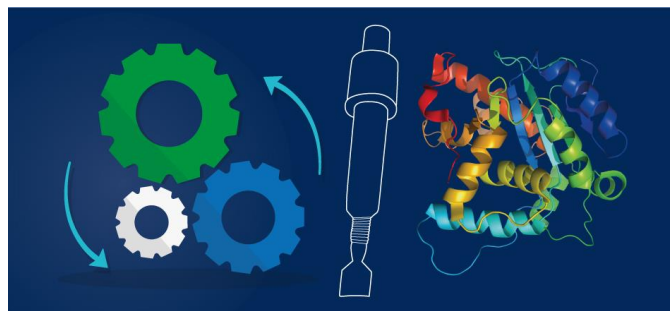




Методы очистки белков



Спецпрактикум по биохимической генетике - Лекция 9
Старший преподаватель: PhD, Сmekенов Изат Темиргалиевич
Кафедра молекулярной биологии и генетики



ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

Изучить основные принципы и этапы очистки белков, различия между методами, их физико-химическую основу, а также критерии выбора оптимальной схемы очистки для конкретного белка.

Задачи

- ✓ Объяснять, зачем требуется очистка белков в биотехнологии, биохимии и медицине. ✓ Перечислять основные методы трансформации бактерий.
- ✓ Описывать и сравнивать основные методы очистки: фракционирование, хроматографию, электрофорез, диализ, ультрафильтрацию.
- ✓ Выбирать метод на основе свойств белка (заряд, размер, гидрофобность, специфичность связывания).
- ✓ Составлять примерную схему очистки белка с учётом его метки (His-tag, GST, MBP и т.д.).
- ✓ Объяснять принципы работы ионообменной, аффинной и гель-фильтрационной хроматографии.
- ✓ Различать аналитические и препаративные методы очистки.

Ключевые термины

Экстракция, фракционирование, осаждение сульфатом аммония, центрифугирование, хроматография, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, гель-фильтрация, гидрофобная хроматография, обратная фаза, SDS-PAGE, нативный PAGE, изоэлектрическое фокусирование, диализ, ультрафильтрация, лиофилизация, His-tag, GST-tag, Superdex, Ni-NTA, MWCО, чистота белка, активность фермента.

1) Экстракция и фракционирование

- ❖ Белки извлекаются из клеток или тканей с помощью буферов, обеспечивающих стабильность белка.
- ❖ Фракционирование позволяет разделить белки по растворимости, размеру или заряду, облегчая последующую очистку.

2) Осаждение сульфатом аммония и центрифугирование

- ❖ Используется для частичного концентрирования и разделения белков по солюбильности.
- ❖ Центрифугирование позволяет отделить осадок от супернатанта, содержащего белки разных фракций.

3) Хроматография

- ❖ Аффинная хроматография: селективное связывание белка с лигандом (например, His-tag → Ni-NTA, GST-tag → глутатион).
- ❖ Ионообменная хроматография: разделение по заряду белков.
- ❖ Гель-фильтрация (Superdex): разделение по размеру и молекулярной массе.
- ❖ Гидрофобная хроматография: разделение по гидрофобным свойствам.
- ❖ Обратная фаза: используется для аналитической оценки белков, разделение по гидрофобности.

4) Электрофорез

- ❖ SDS-PAGE: разделение белков по молекулярной массе в денатурированном виде.
- ❖ Нативный PAGE: разделение белков без денатурации, сохранение активности.
- ❖ Изоэлектрическое фокусирование: разделение белков по изоэлектрической точке (pI).

5) Диализ, ультрафильтрация, лиофилизация

- ❖ Диализ: удаление малых молекул и буферная замена.
- ❖ Ультрафильтрация (MWCO): концентрирование и очистка белков по размеру.
- ❖ Лиофилизация: сушка белка для долгосрочного хранения.

6) Тэги для рекомбинантных белков

- ❖ His-tag и GST-tag облегчают аффинную очистку.

7) Качество и свойства белка

- ❖ Чистота белка оценивается SDS-PAGE и другими методами.
- ❖ Активность фермента проверяется функциональными тестами после очистки.

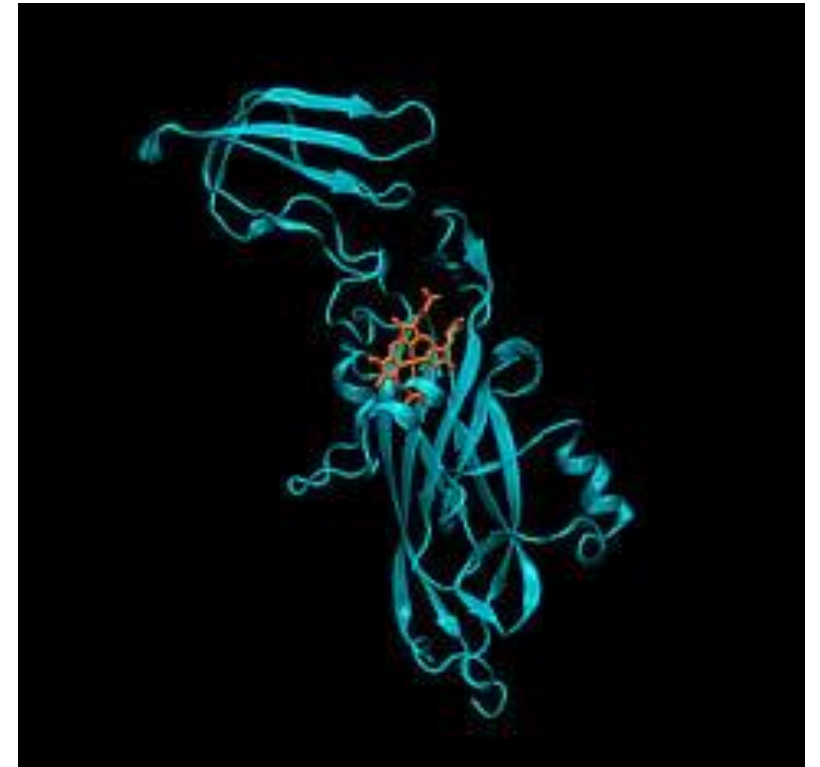


ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

- 1) Какие методы используются для предварительной очистки белков (экстракция, фракционирование, осаждение)?
- 2) Как работает осаждение сульфатом аммония и зачем нужно центрифугирование?
- 3) Чем отличаются виды хроматографии (аффинная, ионообменная, гель-фльтрация, гидрофобная, обратная фаза)?
- 4) Какие тэги применяют для облегчения аффинной очистки рекомбинантных белков и как они действуют?
- 5) В чем разница между SDS-PAGE и нативным PAGE, и зачем нужно изоэлектрическое фокусирование?
- 6) Для чего используют диализ, ультрафильтрацию и лиофилизацию при подготовке белка? Как оценивают чистоту и активность фермента после очистки?
- 7) Как правильно сочетать методы хроматографии для максимальной чистоты белка?

Введение

- Исследования строения и функций белков предполагают наличие высокоочищенных препаратов. Получение же белка в гомогенном состоянии - достаточно сложная задача.
- Как правило, биологический материал, являющийся источником выделения, содержит большое число белков, их комплексов друг с другом и другими биополимерами. Близкие свойства компонентов этой смеси требуют при выделении индивидуальных белков использования разнообразных методов и различных их сочетаний.
- Трудности получения чистого белка связаны также с лабильностью белков и опасностью их денатурации, что сужает круг возможных методов выделения.



Концентрирование

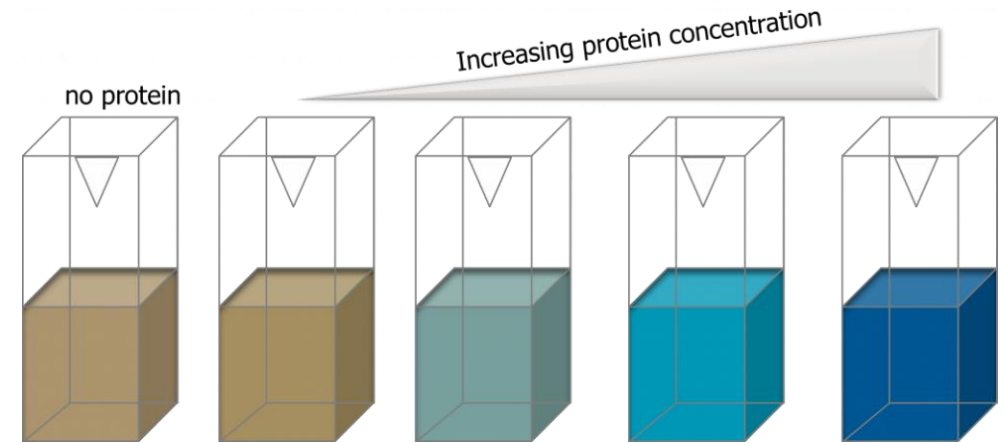
Концентрирование белков — это процесс увеличения концентрации белка в растворе за счёт удаления части растворителя (обычно воды) или низкомолекулярных примесей, не затрагивая сам белок и не изменяя его структуру и активность.

Основные методы концентрирования:

Метод	Принцип	Применение
Ультрафильтрация (Amicon, Centricon)	Мембрана с порогом MWCO пропускает только малые молекулы	Быстрое, мягкое концентрирование без нагревания
Осаждение (сульфат аммония, этанол, ацетон)	Белок осаждается, раствор удаляется	Подходит для больших объёмов, дешёвый метод
Лиофилизация (сублимационная сушка)	Замораживание + вакуумное удаление воды	Длительное хранение белков в сухом виде
Вакуумное выпаривание / SpeedVac	Испарение растворителя при пониженном давлении	Для небольших объёмов и нестабильных белков
Концентрирование с помощью ПЭГ (осмотическое)	Осмотически вытягивает воду через мембрану	Подходит для больших объёмов

Концентрирование

- Его можно проводить путем осаждения белка с последующим растворением осадка в меньшем объеме. Обычно при этом используют сульфат **аммония** или **ацетон**. Концентрация белка в исходном растворе должна быть не меньше 1 мг/мл.
- Можно использовать адсорбцию белков из очень разбавленных растворов на ионообменнике с последующей элюцией небольшим объемом солевого раствора. Для быстрого концентрирования небольших объемов белковых растворов можно использовать сухой гельфильтрующий носитель (например, **сефадекс**), **полиэтиленгликоль** или высокозамещенную **КМ-целлюлозу** как водоотнимающие средства. Образец помещают в диализный мешок, который погружают в порошок, поглощающий воду.



Зачем проводится концентрирование белков?

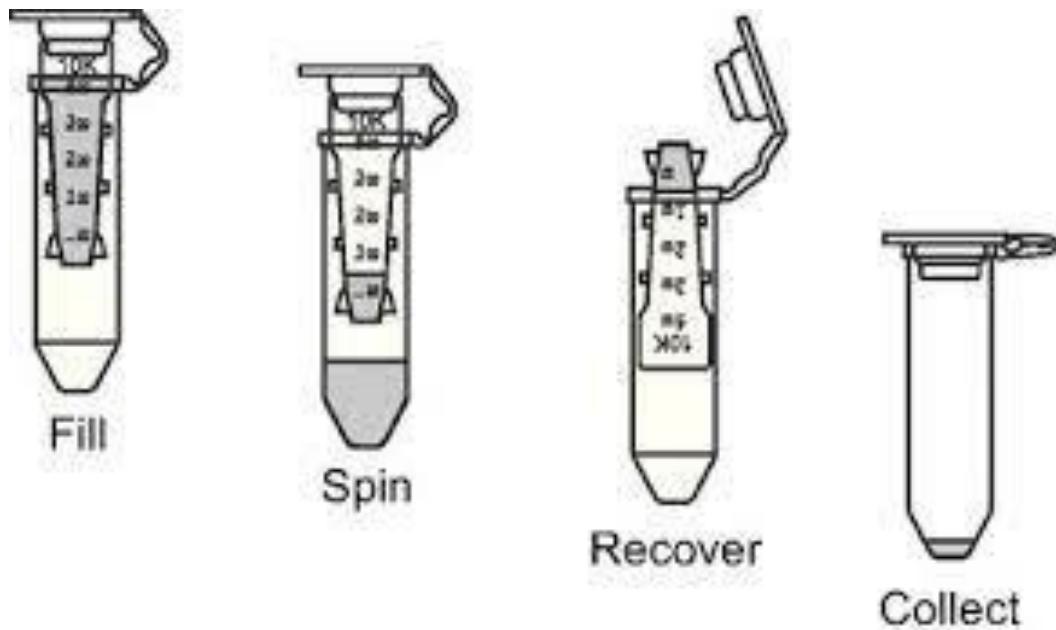
- ✓ Для повышения эффективности последующей очистки или кристаллизации
- ✓ Для подготовки образца к биохимическим анализам
- ✓ Для получения препаратов с высокой активностью ферментов или антител
- ✓ Для уменьшения объёма при хранении или лиофилизации

Ультрафильтрация - наиболее продуктивный метод

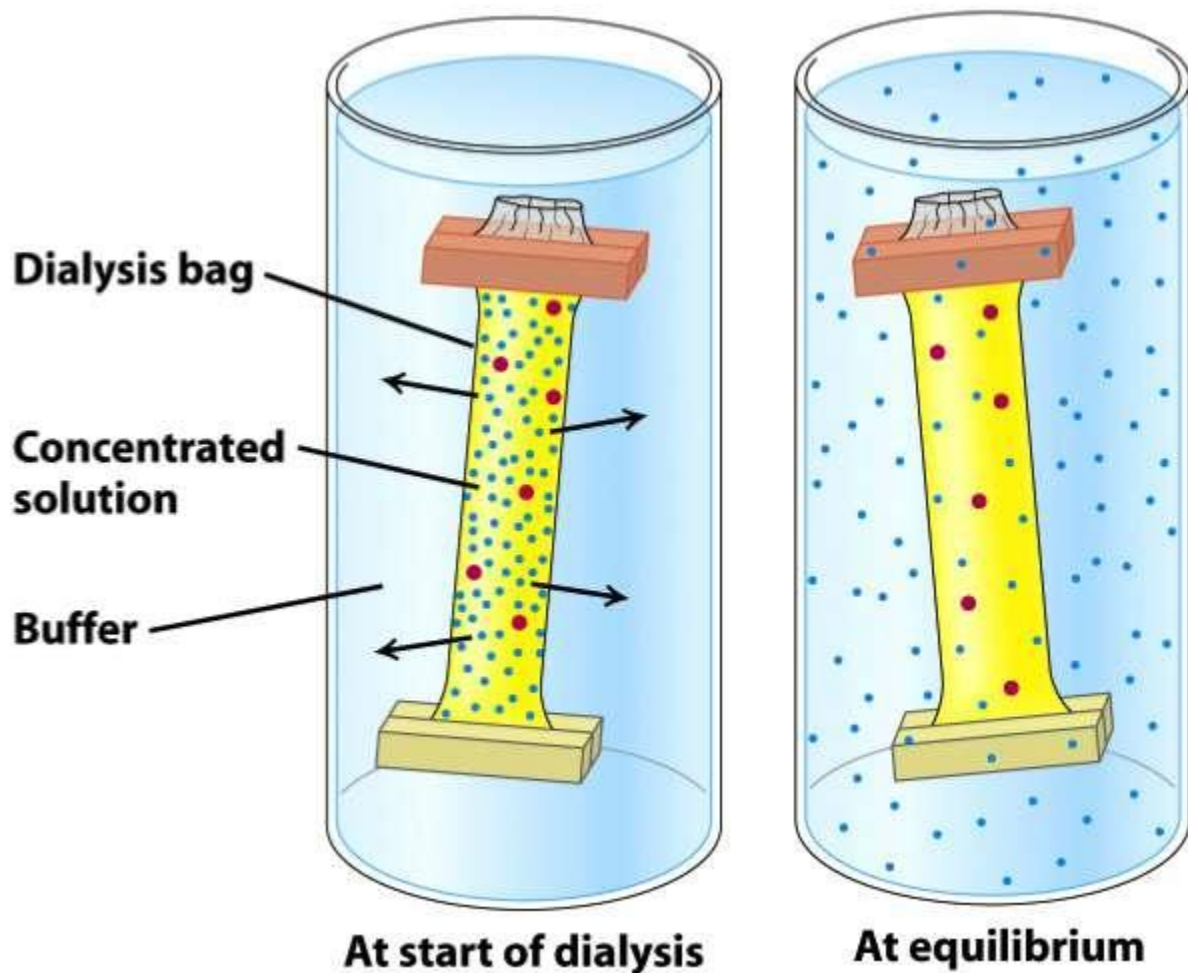
- Метод основан на применении полупроницаемых мембран с определенными размерами пор, при этом вода и малые молекулы проходят через мембрану, а по другую сторону мембраны остается концентрированный раствор белка. Это достигается в специальных ячейках (объемом до 1 л) с перемешиванием раствора и с применением сжатого инертного газа.



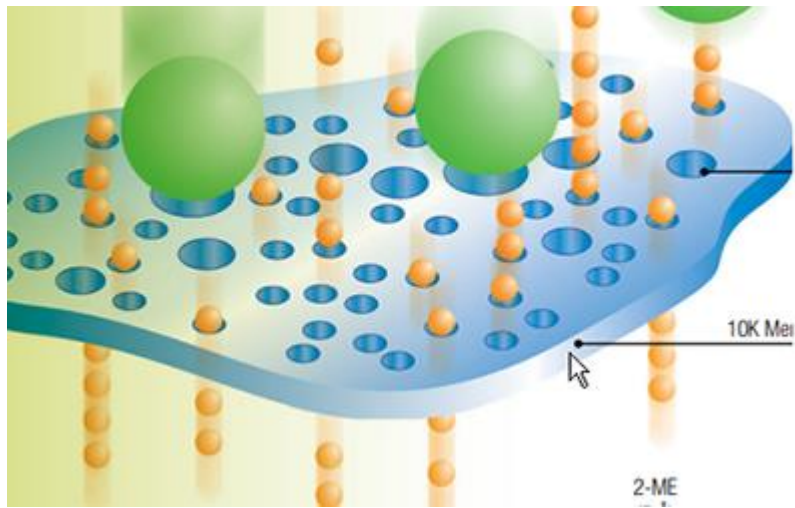
Шаги ультра-центрифугирования



Диализ



- Концентрирование и диализ тесно связаны между собой. При диализе низкомолекулярные вещества удаляются из образца и замещаются буфером.
- Традиционным является способ диализа через целлофановую пленку. В продаже имеются диализные трубки различного диаметра, обычно они не пропускают молекулы крупнее 15 000-20 000 Да. Для более полного удаления низкомолекулярных веществ в процессе диализа необходима смена буферного раствора в диализате. Диализ является длительной процедурой, ставят его обычно на ночь.
- Удаление солей и замену буфера предпочтительней проводить более быстрым методом гельфльтрации. Для этих целей наиболее широко применяется сефадекс G-25. Объем образца не должен превышать $1/5$ объема колонки, скорость элюции - не более 50 мл/ч на 1 см^3 поперечного сечения. Удобно в лаборатории иметь ряд заранее подготовленных колонок для быстрого обессоливания.



Продукция Thermo FS для диализа даёт возможность работать с образцами в широком диапазоне объёмов от 10 мкл до 250 мл. Специальные диализные ёмкости не требуют применения клипс и других дополнительных приспособлений, что позволяет сэкономить время, избегать потерь или загрязнений образца и процесс простым.

Продукты снабжены MWCO-мембраной (Molecular Weight Cut-Off), предназначенной для диализа молекул с молекулярным весом до 2; 3,5; 7; 10 или 20 кДа.

Выбор подходящего продукта определяется, в большей степени, объемом и молекулярным весом (MWCO).



Гельфилтрация

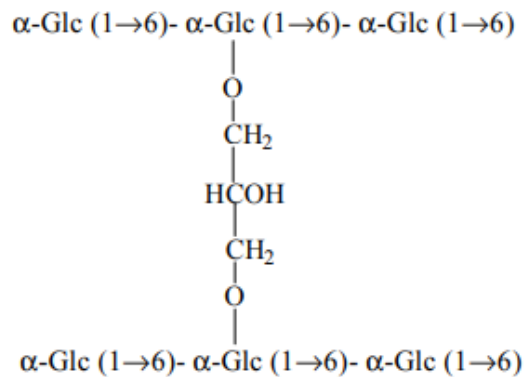
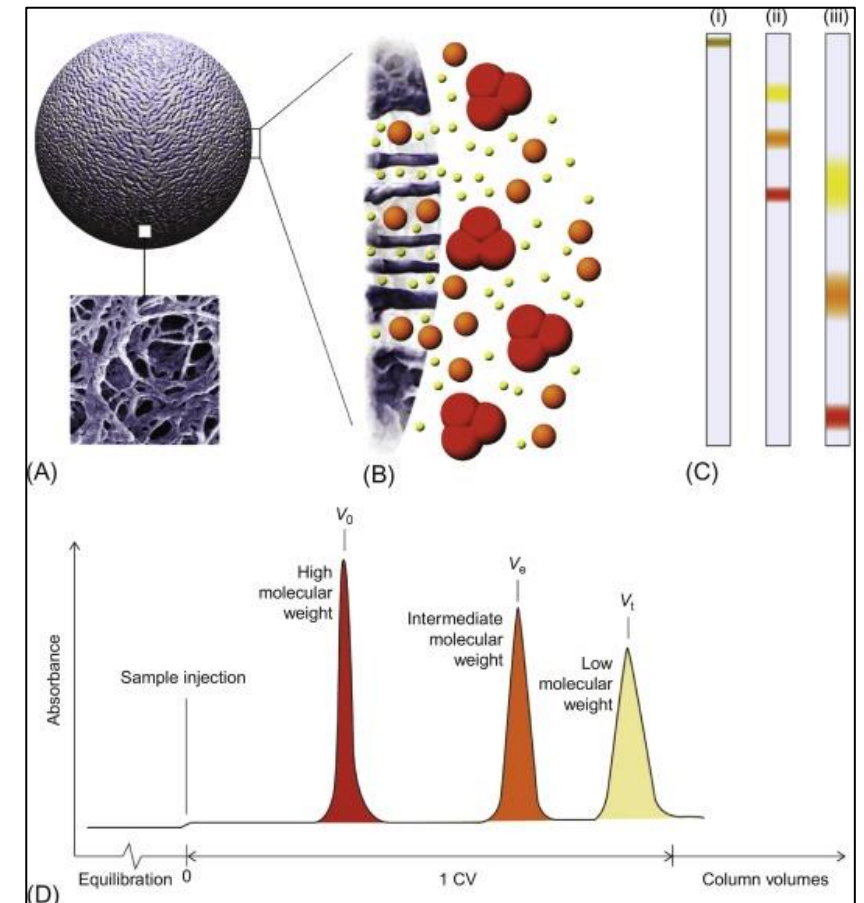
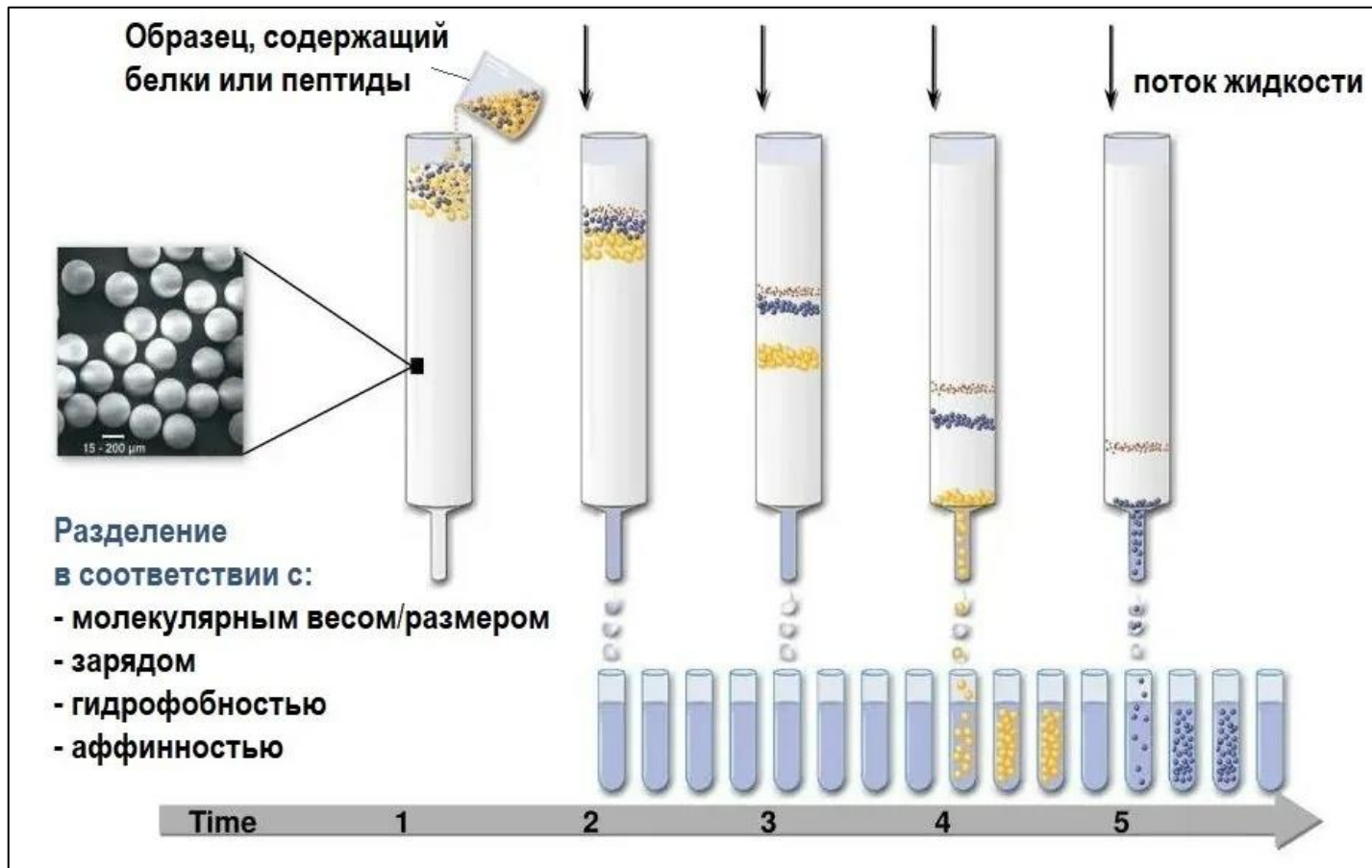


Рис. 2. Структура сефадексов

- С помощью метода гельфилтрации можно быстро разделить макромолекулы в соответствии с их размерами.
- Носителем для хроматографии является гель, который состоит из поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) для удобства наполнения колонок.
- Так сефадексы - это поперечносшитые декстраны (α -1 $\rightarrow$ 6-глюканы микробного происхождения) с заданными размерами пор. Сшиты цепи декстрана трехуглеродными мостиками с помощью эпихлоргидрина

- ✓ Чем больше поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий. Полученный таким образом гель играет роль молекулярного сита.
- ✓ При пропускании раствора смеси веществ через колонку, наполненную набухшими гранулами сефадекса, крупные частицы, размер которых превышает размер пор сефадекса, будут двигаться быстро. Мелкие молекулы, например, соли, будут двигаться медленно, поскольку в процессе движения они проникают внутрь гранул.
- ✓ Колонка, наполненная сефадексом, характеризуется общим объемом V_0 , который складывается из внутреннего объема V_v , находящегося внутри гранул, объема наружного V_n , занимающего пространство между гранулами, и объема V_m , отражающего массу геля:





$$V_0 = V_B + V_H + V_M$$

Распределение вещества между внутренним и внешним объемами характеризуется коэффициентом распределения K_r , равным

$$K_r = \frac{V_{\text{э}} - V_H}{V_B}$$

Если вещество не проникает внутрь глобул, объем элюции равен наружному объему и $K_r=0$. Если же вещество равномерно распределено внутри гранул и между ними, объем элюции равен сумме внутреннего и наружного объемов и $K_r=1$.

Существуют различные марки сефадексов, отличающиеся размером пор, обозначаемые как G-10, 15, 25, 50, 75 и т.д. Чем меньше номер, тем больше число поперечных сшивок 16 содержит молекула, тем меньше воды поглощает гранула при набухании. С ростом номера марки сефадекса растут поры гранул и увеличиваются границы молекулярной массы веществ, способных проникать внутрь гранул, а, следовательно, и способных к разделению. Каждая марка сефадекса выпускается с различной величиной частиц: сверхтонкий, тонкий, средний и грубый. Как правило, в аналитической работе используются сверхтонкий и тонкий, а в препаративной - средний и грубый.

Области применения выпускаемых гелей

Фирменное название геля, производитель	Тип геля	Область разделения по относительной молекулярной массе (для глобулярных белков)
Сефадексы G-10*	Декстран	-700
<i>Amersham Bioscience</i> G-15	«	-1 500
G-25	«	1 000-5 000
G-50	«	1 500-30 000

Фирменное название геля, производитель	Тип геля	Область разделения по относительной молекулярной массе (для глобулярных белков)
G-75	«	3 000-70 000
G-100	«	4 000-150 000
G-150	«	5 000-400 000
G-200	«	5 000-800 000

Био-гели	P-2	Полиакриламид	200-2 6000
<i>Bio-Rad</i>	P-4	«	500-4 000
	P-6	«	1 000-5 000
	P-10	«	5 000-17 000
	P-30	«	20 000-50 000
	P-60	«	30 000-70 000
	P-100	«	40 000-100 000
	P-150	«	50 000-150 000
	P-200	«	80 000- 300 000
	P-300	«	100 000-400 000

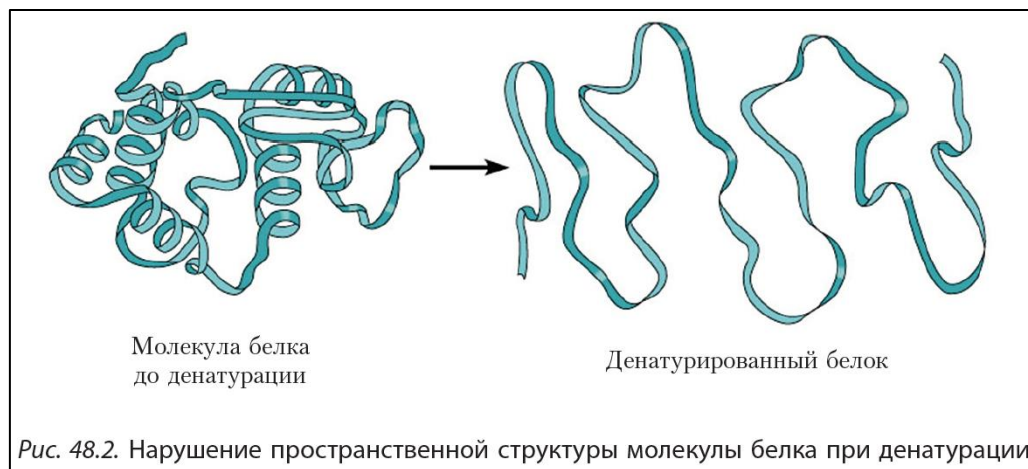
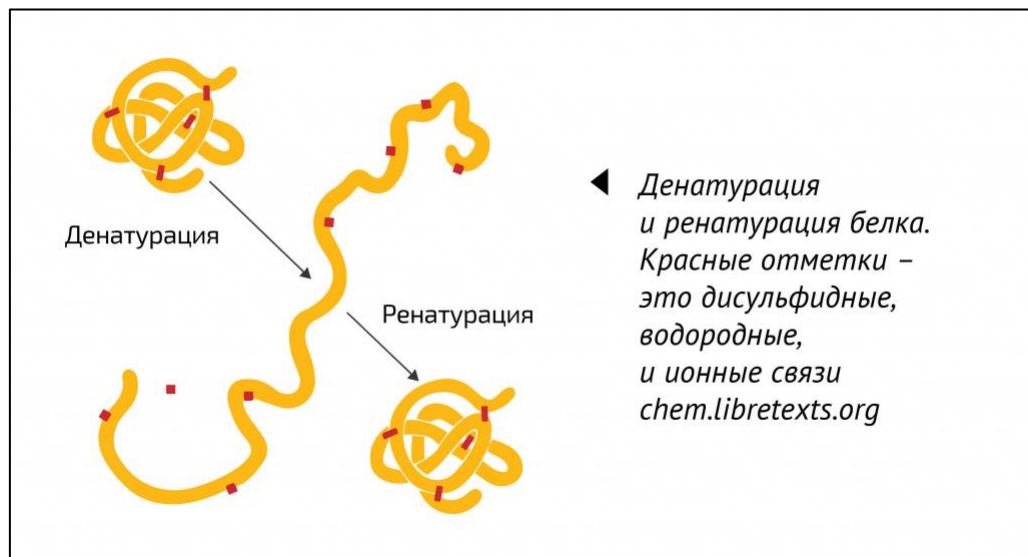
Таблица 1

Параметры колонок с сефадексом G-25 для обессоливания белковых растворов

Размеры колонки*	Тип носителя	Объем колонки, см ³	Объем образца, см ³	Скорость потока, мл·ч ⁻¹	Время процесса, мин
1×8	Тонкий	8	1-1,5	40	7
6×10	Средний	60	2-10	200	15
8×30	Средний	240	10-30	250	30
8×60	Средний	480	30-80	250	45
16×90	Грубый	1440	80-300	500	90
50×100	Грубый	5000	300-1000	1500	90

* Площадь поперечного сечения × высота, см

Тепловая денатурация



- На начальном этапе очистки для разделения белков иногда используют **тепловую обработку**. Она эффективна, если белок относительно устойчив в условиях нагревания, в то время как сопутствующие белки денатурируют. При этом варьируют pH раствора, продолжительность обработки и температуру. Для выбора оптимальных условий предварительно проводят серию небольших опытов.
- После проведения первых этапов очистки белки далеки от гомогенного состояния. В полученной смеси белки отличаются друг от друга растворимостью, молекулярной массой, величиной суммарного заряда молекулы, относительной стабильностью и т.д. Эти различия и могут быть положены в основу методов дальнейшего разделения белков.
- **Очистка белка** – процесс многоступенчатый и на каждой ступени мы получаем фракцию более богатую выделяемым белком, чем на предыдущей стадии. Такой процесс часто называют фракционированием.

Осаждение белков

- Разделение белков на основе их различной растворимости является классическим методом. Так фракционирование солями основывается на избирательном разделении белков вследствие их различной растворимости в растворах солей.
- Соль подбирается в соответствии со следующими требованиями: она должна обладать достаточной растворимостью, которая не меняется значительно в зависимости от температуры, при добавлении соли не должен заметно меняться pH раствора, она легко отделяется от белка и не оказывает денатурирующего действия. Наиболее часто употребляемой солью для фракционирования белков является сульфат аммония. Обычно проводят фракционное осаждение белков возрастающими концентрациями сульфата аммония.
- При описании методов выделения количество сульфата аммония выражают в процентах насыщения и часто употребляют выражения вроде "фракция, осажденная между 55 и 60% насыщения". Правильно рассчитать количество соли, которое нужно добавить к данному объему раствора, чтобы получить указанный процент насыщения, не простое дело. Поскольку при растворении соли меняется объем жидкости, количество соли, которое нужно добавить к данному объему жидкости, не пропорционально требуемому проценту насыщения. Обычно пользуются специальной номограммой, с помощью которой можно определить количество соли, необходимое для перехода от одной степени насыщения к другой, или расчетными таблицами.

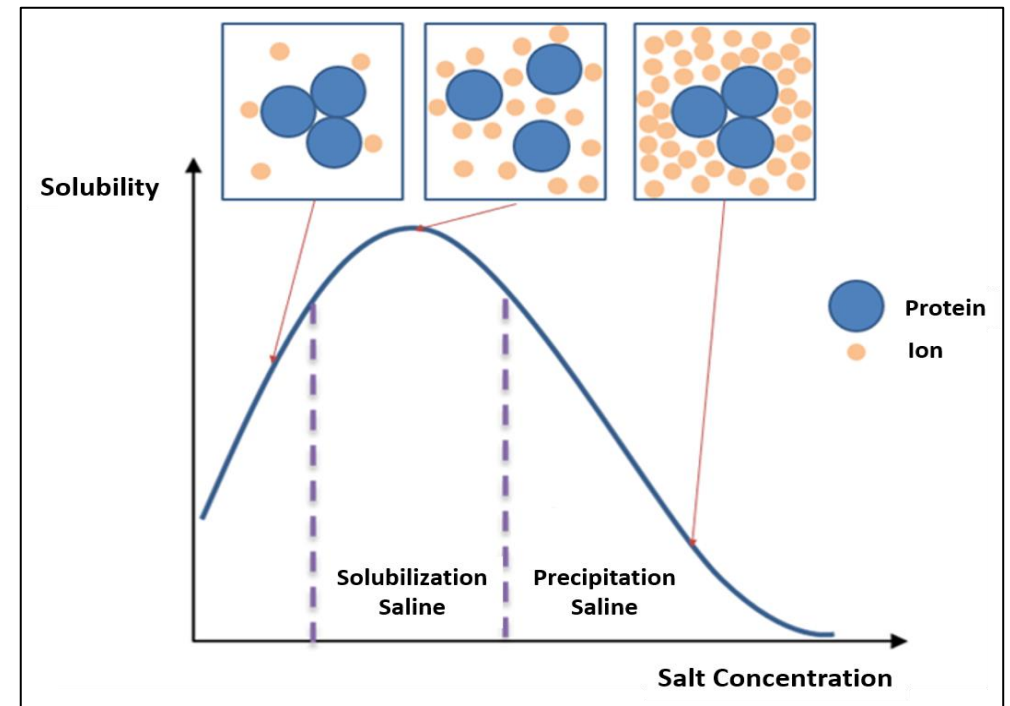
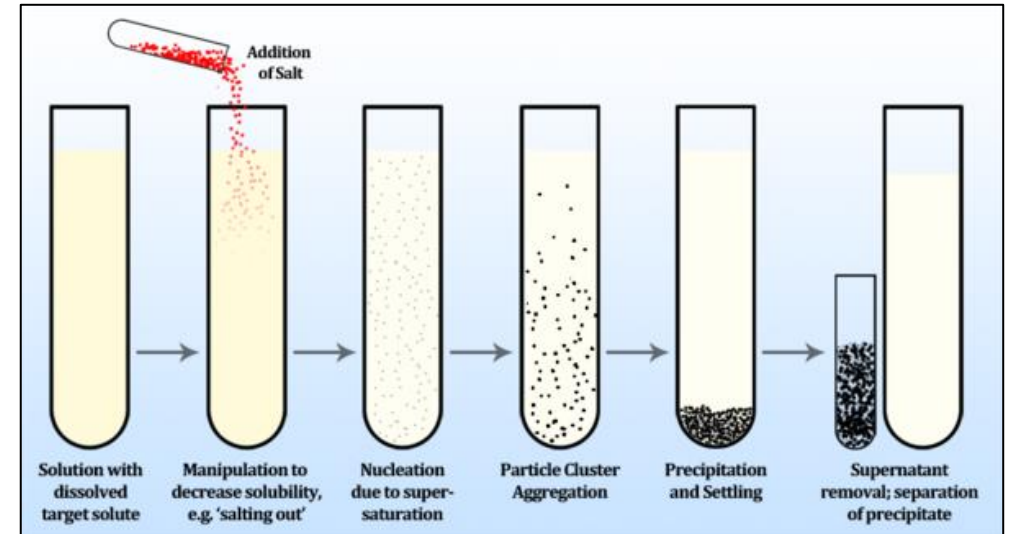
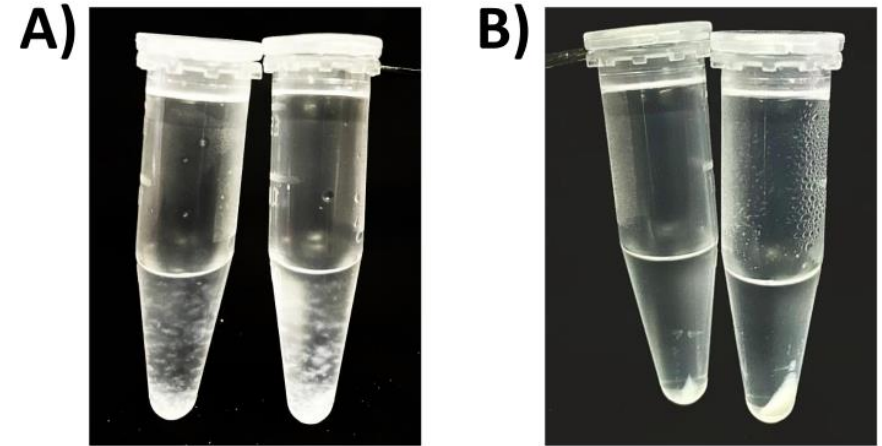


Table 1. Ammonium sulfate saturation table using solid ammonium sulfate

[illegible]

Осаждение белков органическими растворителями

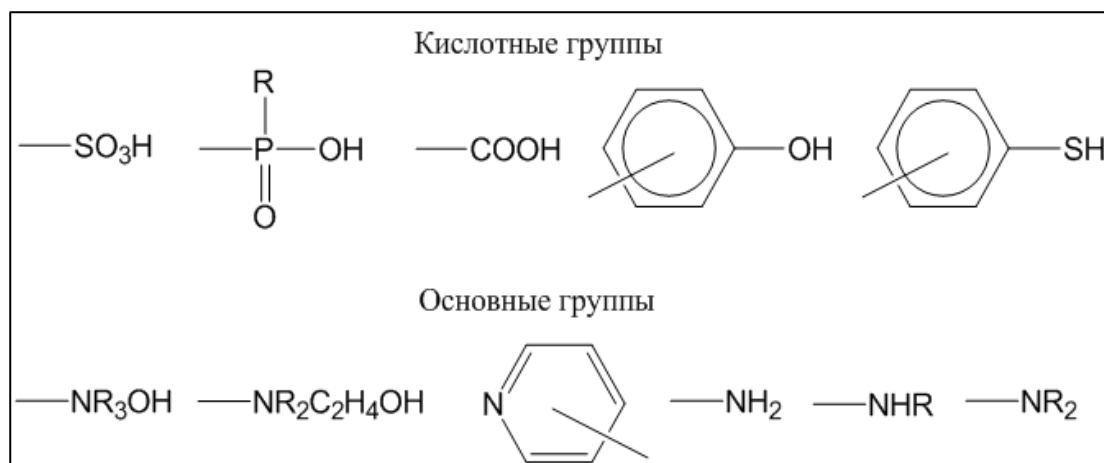
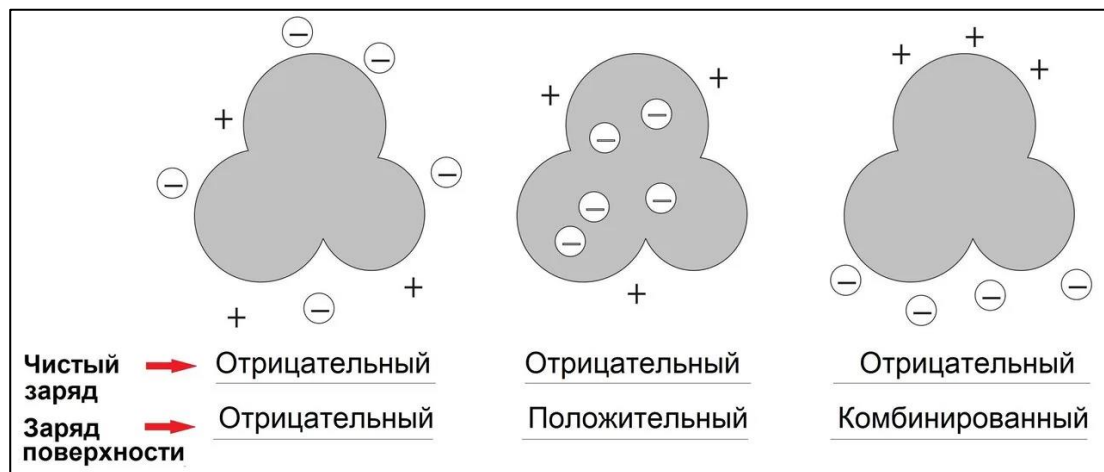
- ❖ Это один из старых методов. Он играет важную роль при очистке белков в промышленных масштабах. Чаще всего используют такие растворители как этанол и ацетон, реже – изопропанол, метанол, диоксан.
- ❖ Основной механизм процесса: по мере возрастания концентрации органического растворителя снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул фермента. Происходит снижение растворимости белков до уровня, при котором начинается агрегация и осаждение. Важным параметром, влияющим на осаждение, является размер молекулы белка. Чем больше молекула, тем ниже концентрация органического растворителя, вызывающая осаждение белка.



Разделение белков путем адсорбции

- Белки обычно избирательно адсорбируются на твердых фазах самых различных типов. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография, широко используются для разделения белков. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень очистки белков. Важнейшими адсорбентами белков являются ионообменники, фосфат кальция (гидроксилапатит) и разнообразные аффинные сорбенты.

а) ионообменники



- В отличие от низкомолекулярных веществ, белки предъявляют к сорбентам особые требования. Главное из них – это “рыхлость” структуры сорбента, чтобы белок мог проникнуть внутрь частиц и достичь центров связывания. Кроме того, материал сорбента не должен взаимодействовать с белком.
- Этим требованиям не отвечают полистирольные смолы, и для разделения белков используют ионообменники на основе целлюлозы, декстранов и агароз. Белки связываются ионообменником с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и кластерами заряженных групп на ионообменнике. Степень модификации КМ или ДЭАЭ-целлюлозы высока – до 0,5 ммоль/см³. Заряды, конечно, нейтрализованы противоионами, такими как ионы металлов, хлорид-ионы и ионы буфера.
- Белок должен вытеснить противоионы, отсюда происходит термин “ионный обмен”. Количество белка, которое может связать ионообменник в расчете на единицу объема, может быть очень большим. У ионообменников на основе целлюлозы это количество зависит в основном от размеров белковых молекул, – чем мельче молекулы белка, тем в большей степени он адсорбируется. Молекулы белков с молекулярной массой более 10⁶ не задерживаются большинством целлюлозных ионообменников.

Наиболее известные ионообменники:

А) На основе целлюлозы

- Катионообменник КМ-целлюлоза (карбоксиметилцеллюлоза) Заряженная группа $\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$
- Анионообменник ДЭАЭ-целлюлоза (диэтиламиноэтилцеллюлоза) + Заряженная группа $\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
- Катионообменник Фосфоцеллюлоза Заряженная группа $-\text{O}-\text{PO}_3$
- Анионообменник ТЭАЭ-целлюлоза (триэтиламиноэтилцеллюлоза) + Заряженная группа $\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$

Б) На основе декстранов

- Катионообменник КМ-сефадекс(карбоксиметилсефадекс) Заряженная группа $\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}$
- Катионообменник СП-сефадекс (сульфопропилсефадекс) Заряженная группа $\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3$

в) На основе сефарозы (предназначены для разделения крупных молекул)

- Катионообменник КМ-сефароза (карбоксиметилсефароза) Заряженная группа $\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}$
- Анионообменник ДЭАЭ- сефароза (диэтиламиноэтилсефароза) + Заряженная группа $\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
- Ионообменники на основе сефадекса и сефарозы комбинируют ионный обмен с эффектом молекулярного сита.

Колонка: COSMOGEL IEX

Подвижная фаза:

А: фосфатный буфер 20 ммоль/л (рН 6,8)

В: фосфатный буфер 20 ммоль/л (рН 6,8) + NaCl 0,5 моль/л

Концентрация В: 0–100% 30 мин, линейный градиент

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Температура: 30 °C

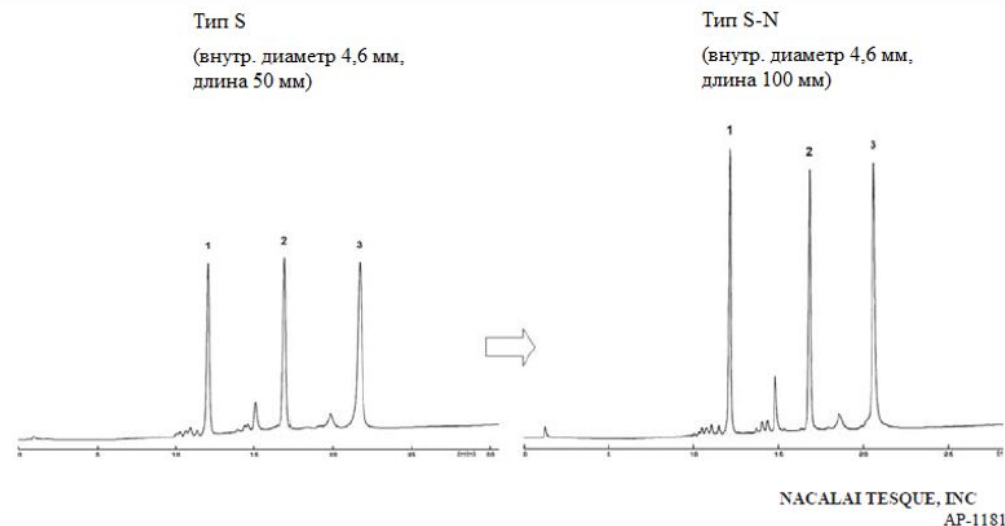
Детекция: УФ 220 нм

Образец:

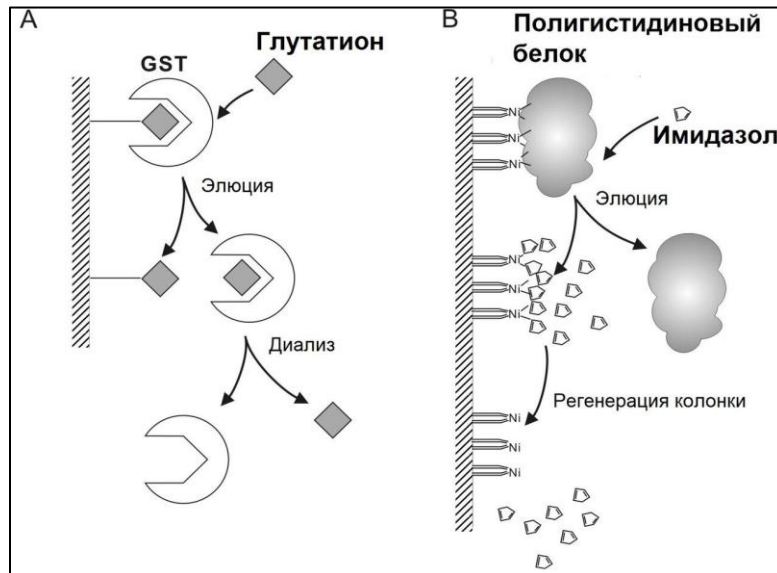
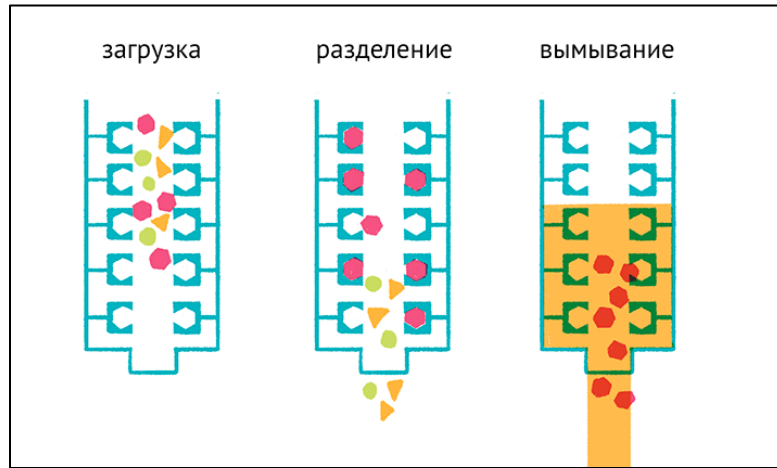
1. Рибонуклеаза А (1,65 мкг)

2. Цитохром С (1,65 мкг)

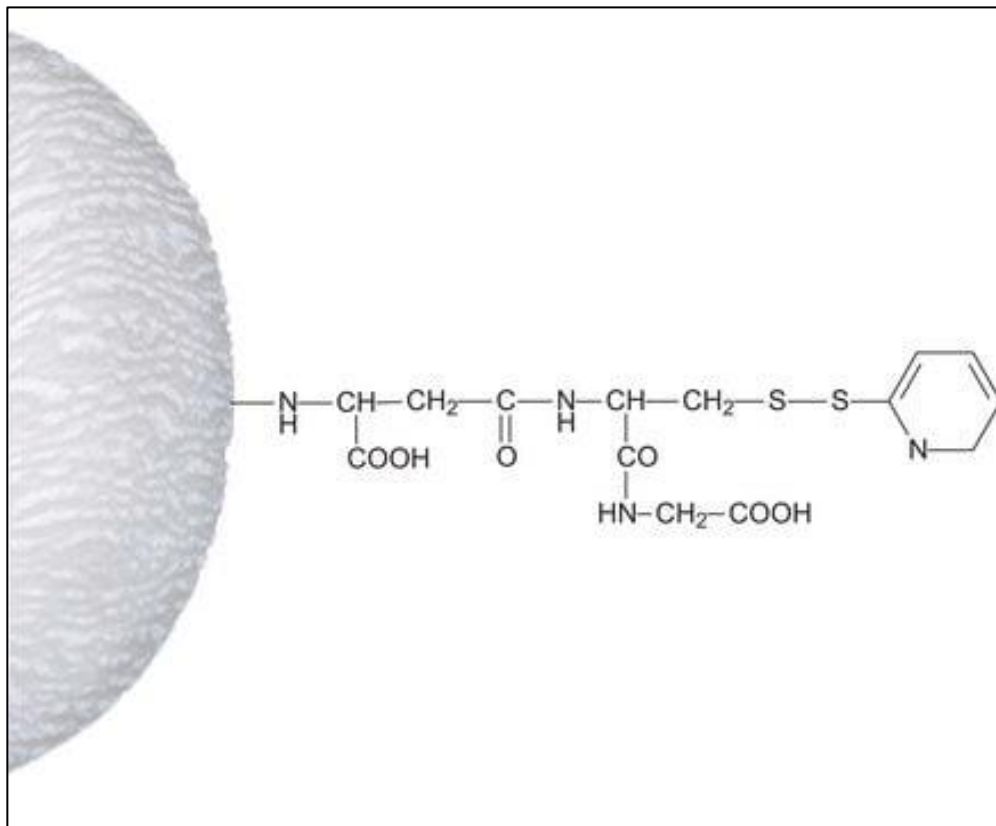
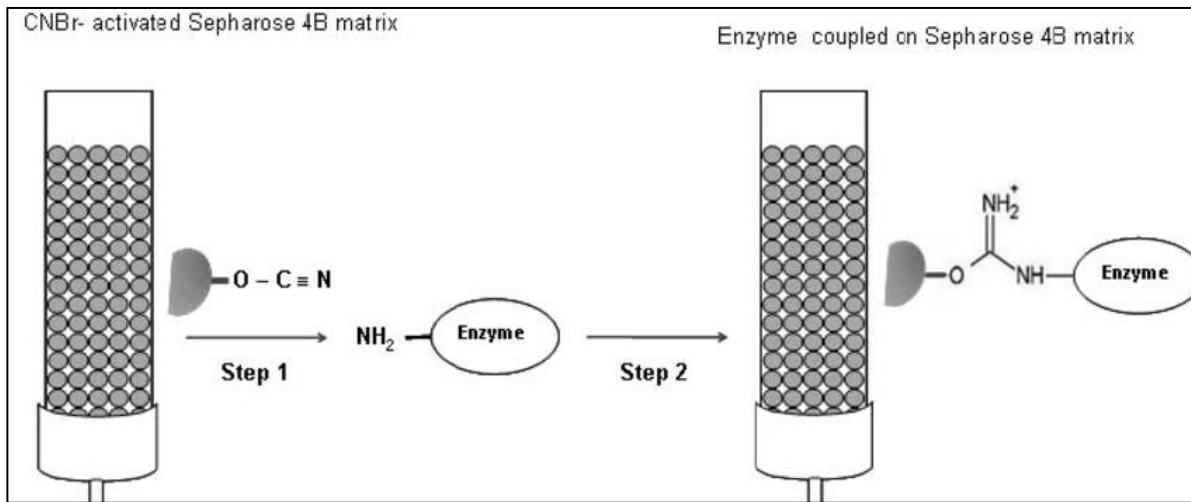
3. Лизоцим (1,65 мкг)



Аффинная хроматография



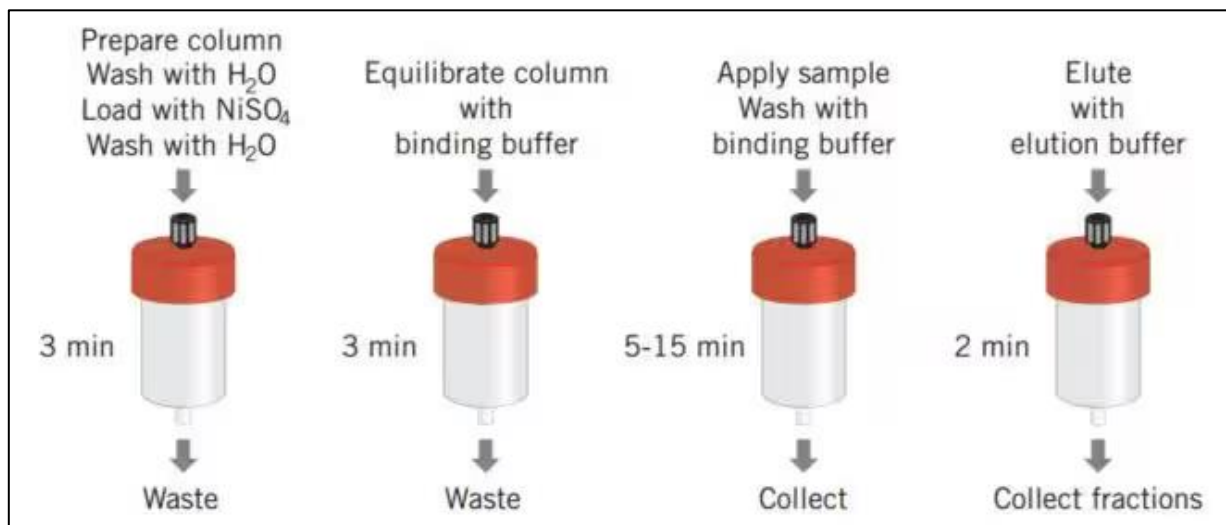
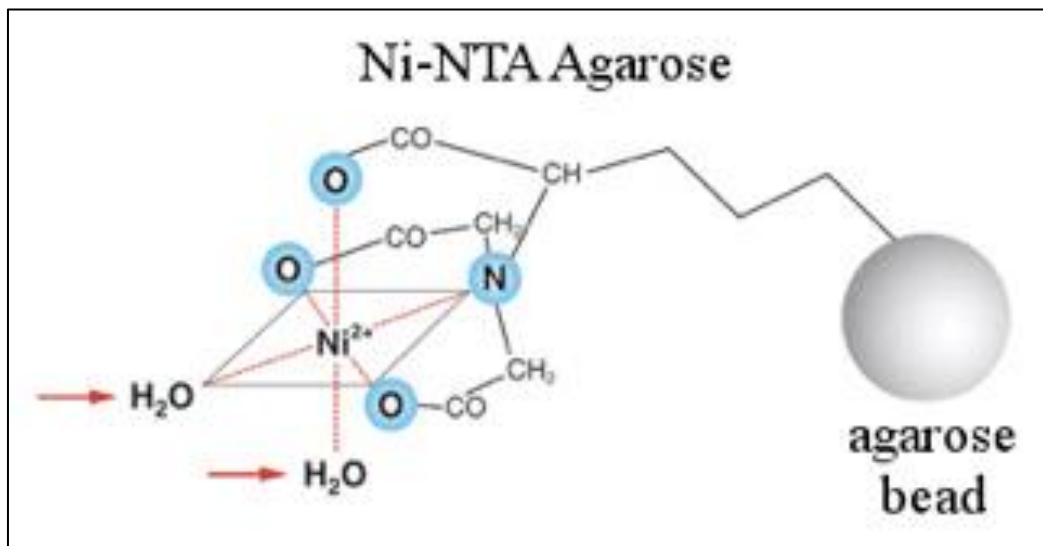
- Под аффинной хроматографией понимают использование иммобилизованного на адсорбенте лиганда, осуществляющего специфический отбор белков, которые связываются с этим лигандом.
- После адсорбции фермент может быть элюирован либо неспецифическим образом, например, повышением концентрации соли, либо специфическим в результате замещения белка лигандом из раствора. Следовательно, аффинная хроматография включает две специфические стадии – “аффинную адсорбцию” и “аффинную элюцию”.
- Хотя и существуют некоторые готовые нерастворимые материалы, имитирующие субстрат или настоящие субстраты (крахмал для амилаз, хитин для хитиназ и т.д.), но чаще аффинные адсорбенты необходимо синтезировать. Лигандов может быть много (субстраты и квазисубстраты, ингибиторы и их аналоги), поэтому фирмы-производители пошли по пути изготовления носителя с реакционными группами, к которым затем присоединяют необходимый лиганд.



Таким носителем является, например, сефароза, обработанная бромцианом (бромциан вступает в реакцию с гидроксильной группой агарозной матрицы). $-OH + BrCN = -O-C\equiv N + Br^- + H^+$ Активированная агароза быстро взаимодействует с первичными аминами. Например, белки присоединяются по аминогруппе ϵ -лизина.

Основные требования к аффинной адсорбции

1. Лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало серьезных затруднений.
2. Удлиняющий мостик между матрицей и лигандом должен облегчать доступ белка к лиганду.
3. Неспецифическое взаимодействие не должно быть слишком сильным, чтобы сопутствующие белки не могли связаться с адсорбентом. 4. Связь лиганда с матрицей должна быть стабильна в условиях хроматографии и в процессе регенерации адсорбента.



ÄKTA™ pure™ — это высокоточная, модульная хроматографическая система, разработанная компанией **Cytiva** (ранее **GE Healthcare**) для автоматизированной очистки белков, нуклеиновых кислот и других биомолекул. Широко используется в научных лабораториях, биотехнологии и фармацевтической разработке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков // Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. - 42 с.
2. Щелкунов С.Н. «Генетическая инженерия», Учебно-справочное пособие. 3-е изд. Новосибирск: СУИ, 2008 – 514 с
3. Жимулев И.Ф. «Общая и молекулярная генетика» учебное пособие. Новосибирск: СУИ, 2007.
4. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, NY.
5. Маниатис Т., Фрих Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984.