

# **Разделение белков и пептидов**

(полученных при специфическом расщеплении)

# Анализ и выделение пептидов (белков)

1. **Препаративное разделение** – выделение одного или нескольких компонентов смеси в индивидуальном состоянии
2. **Аналитическое разделение** – идентификация и количественное определение компонентов в смеси (в том числе химическая и стереохимическая чистота)

Аналитическое разделение может предшествовать препаративному с целью выбора метода разделения и определения его оптимальных условий.

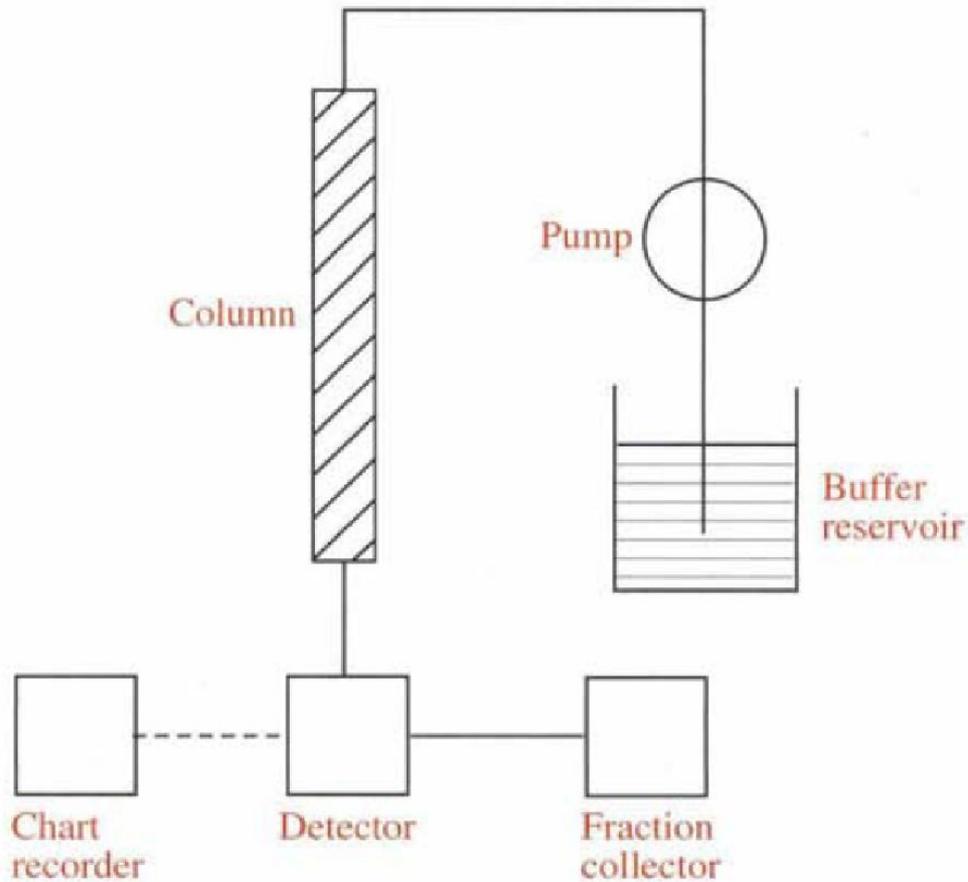
# Методы разделения

1. **Обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография** - используется для разделения белков и пептидов, наиболее популярный вариант ВЭЖХ
2. **Ионообменная хроматография** – один широко используемых в практике методов выделения
3. **Гель-проникающая хроматография (гель фильтрация)** – разделение на основе молекулярной массы
4. **Аффинная хроматография** – разделение с использованием биоспецифических лигандов
5. **Электрофорез** – разделение белков и пептидов на основе различной подвижности в электрическом поле
6. **Многомерное разделение** – 2D-электрофорез и многомерная хроматография наиболее скрупулезный метод анализа

# Чем белки (пептиды) отличаются друг от друга?

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

# Принципиальная схема колоночной хроматографии



1. Уравновешивание
2. Нанесение образца и промывка
3. Элюция
4. Регенерация

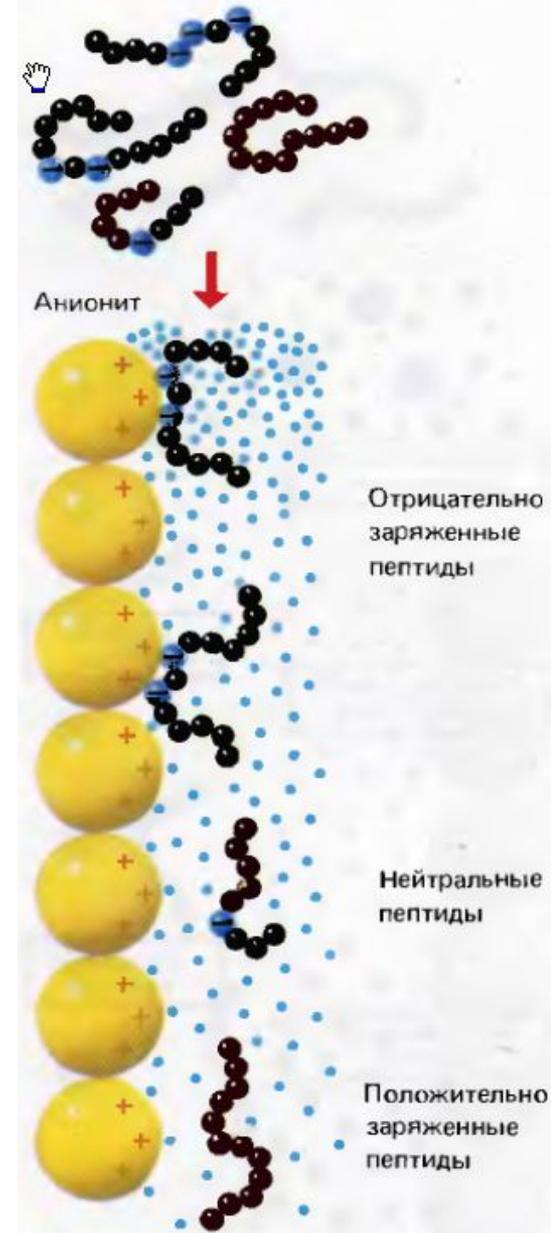
# Ионнообменная хроматография

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

**Носитель:**

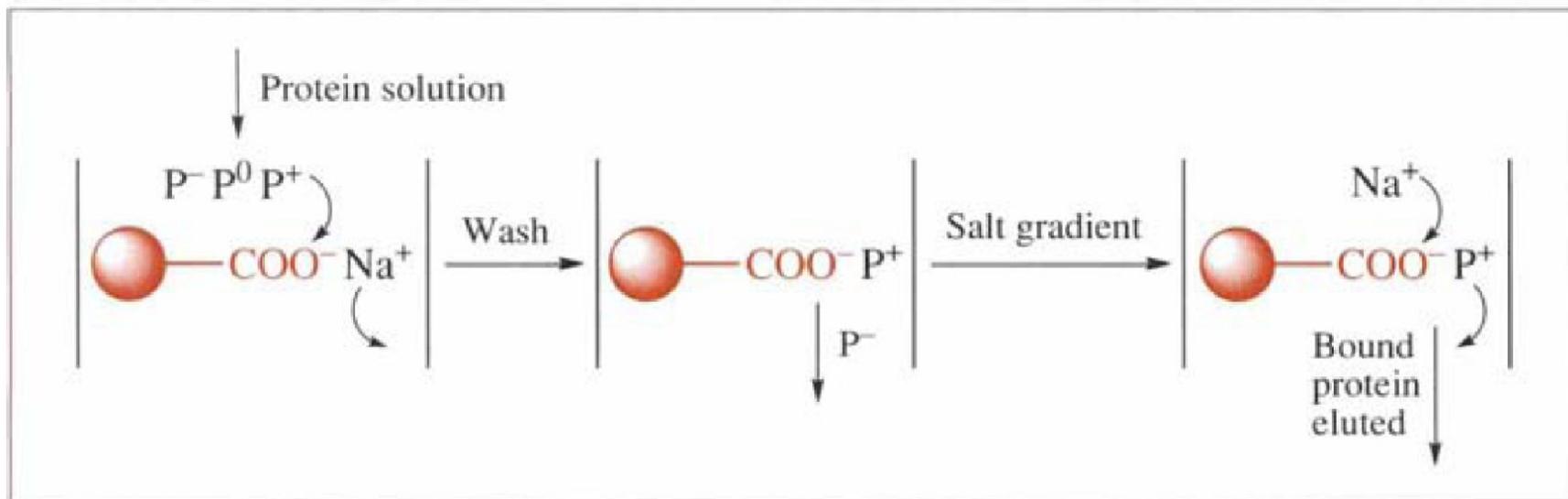
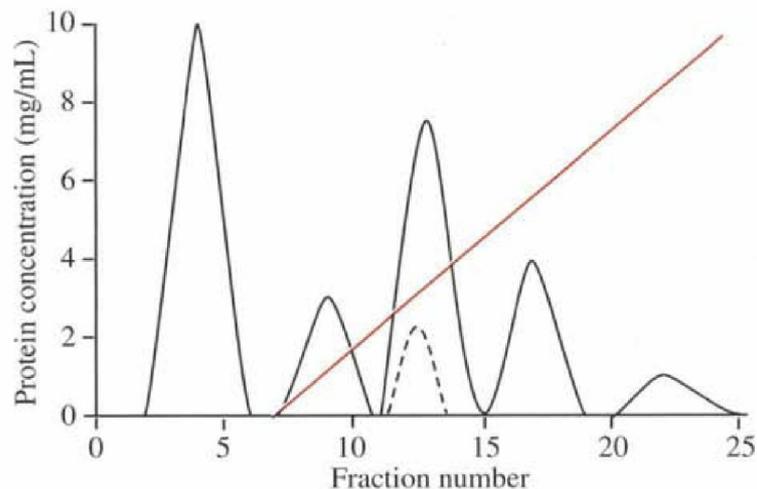
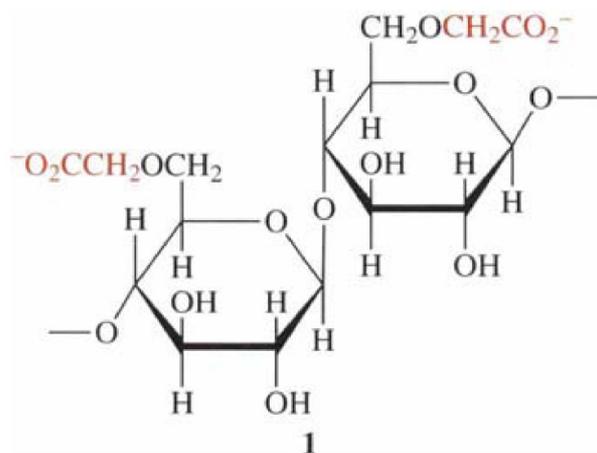
Для **небольших пептидов** проводят хроматографирование на полимерных катионитах (**сульфированный** сополимер стирола и дивинилбензола) или анионитах ( $-N^+R_3$ )

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.

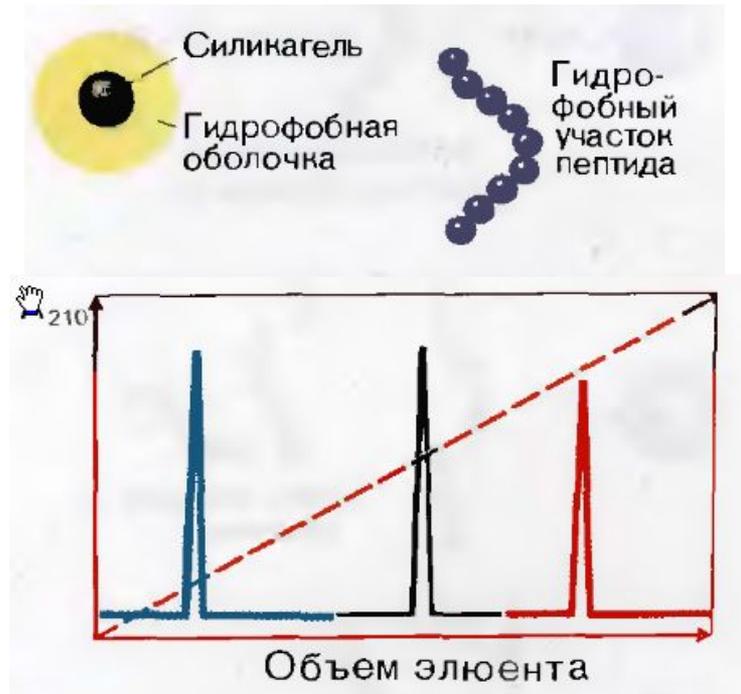
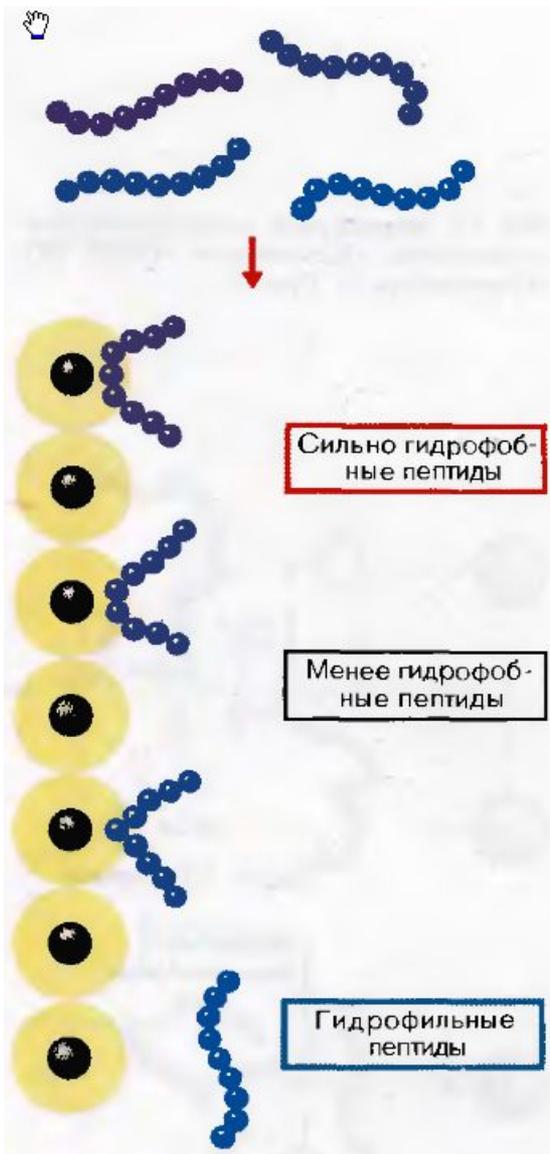


<i>Exchange group</i>	<i>Abbreviation</i>	<i>Structure</i>	<i>Type</i>
Carboxymethyl	CM	$-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$	Weak cation
Propylsulfonate	SP	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Strong cation
Diethylaminoethyl	DEAE	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHEt}_2^+$	Weak anion
Quaternary methylammonium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

# Ионнообменная хроматография на CM-целлюлозе



# Гидрофобная хроматография



**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)

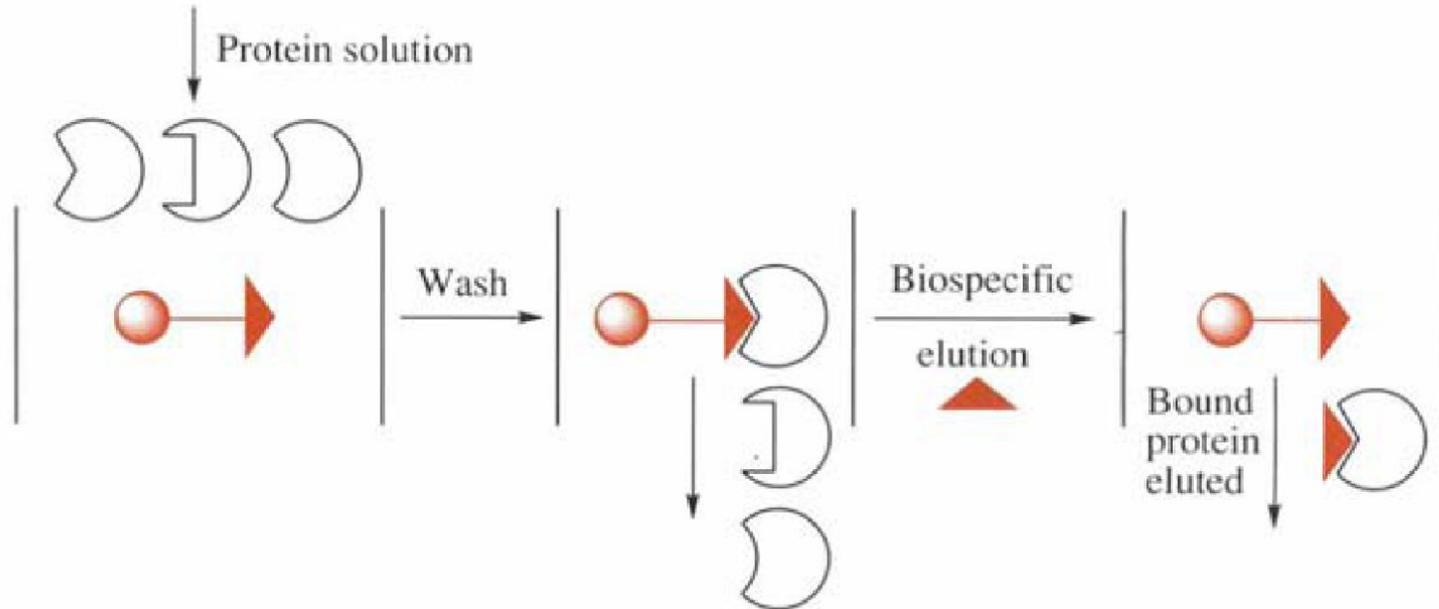
# Афинная хроматография

**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.

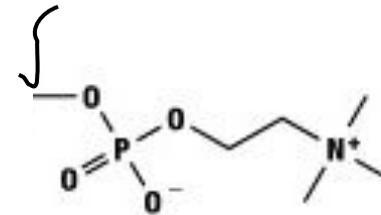
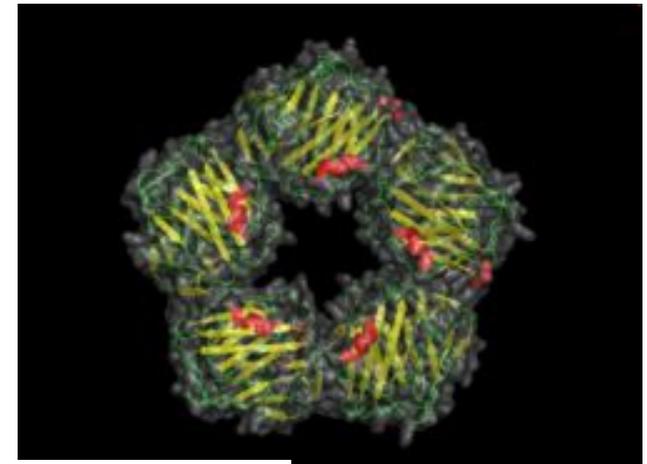
**Лиганд (моноспецифический)**: гормоны (рецепторы), ингибиторы ферментов или аналоги ферментных субстратов (ферменты), антитела (антигены), белки (рекомбинантные белки), лектины (гликопротеины), фосфорилхолин (С-реактивный белок).



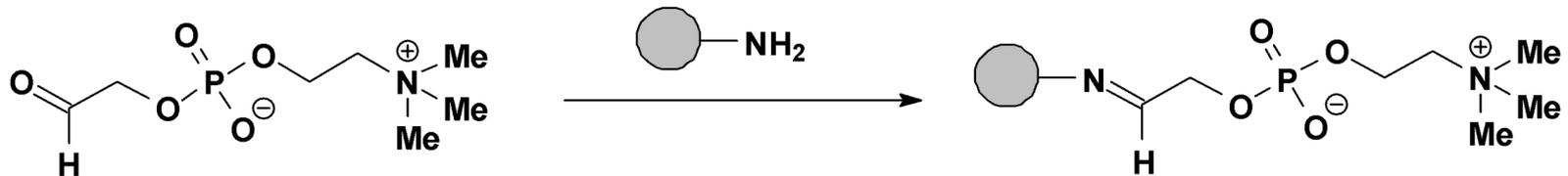
# Афинная хроматография С-реактивного белка

В ответ на инфекцию или повреждение тканей резко увеличивается концентрация некоторых белков плазмы крови, имеющих общее название "белки острой фазы". К этим белкам относится и С-реактивный белок (CRP, от англ. С-reactive protein). С-реактивный белок появляется в сыворотке вскоре после повреждения тканей и начала воспаления.

CRP человека состоит из пяти идентичных, нековалентно связанных полипептидных цепей, образующих замкнутый пентамер. Важное свойство CRP - способность связываться с фосфорилхолином.

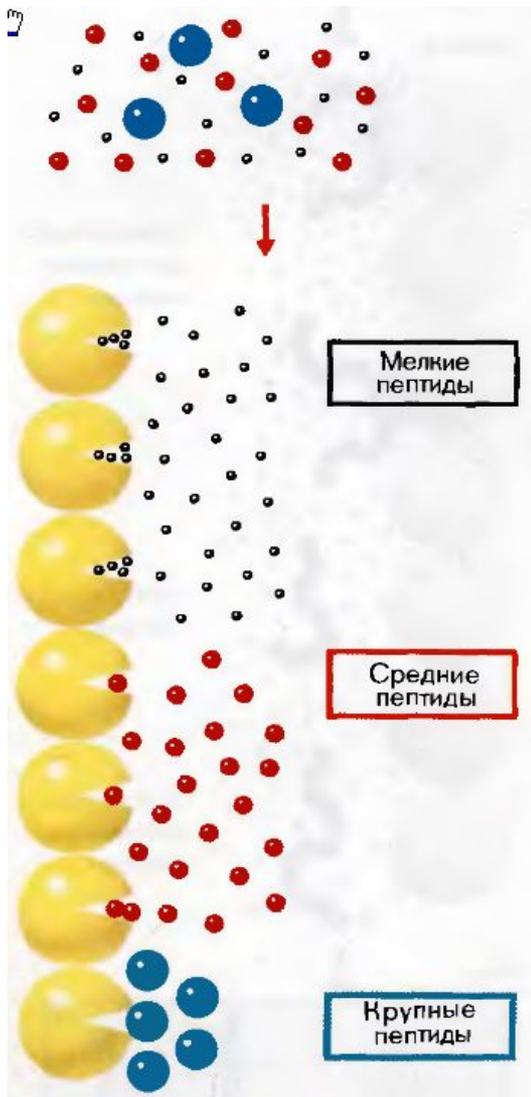


фосфорилхолин



Биоспецифический сорбент

# Гель-хроматография (гель-фильтрация)



**Принцип** – разделение по молекулярной массе белков (пептидов)

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

**Недостаток** – невозможно разделить молекулы с близкими массами!!!

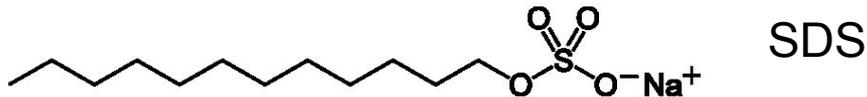
# Электорофорез

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

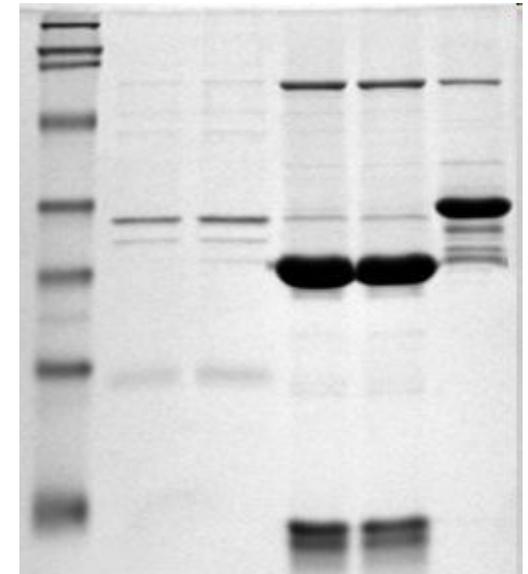
Электрофорез белков применяют как для анализа компонентов смеси белков, так и для получения гомогенного белка.

**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)).

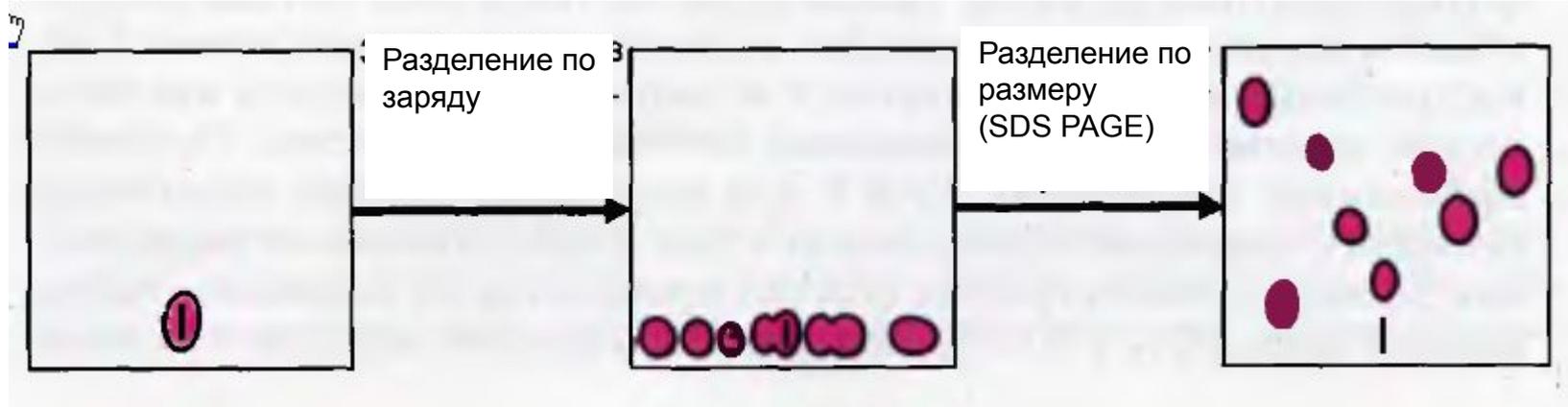


1. белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;
2. количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;
3. собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS.
4. Полипептиды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

# 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 молекулу 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.

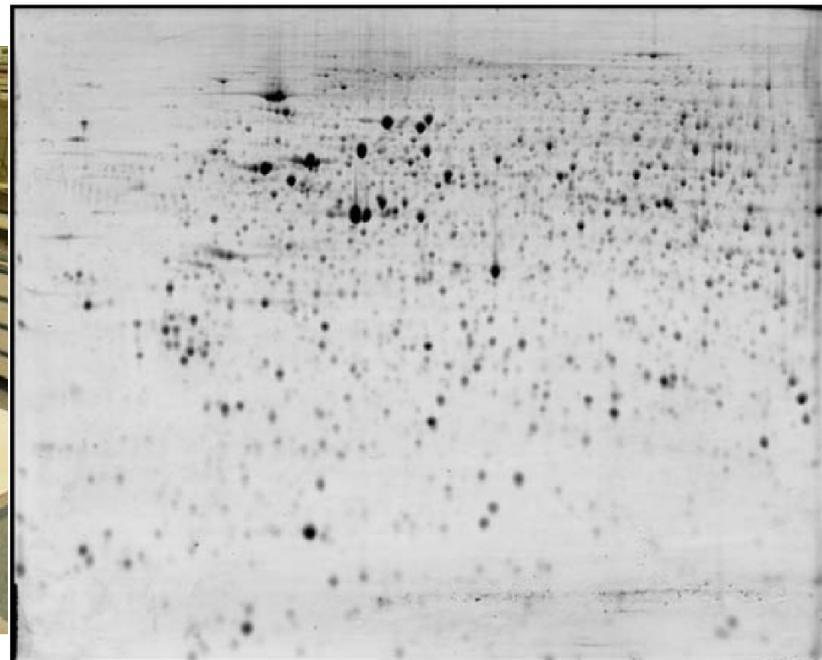
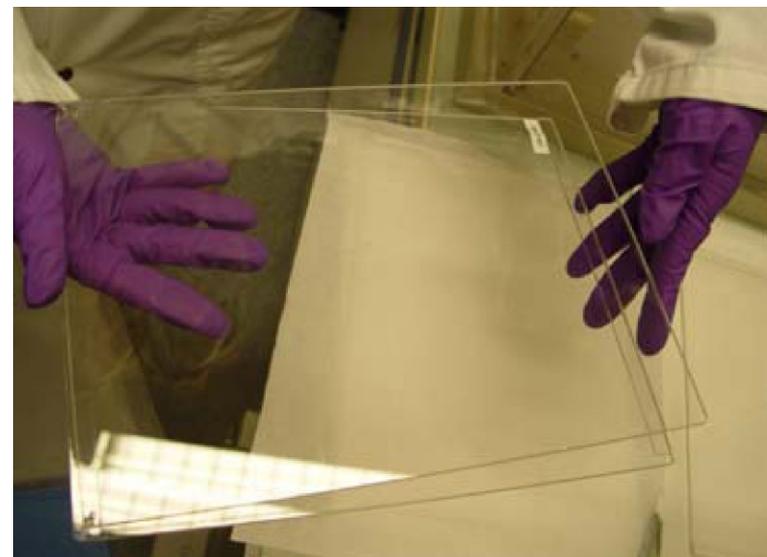
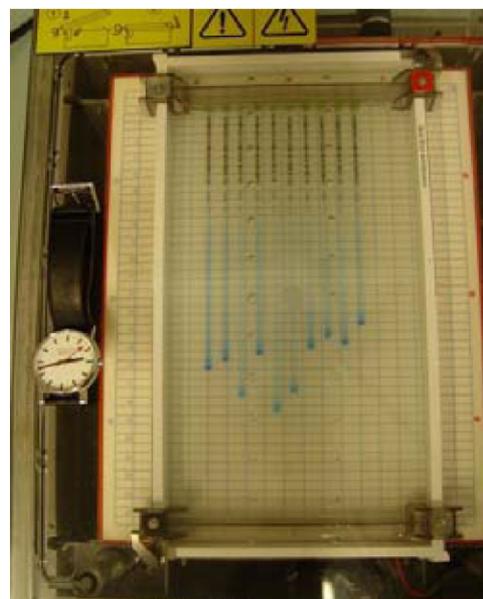
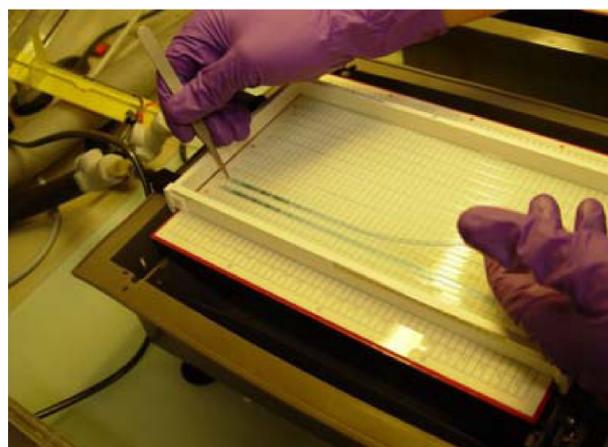
**Изоэлектрическая точка (IEP)** – значение pH при котором молекула не заряжена (нейтральна).

## 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

