

Етапи виділення білків:

1. Виділення органу
2. Подрібнення (гомогенізація) та екстракція білків
3. Утворення суміші білків (гомогенату)
4. Проведення розподільного ультрацентрифугування

Розділення білків:

А. Проведення розділення білків

Грубе розділення:

- висалювання
- діаліз
- гель-фільтрація (гель-хроматографія)
- ізоелектричне осадження

Тонке розділення:

- електрофорез в ПААГ (поліакриламідному гелі)
- електрофорез в ПААГ з ДДС-На (натрію додецилсульфат)
- ультрацентрифугування
- тонкошарова хроматографія
- ізоелектрофокусування

Б. Виділення індивідуальних білків:

- іонно-обмінна хроматографія
- афінна хроматографія

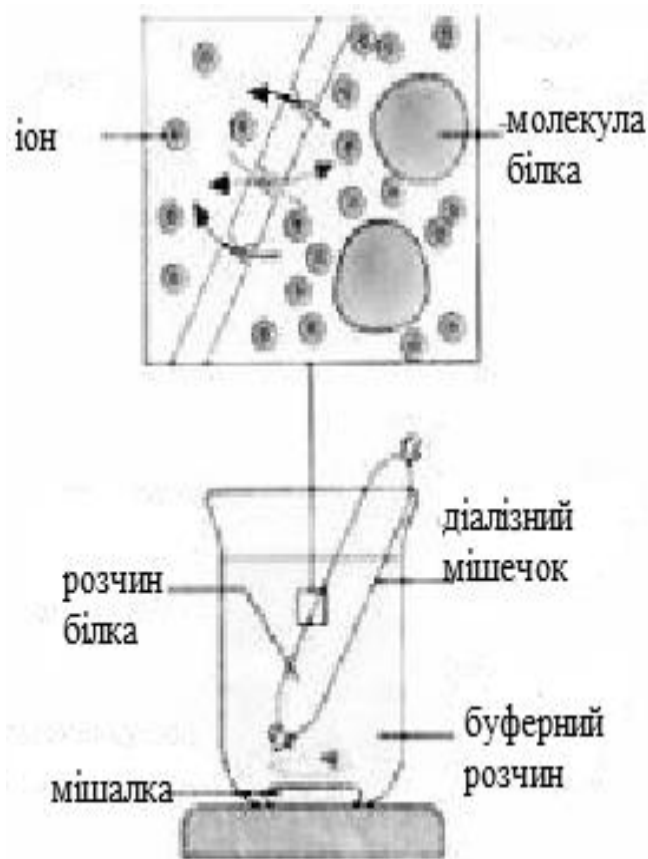


Рисунок 1 – Діаліз

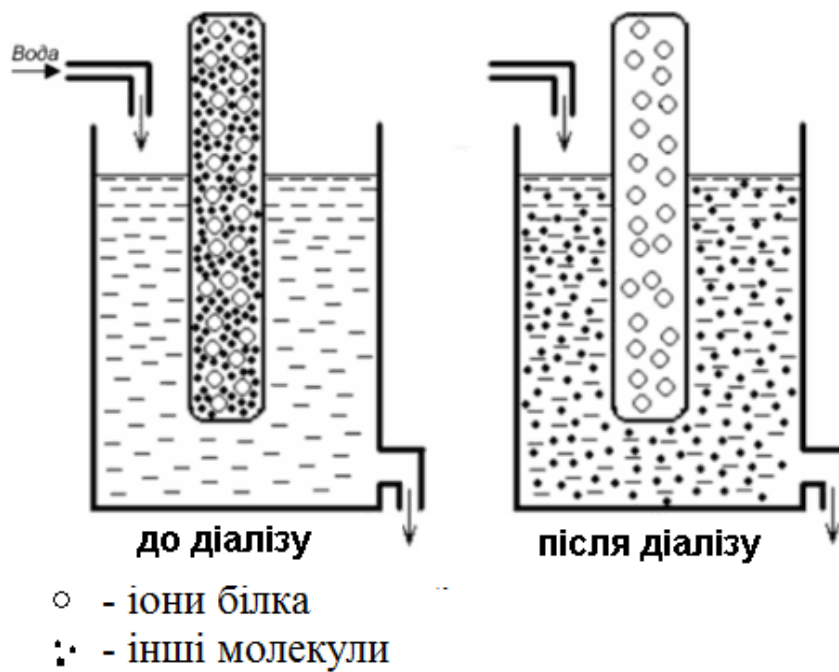


Рисунок 2 – Схема очищення суміші білків шляхом діалізу

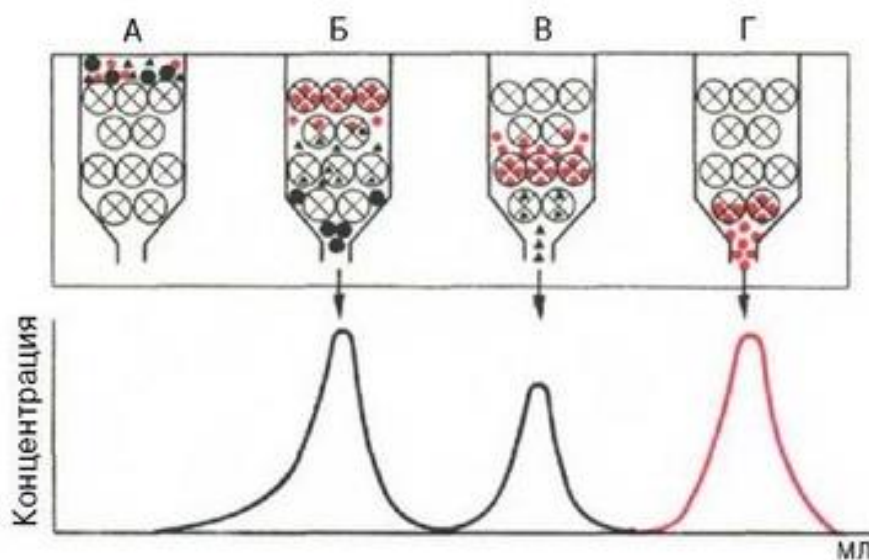


Рисунок 2 – Гель-хроматографія на колонці з сефадексом: великі світлі чашки з хрестиками – зерна сефадексу; малі чорні та червоні чашки та трикутники – білки з різною молекулярною масою; А – колонка на початку роботи; Б, В, Г – колонка в різні періоди часу. На графіку видно чітке розділення білкових компонентів

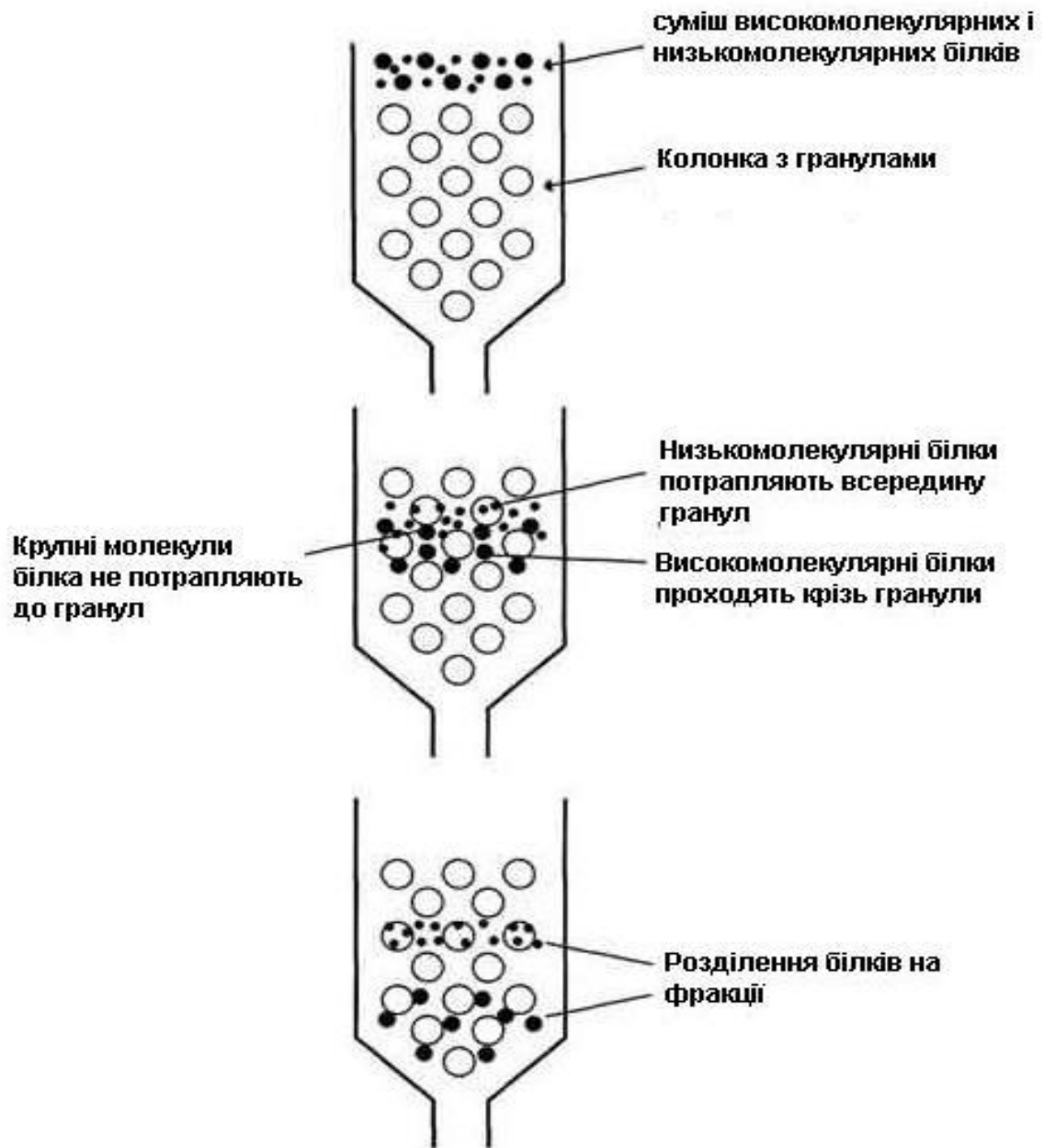


Рисунок 2 – Схема розділення білків шляхом гелі-фільтрації

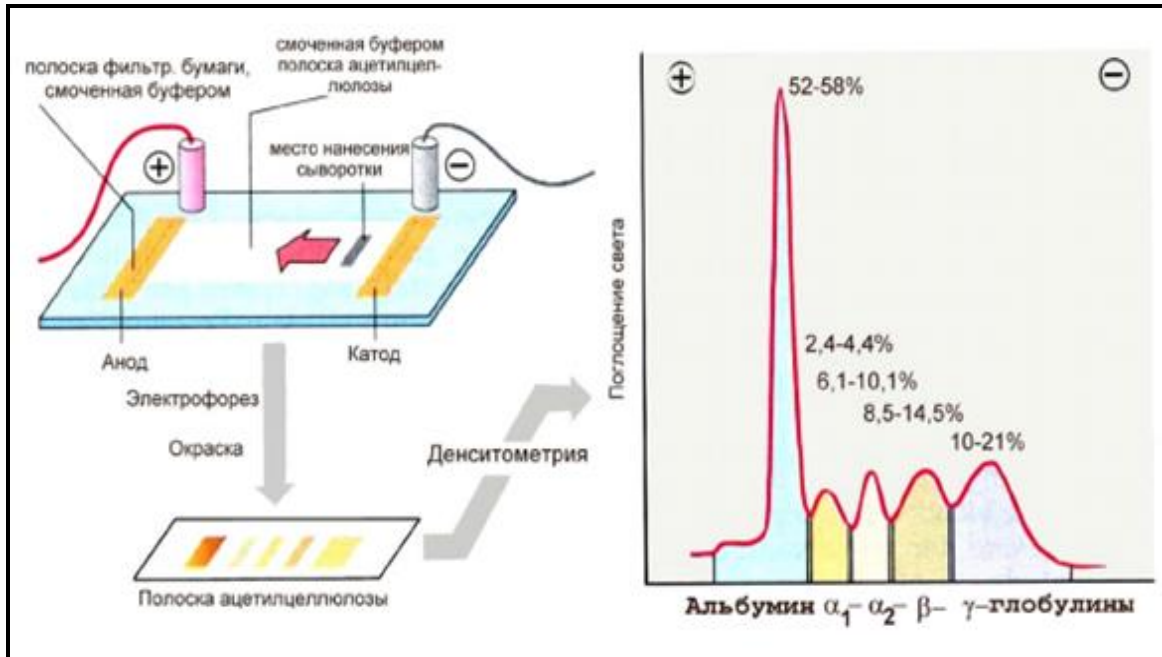


Рисунок 3 – Электрофорез белков сыворотки крови

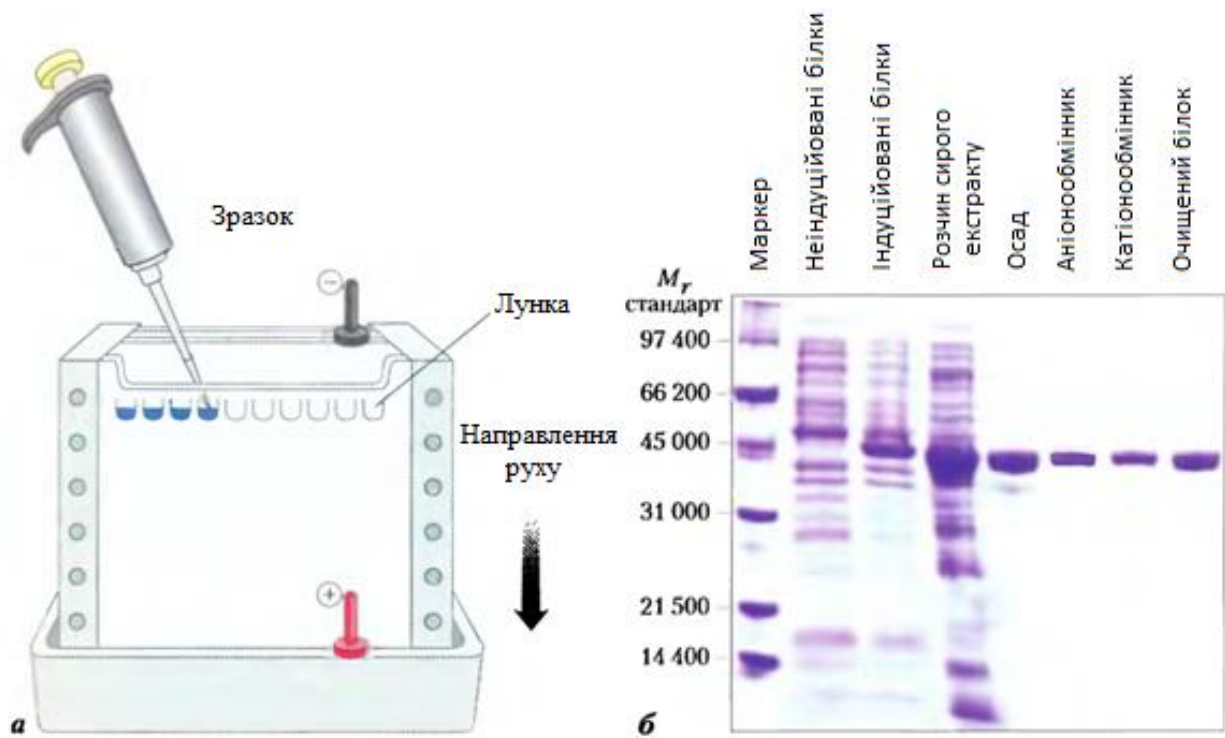


Рисунок 4 – Схема проведення електрофорезу

а) В лунці у верхній частині поліакриламідного геля вносять різні зразки білків. При підключенні електричного струму білки починають рухатися всередині гелю.

б) Після проведення електрофорезу білки можна візуалізувати, обробивши гель розчином барвника Кумасі синього, який зв'язується тільки з білками, але не з гелем. Кожна смуга на гелі відповідає окремому білку(або субодиниці білка), більш малі білки мігрують в гелі швидше, ніж більш великі, і тому знаходяться в нижній частині гелю.

Перша доріжка – набір стандартних білків з відомим значенням M_r , котрі служать в якості маркерів. На двох наступних доріжках представлений набір білків *E. coli* до і після індукції синтезу RecA відповідно.

На четвертій доріжці нанесені білки з глибокого клітинного екстракту.

Далі на доріжках (зліва направо) послідовно представлені зразки після кожної стадії очищення. Очищений білок має поліпептидний ланцюг з $M_r = 38.000$.

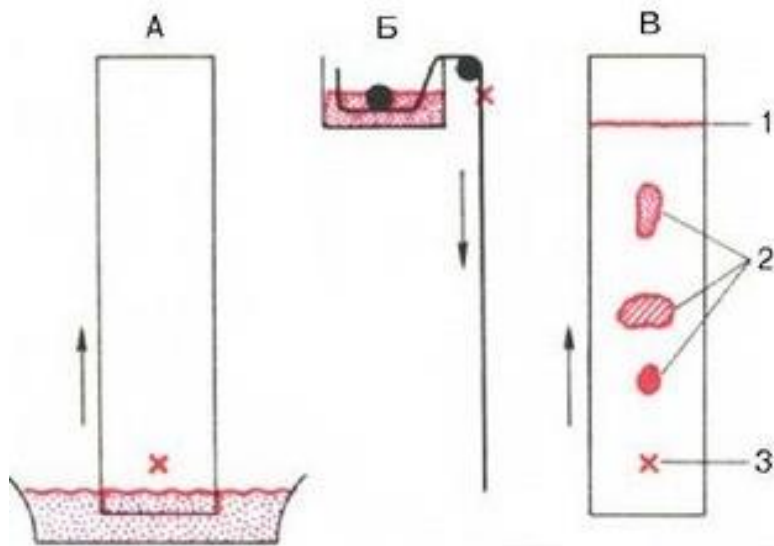
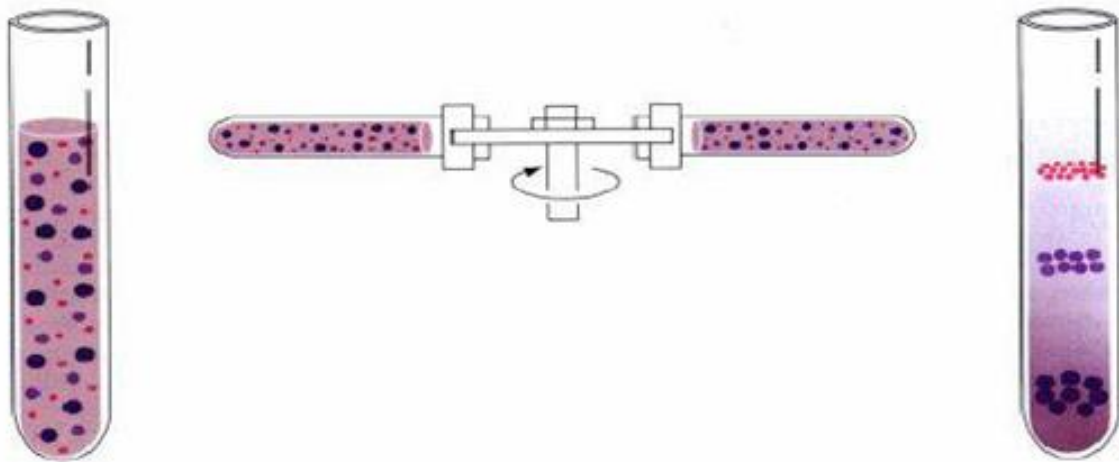


Рисунок 5 – Тонкошарова хроматографія (хроматографія на бумазі): А – висхідна хроматографія; Б – спадна хроматографія; В – хроматограма з розділеними та забарвленими речовинами: 1 – фронт розчинника, 2 – розділення речовин, 3 – місце нанесення зразка



Однорідна суміш зразка та речовини, формуючого градієнт

Центрифугування

Сформований градієнт та смуги розділених молекул

Рисунок 6 – Центрифугування суміші білків

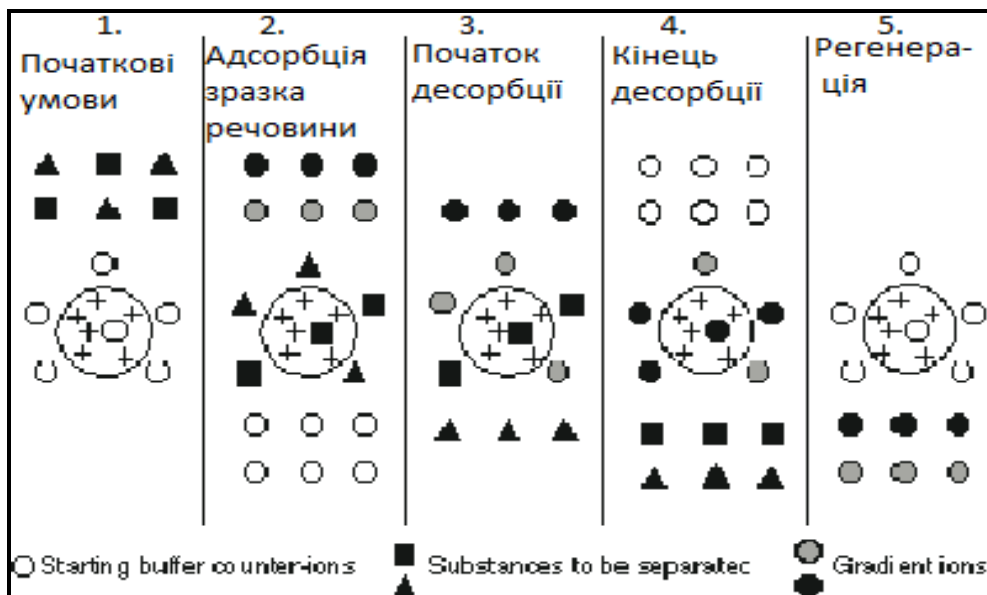


Рисунок 7 – Іонно-обмінна хроматографія: **прозорі кружечки** – початкові буферні проти-іони; **квадратики, трикутники** – розчин, що розділяється; **кружечки (чорні, сірі)** – градієнт-іони

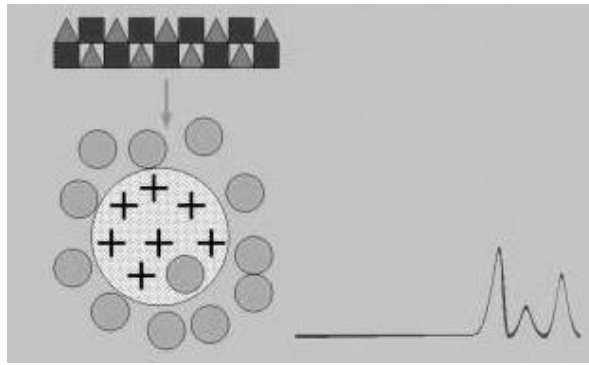
1. На першій стадії рівноваги у іонообміннику розчин доводять до початкового положення, тобто рН та іонну силу, які дозволяють зв'язування бажаних молекул розчину.

2. Другий етап є нанесення зразків та адсорбція, в якому молекули розчину відповідного заряду витісняють проти-іони (контр-іони) і зворотно зв'язуються з гелем. Незв'язані іони можуть бути вимиті з колони шаром початкового буферу.

3. На третьому етапі речовини видаляються з колони шляхом заміни до умов елювання несприятливі для іонного зв'язування молекули розчину. Це допускається збільшенням іонної сили елюваного буферу або зміною рН розчину (Десорбція досягається збільшенням концентрації солі градієнту та молекули розчину видаляються з колони в порядку їх сили зв'язування, найбільш слабо зв'язані речовини елюють в першу чергу).

4. Четвертий та п'ятий етапи – видалення з колони речовин не елюованих у відповідності з попередніми експериментальними умовами і приведення у рівновагу знову у початковий стан системи.

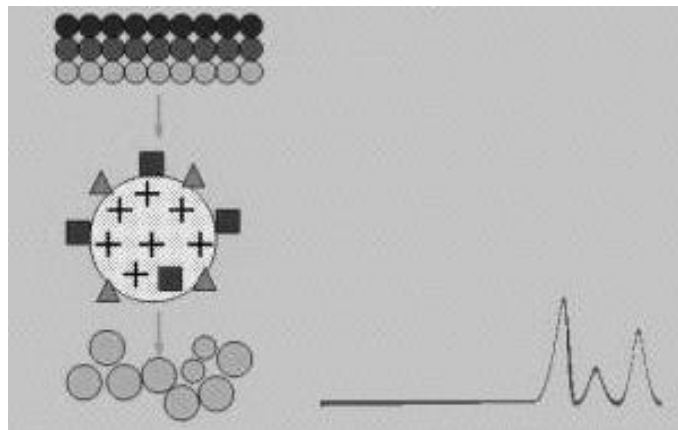
Особливості іонно-обмінної хроматографії



Крок 1: Урівноваження колони (рН, йонна сила)

Слід елюювати через колону рухливу фазу такого складу, який забезпечив би необхідний рН і йонну силу (провідність іонів) всередині колони. Як правило використовують сольові розчини (солі в низьких концентраціях).

Найбільшою популярністю користується натрію хлорид. На нерухомій фазі сорбуються контр-іони.

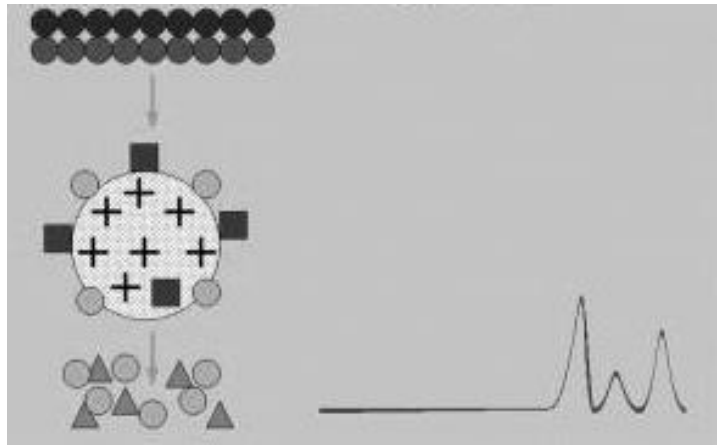


Крок 2: Нанесення зразка на колону

Розчин зразка елююється через колону. Молекули зразка витісняють іони солі з активних груп сорбенту, сорбуючись самі. Чим вища різниця заряду між сорбентом і молекулою, тим вищий сорбційний ефект.

Кульки відтінків фіолетового кольору на малюнку – іони солі (чим темніший колір, тим вище концентрація солі).

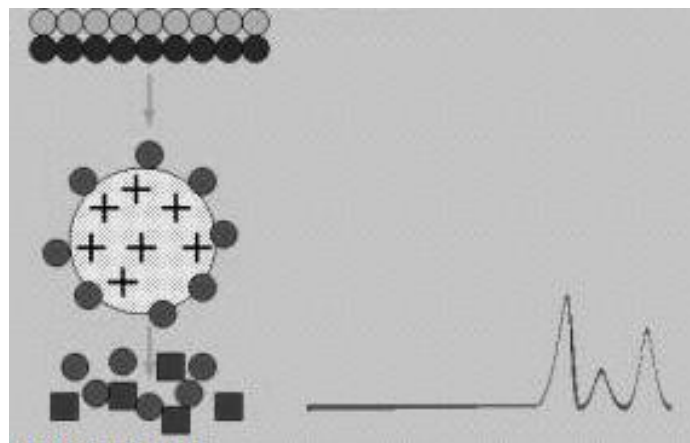
Трикутнички з квадратиками – зразок, що складається з двох речовин.



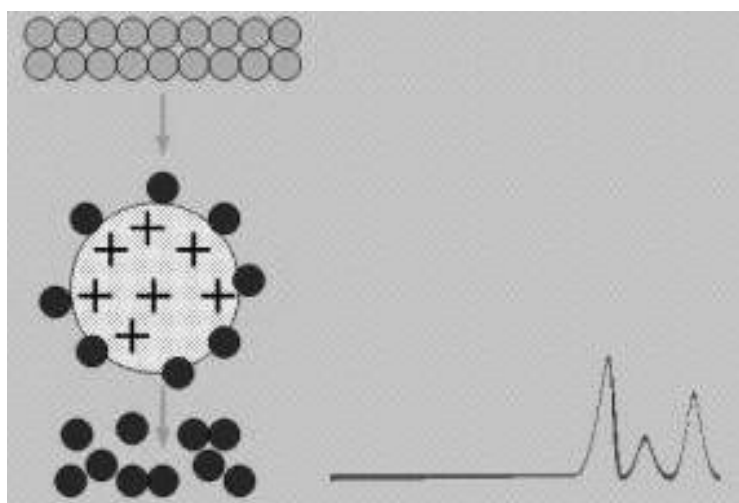
Крок 3: Градієнтне елювання і витіснення (десорбція) компонентів, які слабоутримуюються

Підвищуючи іонну силу розчину (або змінюючи рН) створюється конкуренція між молекулами зразка і сіллю. Чим вища концентрація солі, тим нижчий ступінь спорідненості молекул зразка до сорбенту.

Спочатку десорбуються молекули, що мають більш низьку спорідненість.



Крок 4: Градієнтне елювання і витіснення (десорбція) останніх компонентів



Крок 5: Регенерація сорбента

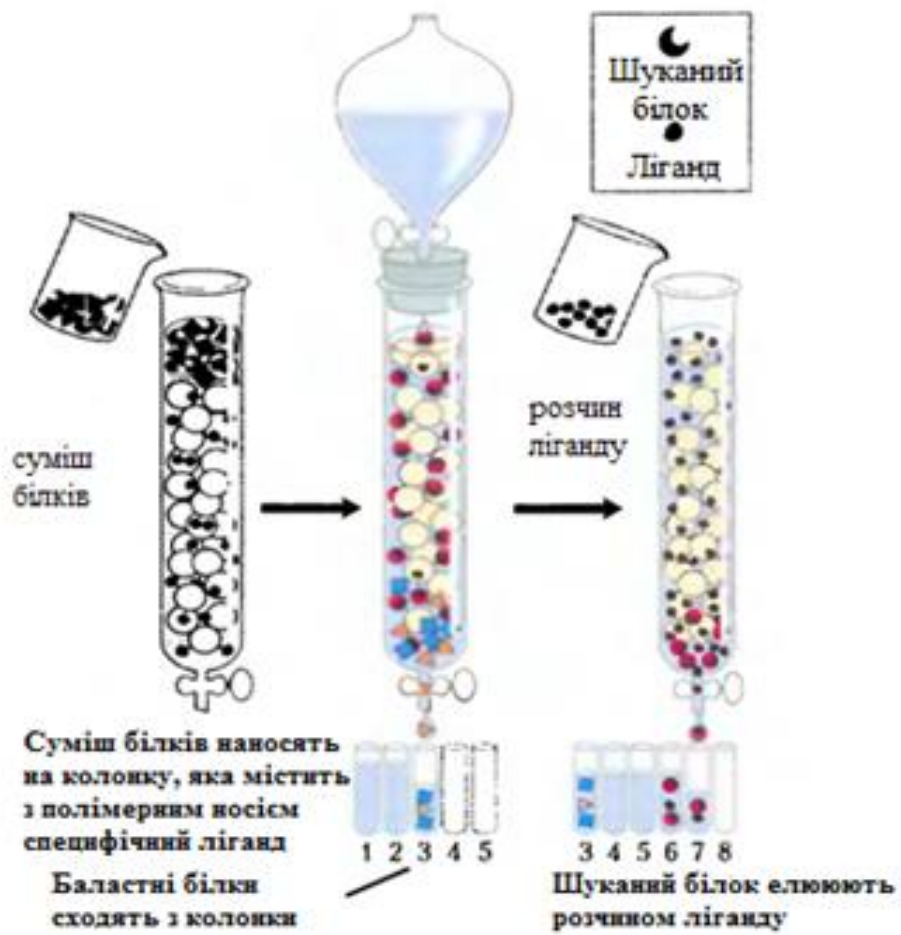


Рисунок 8 – Афінна хроматографія