

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.

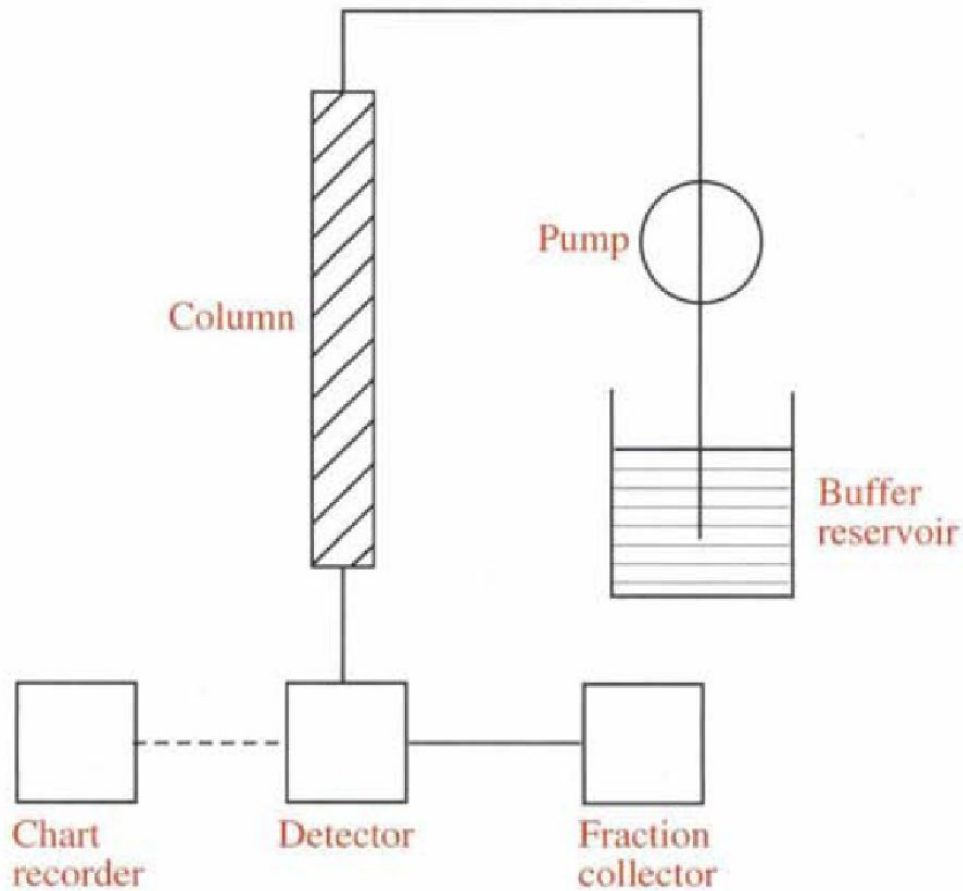
Методы разделения

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?

| 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 |

Принципиальная схема колоночной хроматографии



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

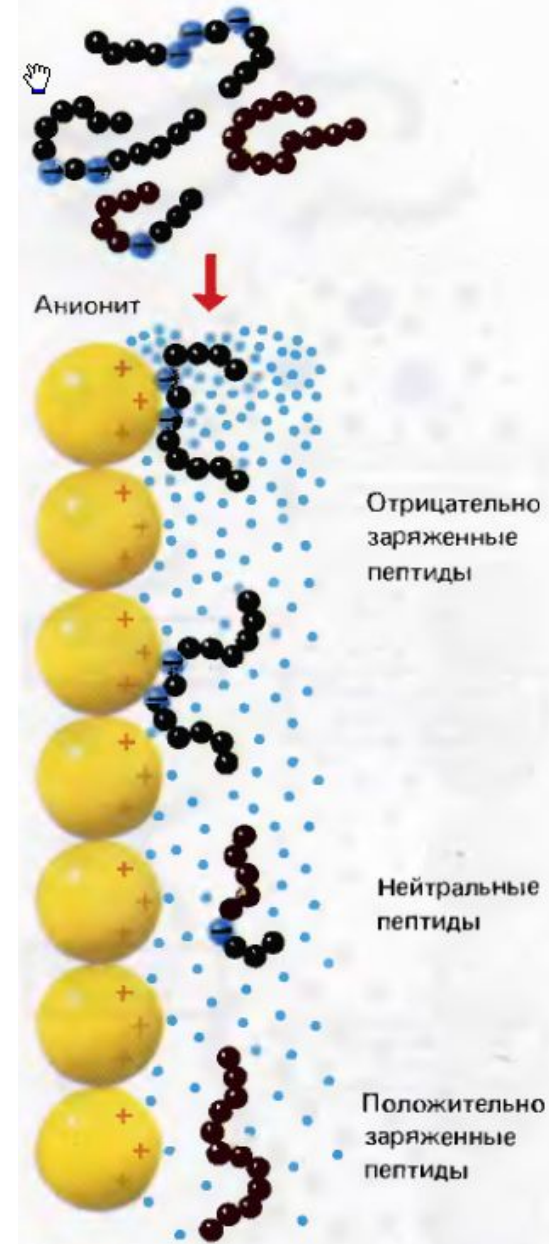
Ионнообменная хроматография

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

Носитель:

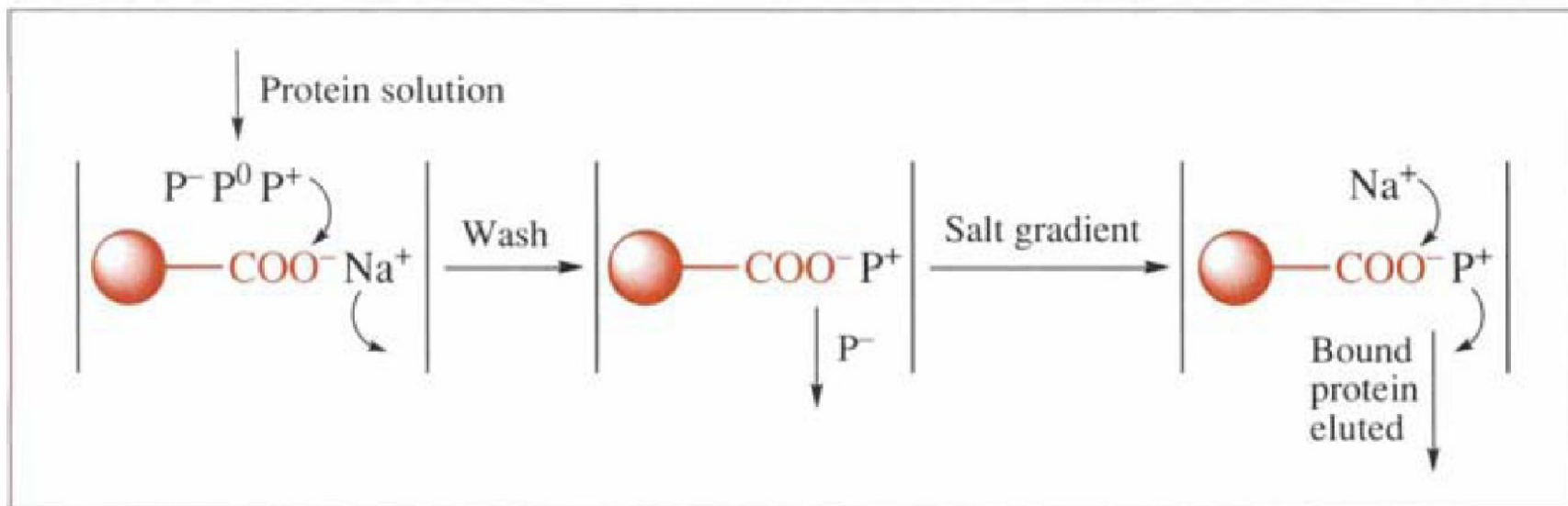
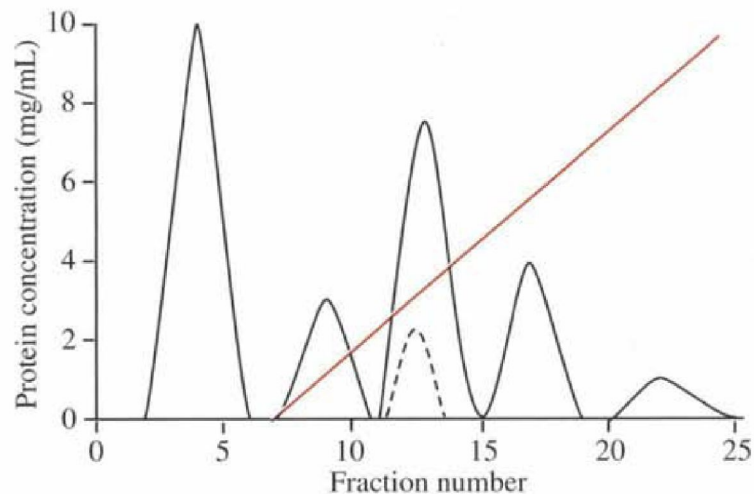
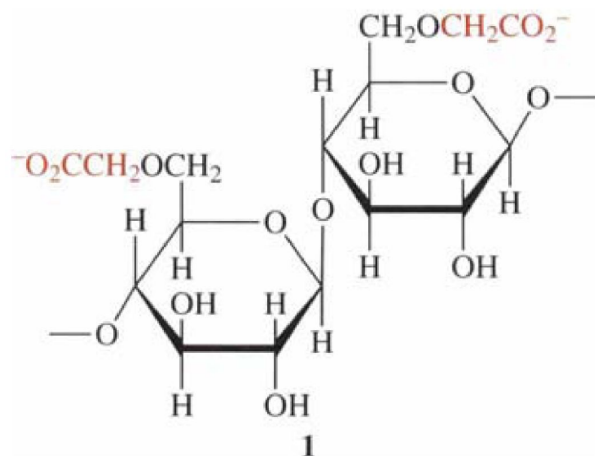
Для **небольших пептидов** проводят хроматографирование на полимерных катионитах (**сульфированный** сополимер стирола и дивинилбензола) или анионитах ($-N^+R_3$)

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.

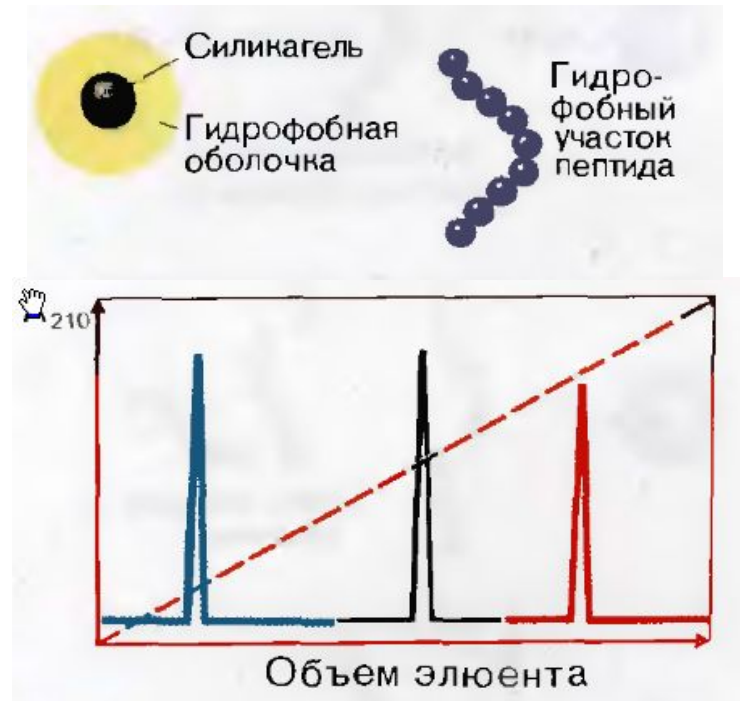
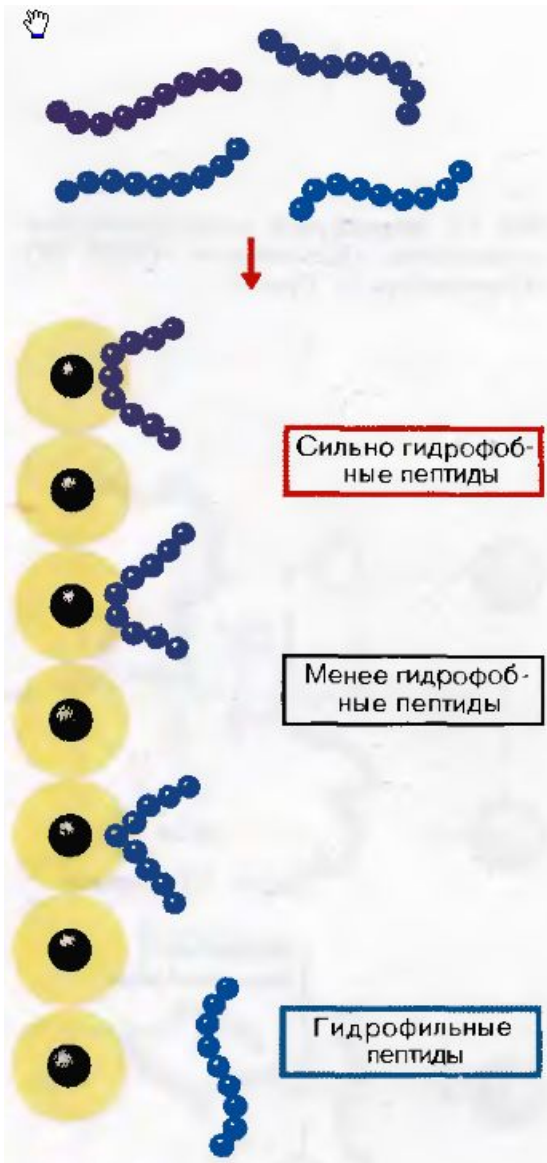


| <i>Exchange group</i> | <i>Abbreviation</i> | <i>Structure</i> | <i>Type</i> |
|---------------------------|---------------------|---|---------------|
| Carboxymethyl | CM | $-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ | Weak cation |
| Propylsulfonate | SP | $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ | Strong 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 СМ-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)

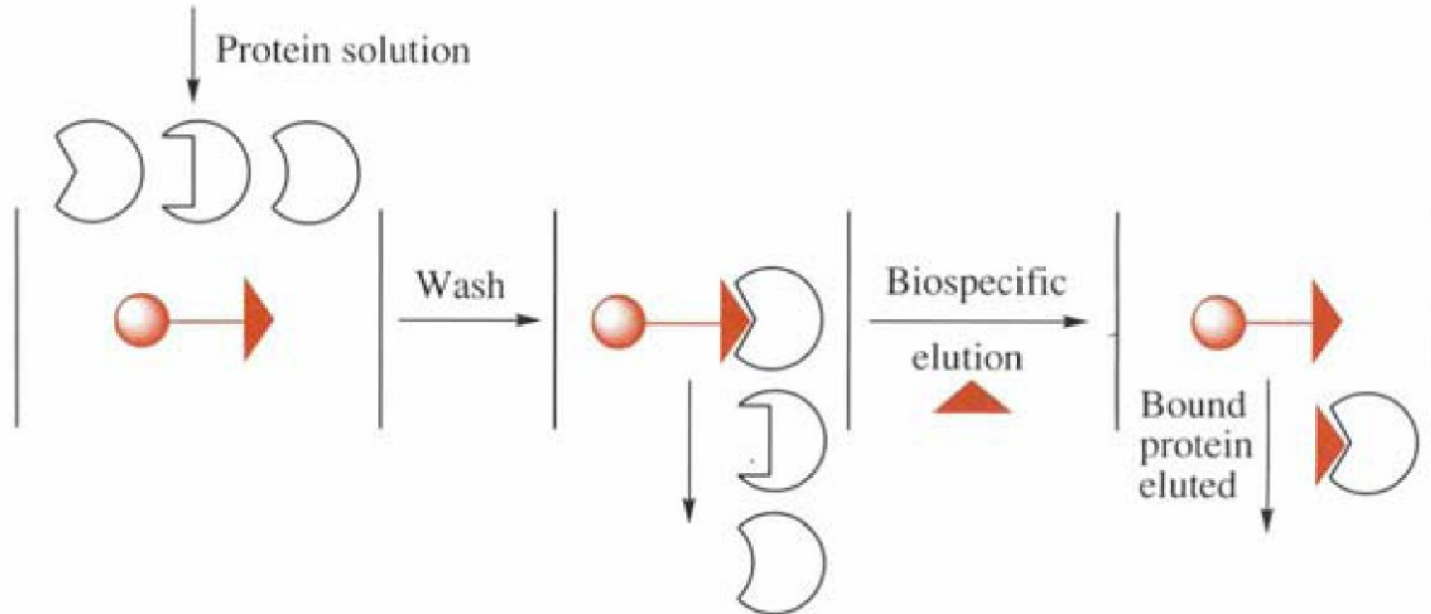
Афинная хроматография

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.

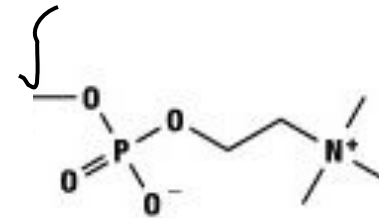
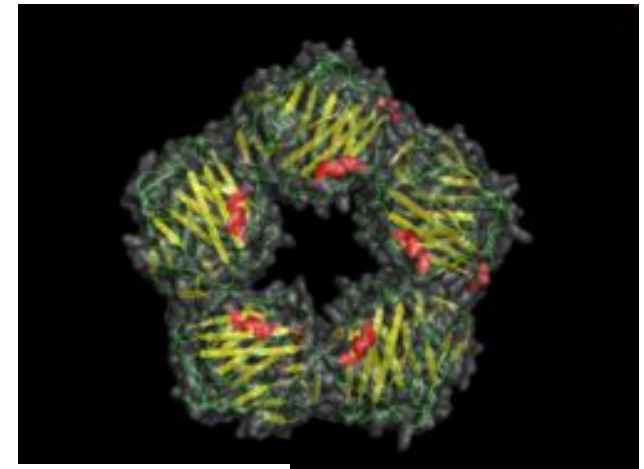
Лиганд (моноспецифический): гормоны (рецепторы), ингибиторы ферментов или аналоги ферментных субстратов (ферменты), антитела (антигены), белки (рекомбинантные белки), лектины (гликопротеины), фосфорилхолин (С-реактивный белок).



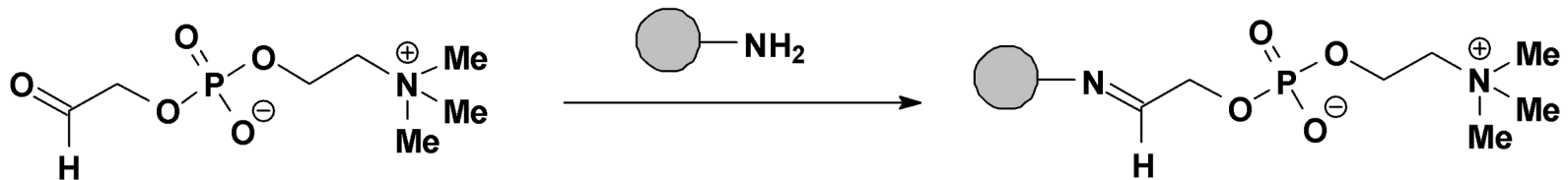
Афинная хроматография С-реактивного белка

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. C-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.

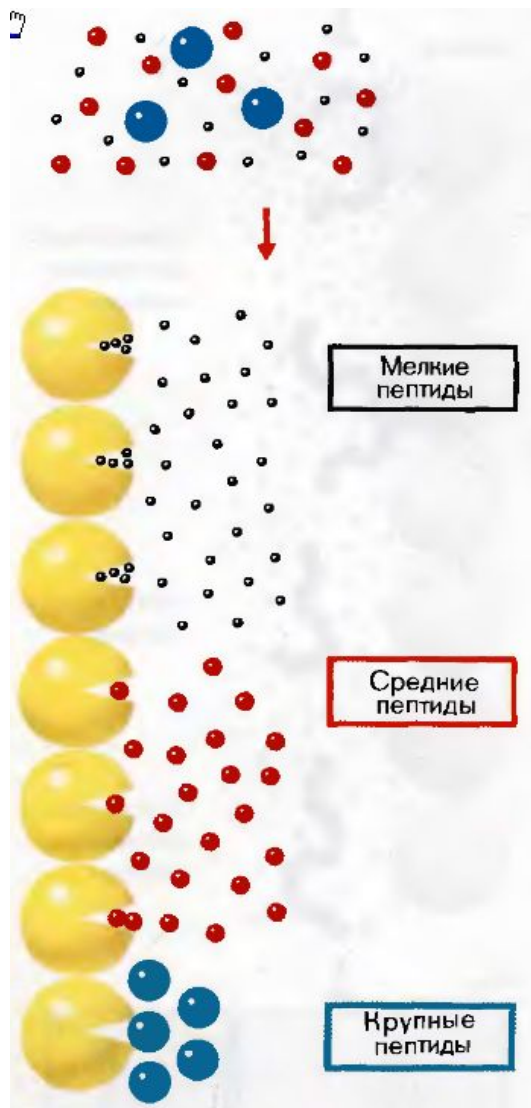


фосфорилхолин



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!!!

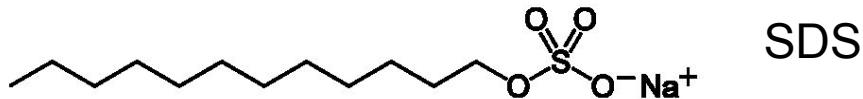
Электорофорез

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

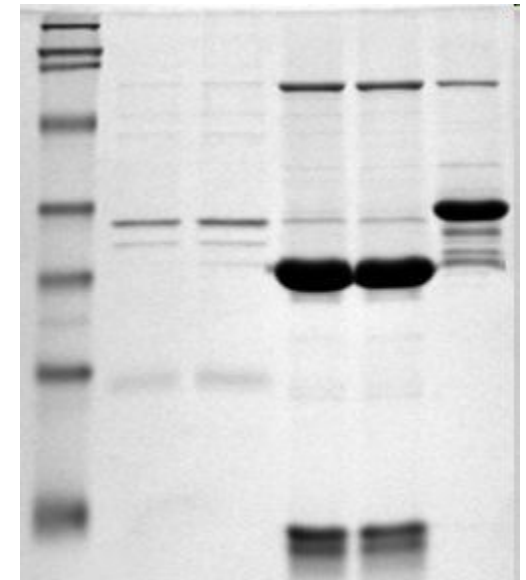
Электрофорез белков применяют как для анализа компонентов смеси белков, так и для получения гомогенного белка.

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)).

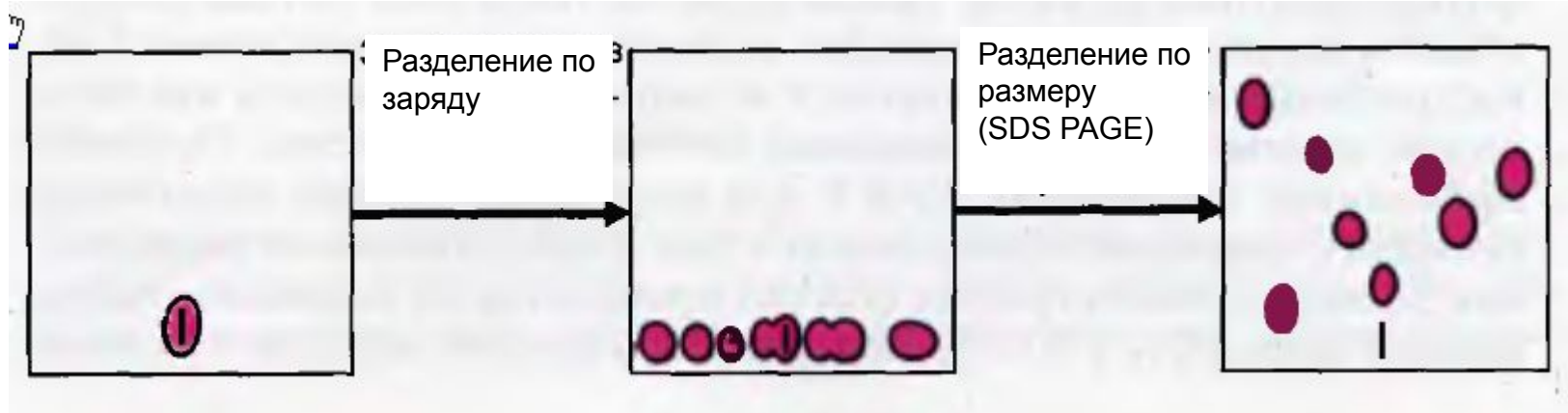


1. белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;
2. количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;
3. собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS.
4. Полипептиды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

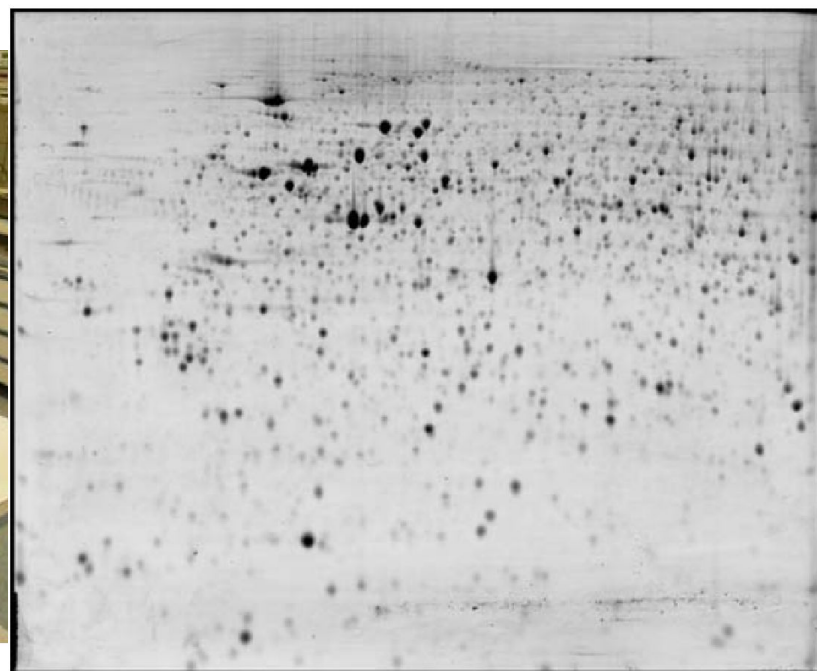
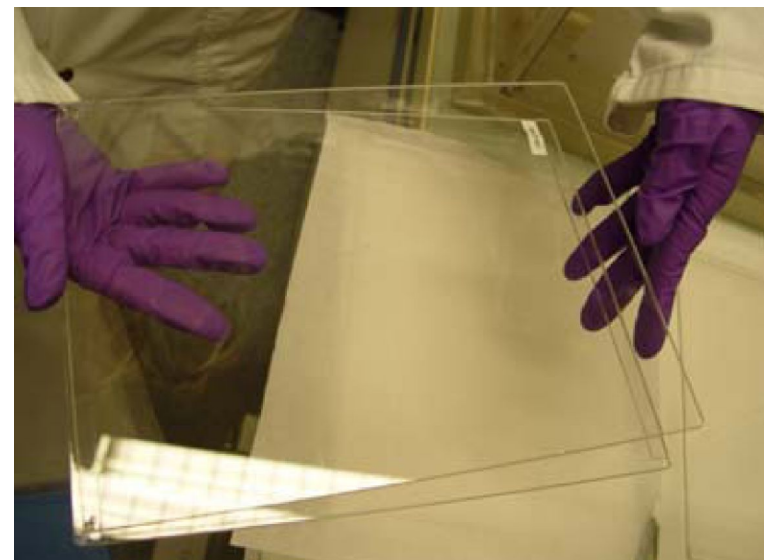
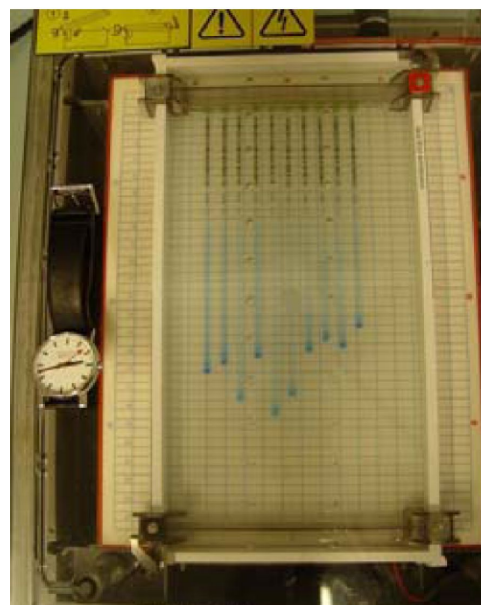
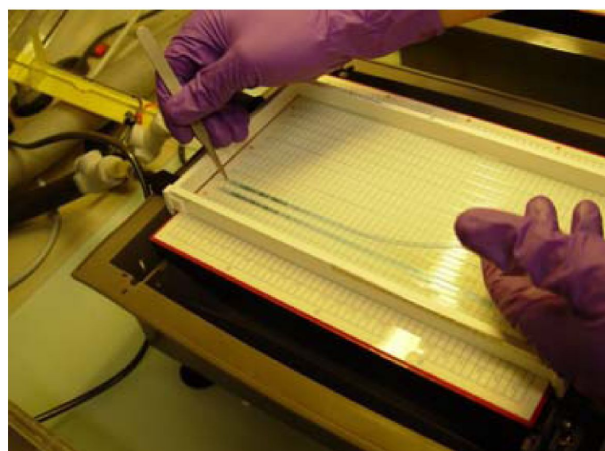
Изоэлектрическая точка (IEP) – значение pH при котором молекула не заряжена (нейтральна).

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

