

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное
государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Иркутский государственный университет»
Биолого-почвенный факультет

Доклад по дисциплине: «Физико-химические методы в
биологии»

Тема: «Выбор рациональной схемы разделения
пептидов»

Подготовили: Бобкова Варвара,
Горбунова Анна
Студенты 2 курса группы 04212-ДБ

Чем белки (пептиды) отличаются друг от друга?

Свойство	Различия	Метод разделения
Аминокислотный состав	Заряженность молекулы Гидрофобность	Ионообменная хроматография Капиллярный электрофорез Гидрофобная хроматография
Специфические сайты связывания	Аффинность к другим молекулам	Аффинная хроматография
Количество АК-остатков	Размер	Гель-проникающая хроматография Гель-электрофорез

Ионообменная хроматография

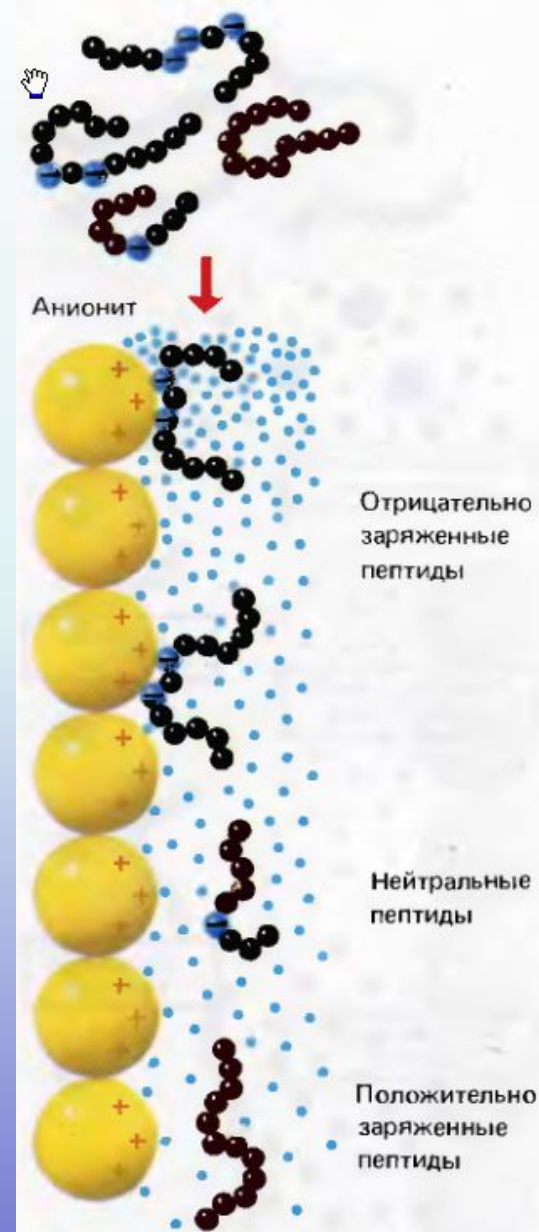
Принцип – взаимодействие зарядов белка (пептида) с заряженными группами на поверхности носителя.

Носитель:

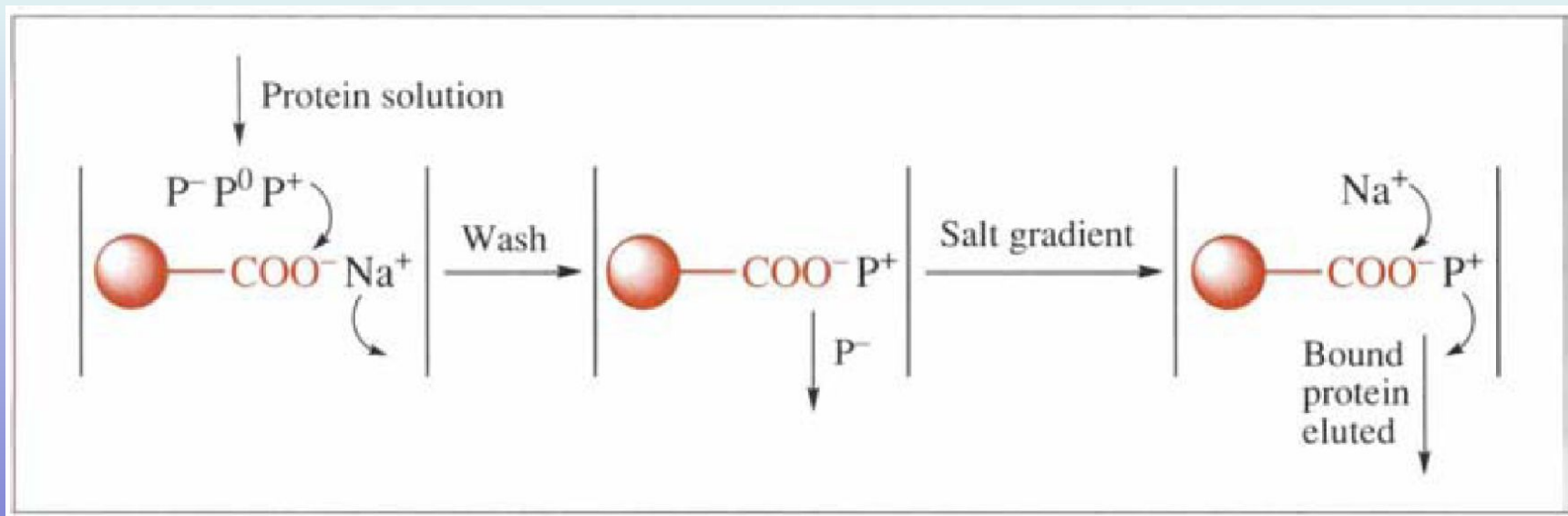
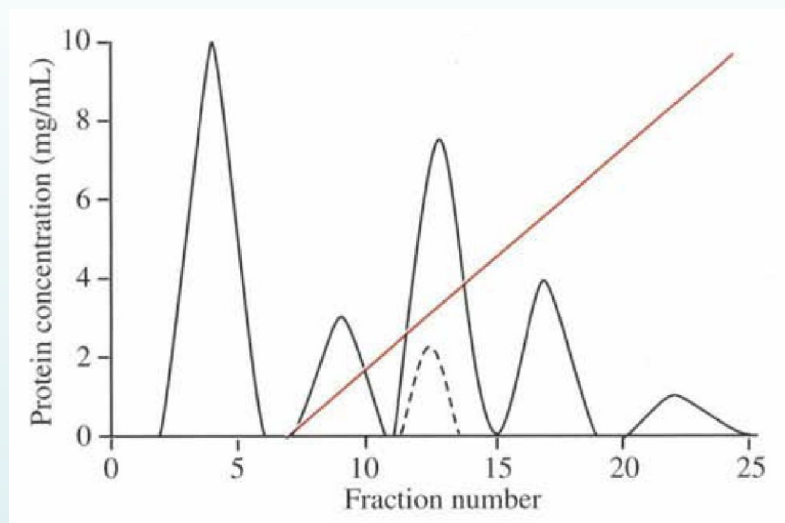
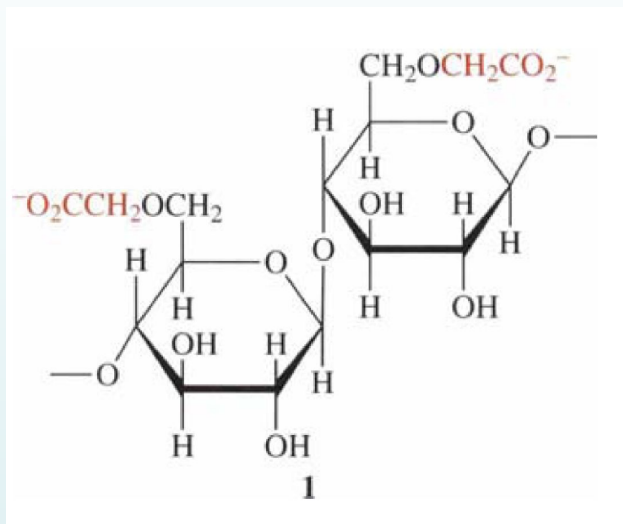
Для **небольших пептидов** проводят хроматографирование на полимерных катионитах (**сульфированный** сополимер стирола и дивинилбензола) или анионитах ($-N^+R_3$)

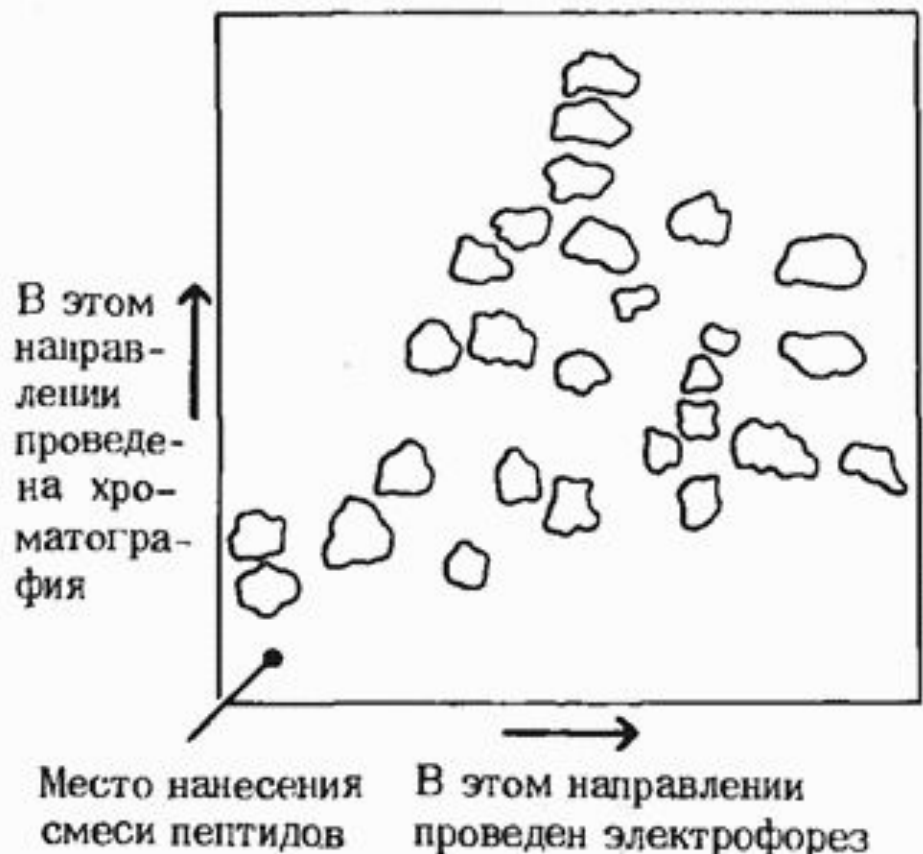
Для выделения **крупных пептидов** (белков) используют носители (целлюлоза, декстран, агароза) способные набухать в водной среде, тем самым обеспечивать лучшие условия проницаемости крупных молекул по сравнению со смолами на основе полистирола.

Exchange group	Abbreviation	Structure	Type
Carboxymethyl	CM	$-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$	Weak cation
Propylsulfonate	SP	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Strong cation
Diethylaminoethyl	DEAE	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHEt}_2^+$	Weak anion
Quaternary methylammonium	Q	$-\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$	Strong anion



Ионообменная хроматография на СМ-целлюлозе

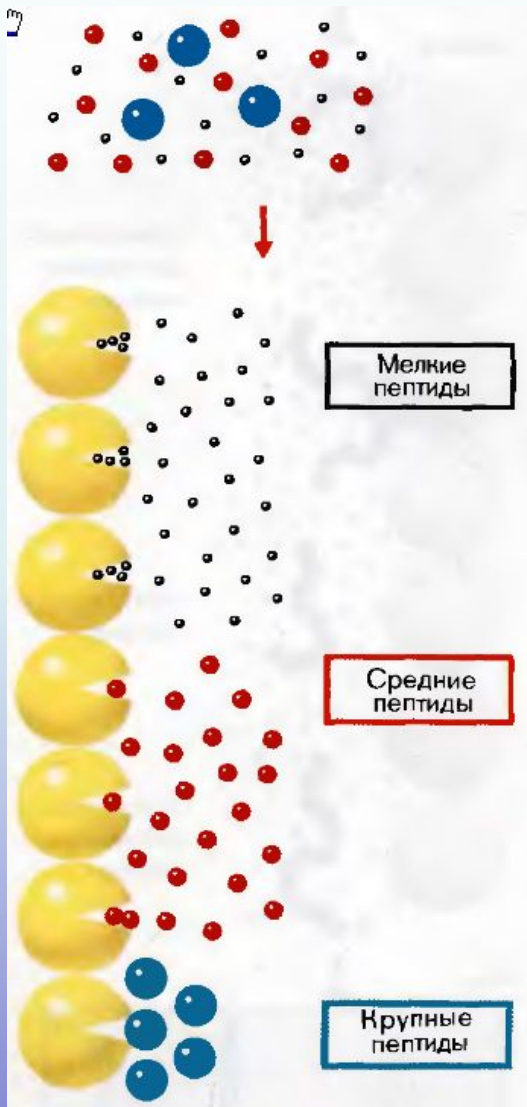




Представляет собой сочетание бумажной и тонкослойной хроматографии с высоковольтным электрофорезом.

«Пептидные карты».

Гель-хроматография (гель-фильтрация)

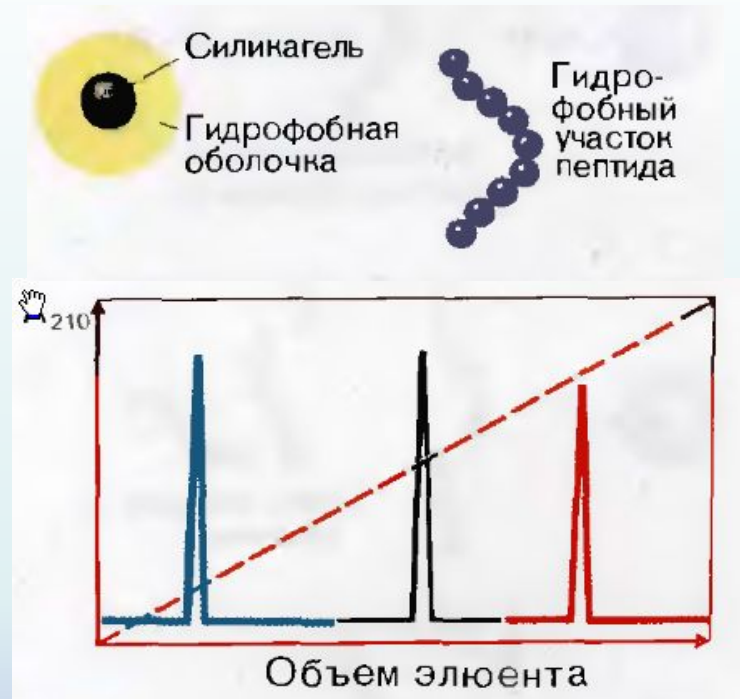
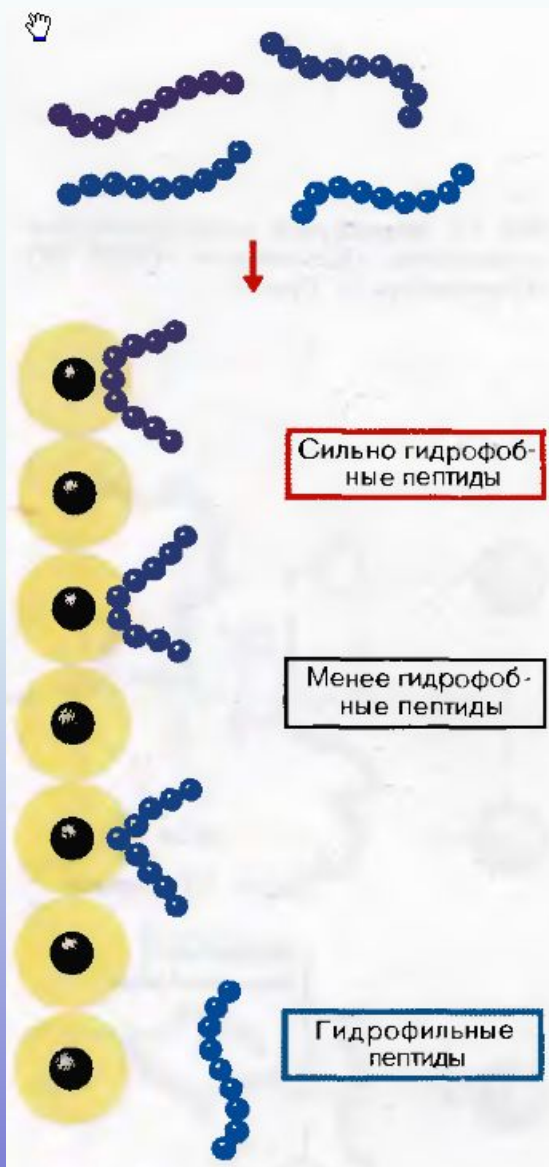


Принцип – разделение по молекулярной массе белков (пептидов)

Носитель: гидрофильные декстраны с поперечными сшивками (сефадексы) и полиакриламидные гели (биогели), которые различаются размером гранул и частотой поперечных сшивок. Выбор носителя определяется молекулярной массой разделяемых пептидов (белков)

Недостаток – невозможно разделить молекулы с близкими массами

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)



Принцип – взаимодействие гидрофобных групп носителя с гидрофобными областями (АК) пептида (белка)

Носитель: силикагель с привитыми гидрофобными цепями (или группами)

- Идеален для разделения смесей небольших пептидов (например после ферментативного расщепления)
- Высокая скорость разделения
- Воспроизводимость
- Высокая чувствительность (небольшие количества)

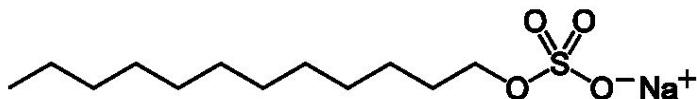
Электрофорез

Электрофорез белков — способ разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки.

Электрофорез белков применяют как для анализа компонентов смеси белков, так и для получения гомогенного белка.

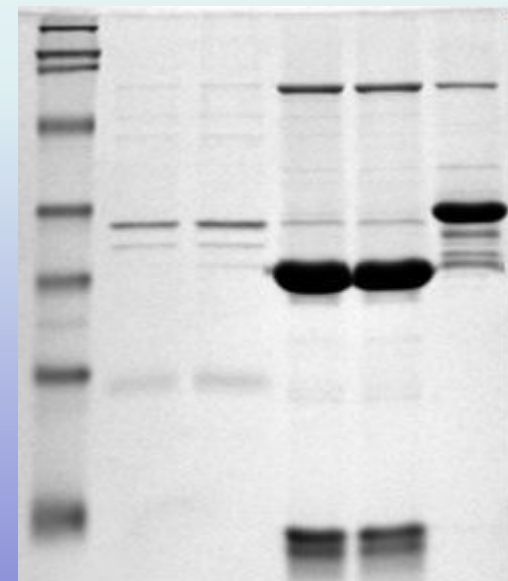
Проблема: электрофоретическая подвижность зависит от заряда белка и его молекулярной массы (пространственной конфигурации)

Наиболее распространенным вариантом электрофоретического анализа белков, является электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE, 1970 году Лэммли (U. K. Laemmli)).



SDS

1. белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;
2. количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;
3. собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS.
4. Полипептиды имеют одинаковый удельный заряд и разделяются обратно пропорционально логарифму их молекулярной массы.



Для визуализации результатов электрофореза чаще всего используют окрашивание гелей красителем Кумасси (Coomassie blue) или серебром

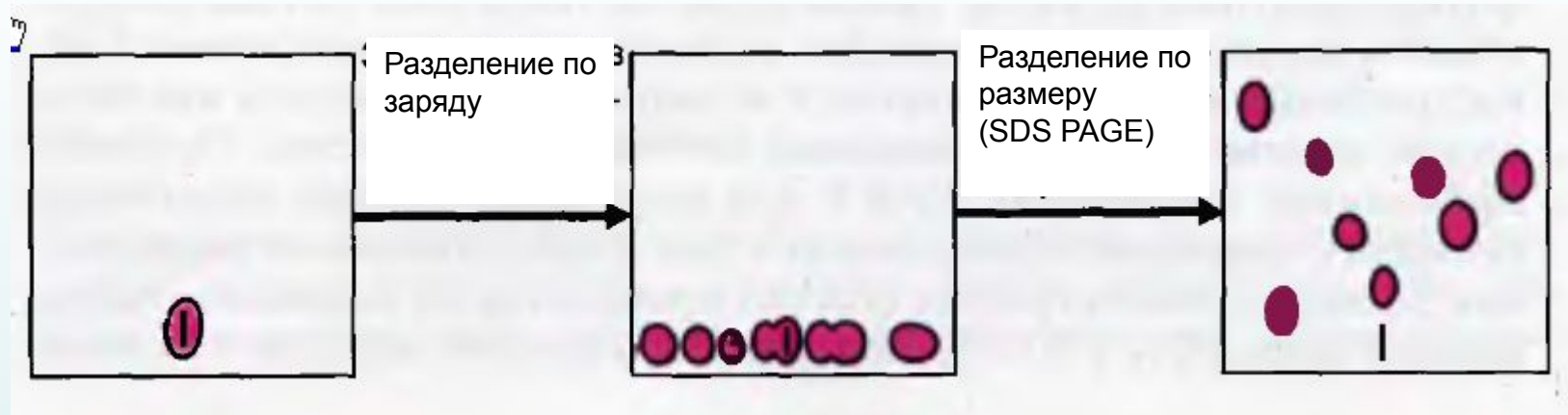
Источники:

- Ю.А. Овчинников «Биоорганическая химия» стр 53-56
- https://npcriz.ru/products_and_services/products/peptide_complexes/

**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!**

ВНИМАНИЕ!

2-D электрофорез



Двумерный электрофорез (2-DE 2-D электрофорез) используется для анализа белковых молекул. Смесь белков разделяется в двух направлениях по 2 различным свойствам. К таким **свойствам** относятся – **изоэлектрическая точка, масса белка в нативном и денатурированном состоянии**.

Двумерный электрофорез начинается с одномерного, а затем разделенные молекулы подвергаются второму разделению в направлении 90 градусов по направлению к первому фореу.

Мало вероятно что 2 молекулы будут обладать двумя одинаковыми индивидуальными свойствами, поэтому белки более эффективно разделяются 2-D электрофорезом, чем обычным электрофорезом.

Изоэлектрическая точка (IEP) – значение pH при котором молекула не заряжена (нейтральна).

1. Разделение по изоэлектрической точке

Разделение белков (пептидов) по IEP называется **изоэлектрическое фокусирование (IEF)**. Белки распределяются по гелю в первом направлении и «накапливаются в изоэлектрической точке (заряд белка нейтральный)

2. Разделение по массе

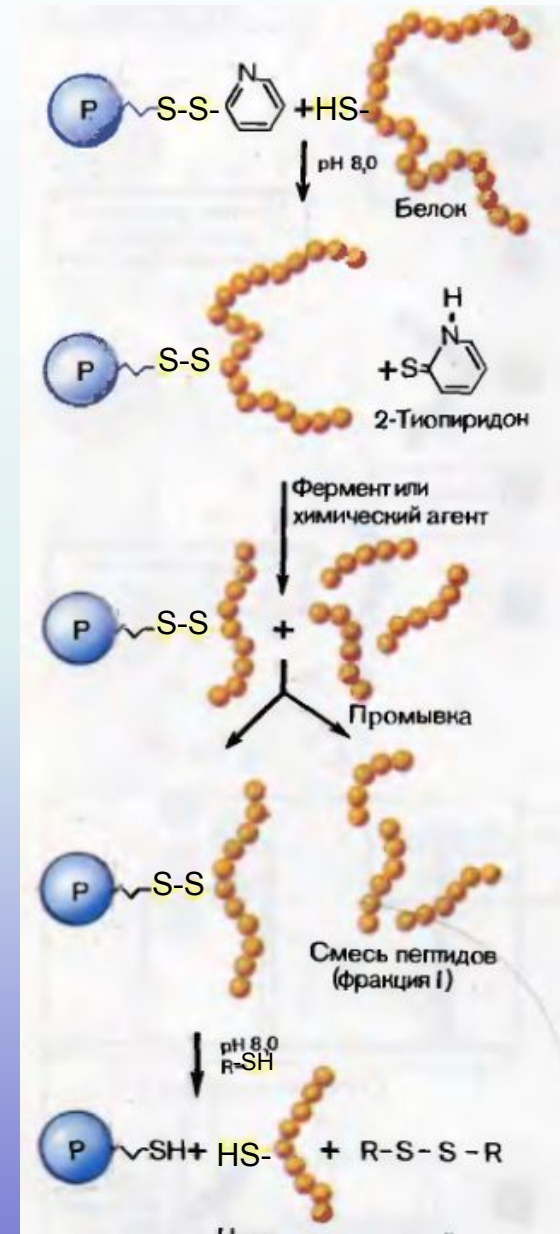
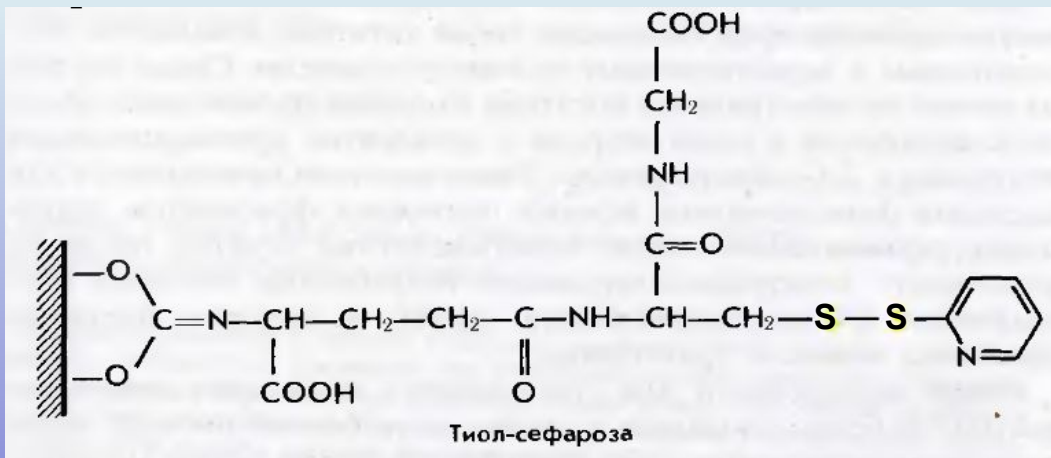
Используется стандартный SDS-электрофорез в направлении перпендикулярном первому.

Хемоспецифическая хроматография

Задача – селективное выделение из смеси пептидов, содержащих определенные функциональные группы (чаще всего SH)

Принцип – образование ковалентной связи между пептидом и носителем

Носитель: сефароза, пористое стекло, кремнезем, содержащие дисульфидную группировку



Аффинная хроматография

Задача – выделить белок (пептид) с низким содержанием в смеси (клеточный экстракт, биологические жидкости)

Принцип – биоспецифическое связывание (сродство) лиганда и белка

Носитель: инертный пористый материал (агароза, полиакриламид, кросс-сшитый декстран, стеклянные шарики), к которому ковалентно через спейсер присоединен лиганд.

Лиганд (моноспецифический): гормоны (рецепторы), ингибиторы ферментов или аналоги ферментных субстратов (ферменты), антитела (антигены), белки (рекомбинантные белки), лектины (гликопротеины), фосфорилхолин (С-реактивный белок).

