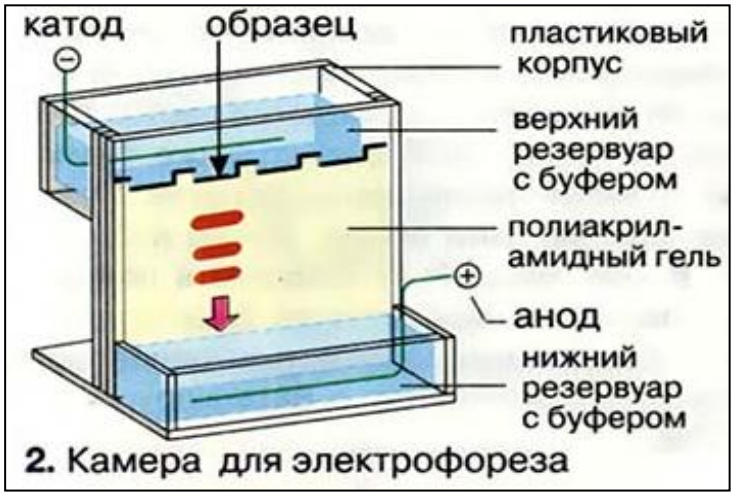
Часто застосовують не окремі розчинники, а їх суміші. Незначні кількості доданих інших розчинників, особливо води, істотним чином збільшують елюіруючу силу елюента. При поділі багатокомпонентних сумішей одна рухома фаза як елюент може не розділити всі компоненти проби за досить оптимальний час. Тоді використовують метод ступеневої або градієнтного елюювання. Для збільшення сили елюента в процесі хроматографування послідовно застосовують все більш сильні елюентом. Це дозволяє елюіровать все більш сильно утримувані речовини за менший час.

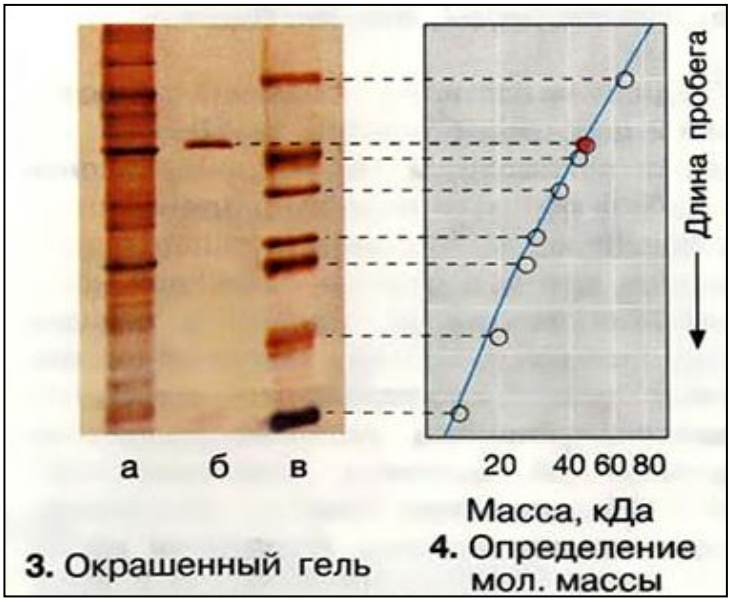
Електрофорез

В даний час електрофорез в поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфату натрію є загальноприйнятим методом визначення гомогенності білкових препаратів. Метод заснований на властивості заряджених частинок (молекул) переміщатися під дією електричного поля. Зазвичай швидкість міграції залежить від трьох параметрів аналізованих білків: величини молекул, форми молекул і сумарного заряду. Тому попередньо білки денатурують з тим, щоб швидкість міграції залежала тільки від молекулярної маси. Для цього аналізуючу суміш обробляють додецілсульфатом натрію (ДСН, $C_{12}H_{25}OSO_3Na$), який являє собою детергент з сильно вираженими амфіфільними властивостями. Під дією ДСН олігомерні білки дисоціюють на субодиниці і денатурують. Розгорнуті поліпептидні ланцюги пов'язують ДСН і набувають негативний заряд. Для повної денатурації в середу додають Меркаптани, які розщеплюють дисульфідні містки (1).



Електрофорез проводять у тонкому шарі поліакриламіду (2).





Після завершення електрофорезу, зони білків виявляють с допомогою барвника, як приклад на схемі (3) наведена електрофореграма трьох препаратів: клітинного екстракту, що містить сотні білків (а); виділеного з екстракту гомогенного білка (б); контрольної суміші білків з відомими молекулярними масами (в).

1. Діаліз проводиться для:
   А. Вирівняти реакційноздатні групи білків
   Б. Отримати ізоферменти
   В. Відділити білки від низькомолекулярних солей
   Г. Контроль та стандартизація білків

2. Які з перерахованих фізико-хімічних властивостей білків є основою для їх розділення методом електрофорезу?
   А. Гідратація молекул
   Б. Молекулярна маса
   В. Заряд молекул
   Г. Властивість адсорбуватися на носії.

3. Властивість молекули білка, що через свої розміри не можуть проходити через напівпроникні мембрани, використовується в:
   А. Центрифугуванні
   Б. Діалізі
   В. Іонно-обмінній хроматографії
   Г. Адсорбційній хроматографії

4. Гель-проникаюча хроматографія (гель-фільтрація) дозволяє розділяти білки за:
   А. Розміром і формою молекул
   Б. Зарядом молекул
   В. Назвою
   Г. Полярністю/неполярністю

5. При малої різниці частинки можна розділити в … (назва приладу), яка створює відцентрову силу, що у багато разів перевищує силу земного тяжіння.
   А. Камері для електрофорезу
   Б. Хроматографічній колонці
   В. Мішку з целофану, поміщеному в посудині з водою
   Г. Центрифузі

Діаліз проводиться для:
Вирівняти реакційноздатні групи білків
Отримати ізоферменти
Відділити білки від низькомолекулярних солей
Контроль та стандартизація білків

Які з перерахованих фізико-хімічних властивостей білків є основою для їх розділення методом електрофорезу?
Гідратація молекул
Молекулярна маса
Заряд молекул
Властивість адсорбуватися на носії.

Властивість молекули білка, що через свої розміри не можуть проходити через напівпроникні мембрани, використовується в:
Центрифугуванні

Діалізі
Іонно-обмінній хроматографії
Адсорбційній хроматографії

Гель-проникаюча хроматографія (гель-фільтрація) дозволяє розділяти білки за:
Розміром і формою молекул
Зарядом молекул
Назвою
Полярністю/неполярністю

При малої різниці частинки можна розділити в … (назва приладу), яка створює відцентрову силу, що у багато разів перевищує силу земного тяжіння.
Камері для електрофорезу
Хроматографічній колонці
Мішку з целофану, поміщеному в посудині з водою
Центрифузі