

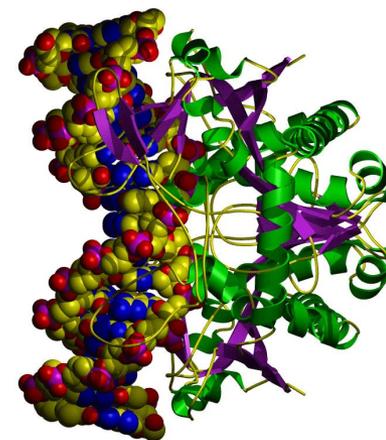
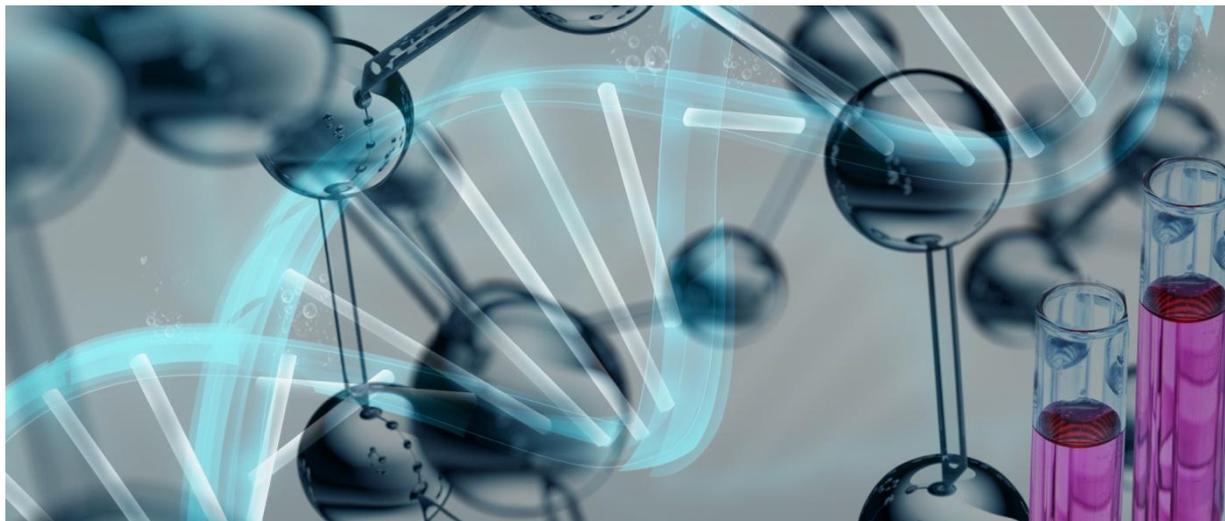
Презентация на тему  
**«Применение аффинной  
хроматографии в выделении  
ферментов»**

Предмет: Методы выделения  
биотехнологических продуктов»

Студентка Гр. Х-450007  
**Краснопольская Т. Е.**

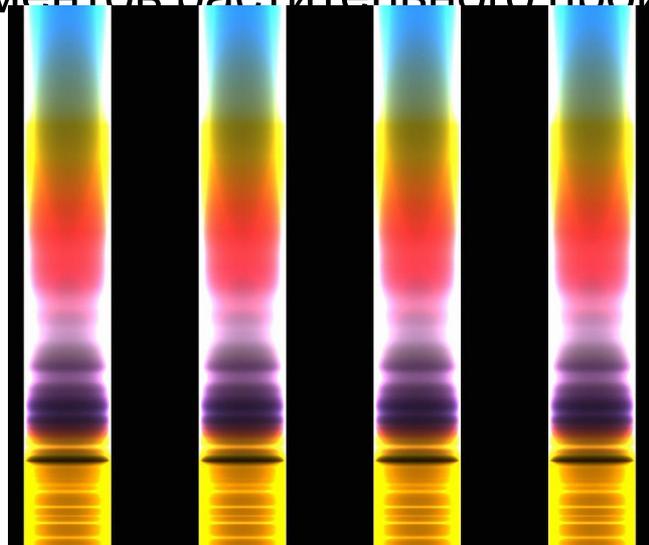


- Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии.
- Ферменты являются высокоактивными нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения.
- Все более широкое применение для выделения и очистки ферментов находит аффинная хроматография, которая открывает новые пути для совершенствования биохимической и химической технологии и создания новых методов биохимического анализа.



# Хроматография

- Хроматография – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами.
- Отличием хроматографических методов от других является возможность разделения близких по свойствам веществ.
- Хроматографический метод анализа был впервые применён русским учёным-ботаником Михаилом Семеновичем Цветом в 1900 году. Он использовал колонку, заполненную кар



разделения

# Хроматография

Достоинства хроматографического анализа:

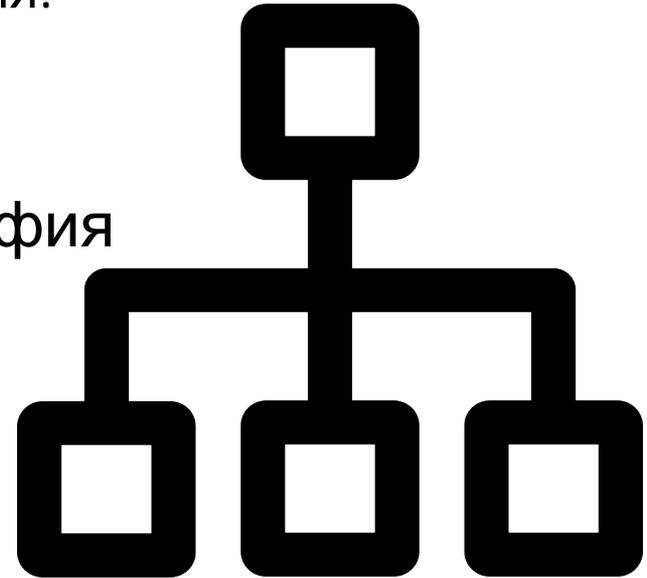
- ✓ экспрессность; высокая эффективность; возможность автоматизации и получение объективной информации;
- ✓ сочетание с другими физико-химическими методами;
- ✓ широкий интервал концентраций соединений;
- ✓ возможность изучения физико-химических свойств соединений;
- ✓ осуществление проведения качественного и количественного анализа;
- ✓ применение для контроля и автоматического регулирования технологических процессов.



# Хроматография

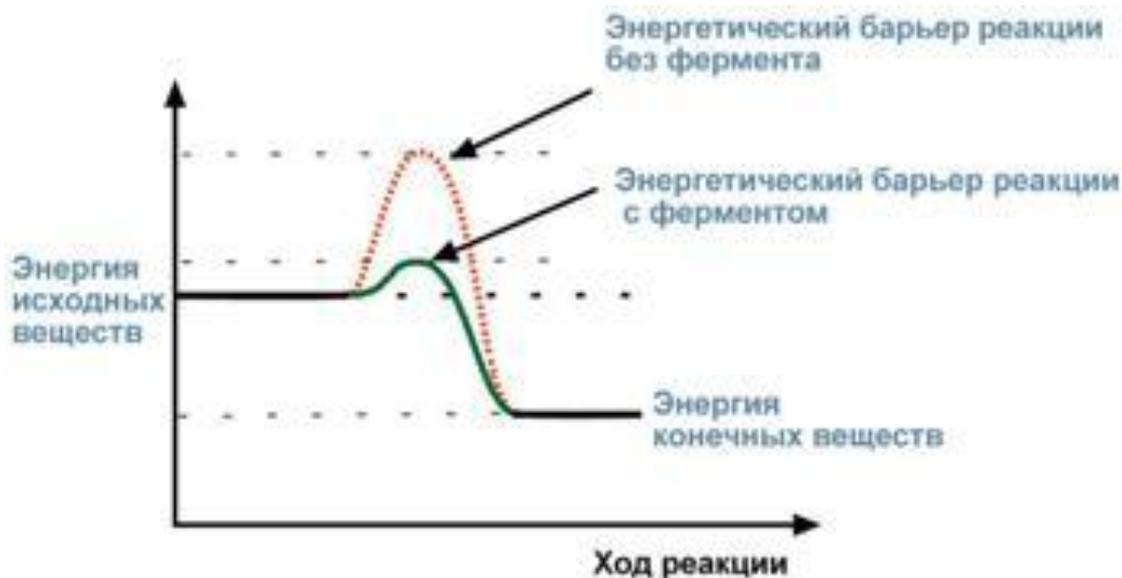
• Классификация:

- 1) Адсорбционная хроматография
- 2) Распределительная хроматография
- 3) Ионообменная хроматография
- 4) Осадочная хроматография
- 5) Аффинная хроматография
- 6) Эксклюзионная хроматография



# Ферменты

- Ферменты — сложные молекулы белка, ускоряющие химические реакции в живых системах.
- По своей функции ферменты являются биологическими катализаторами. Сущность действия ферментов заключается:
  - в активации молекул реагирующих веществ,
  - в разбиении реакции на несколько стадий, энергетический барьер каждой из которых ниже такового общей реакции.



# Ферменты

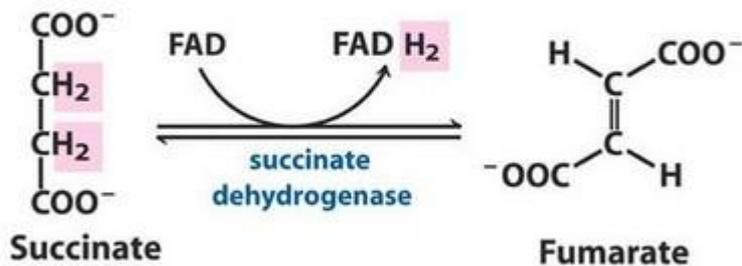
• Ферменты делятся на простые и сложные:

1) Простые ферменты состоят только из аминокис

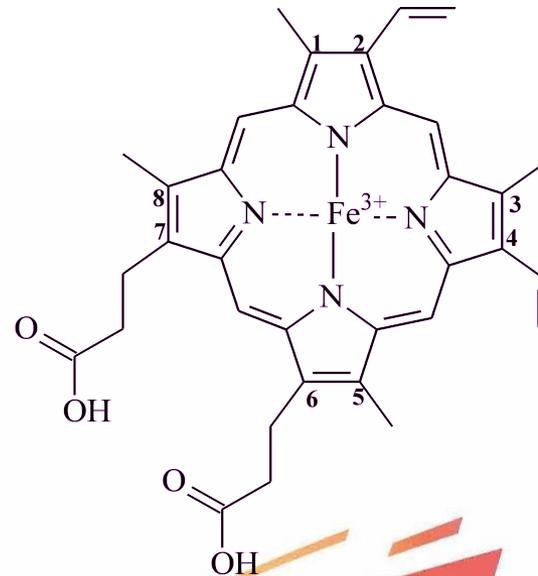


2) Сложные ферменты имеют в своем составе белковую часть, состоящую из аминокислот – апофермент, и небелковую часть – кофактор

## Сукцинатдегидрогеназа



$$\Delta G'^{\circ} = 0 \text{ kJ/mol}$$

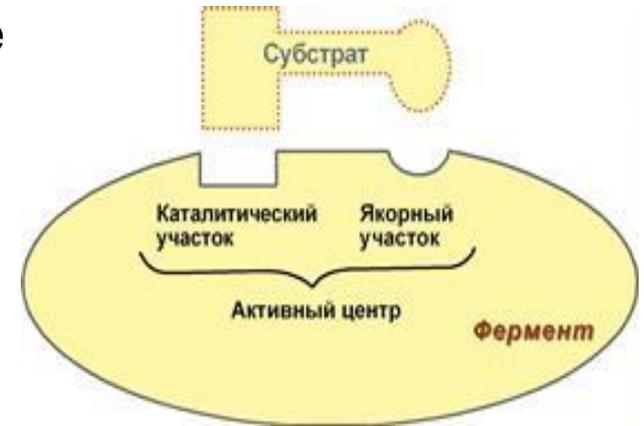


# Состав ферментов

- Активный центр – комбинация аминокислотных остатков, обеспечивающая непосредственное связывание с молекулой субстрата и осуществляющая катализ. В активном центре

- Якорный центр

- Каталитический центр



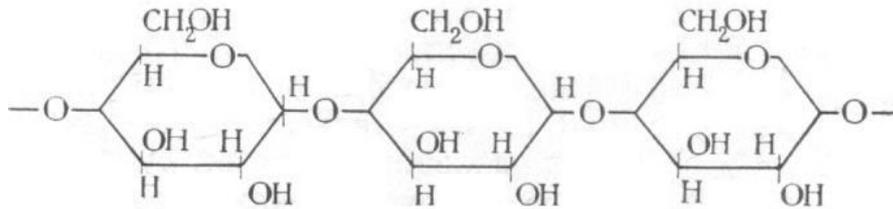
- Аллостерический центр – центр регуляции активности фермента, который пространственно отделен от активного центра и имеется не у всех ферментов



# Аффинная хроматография

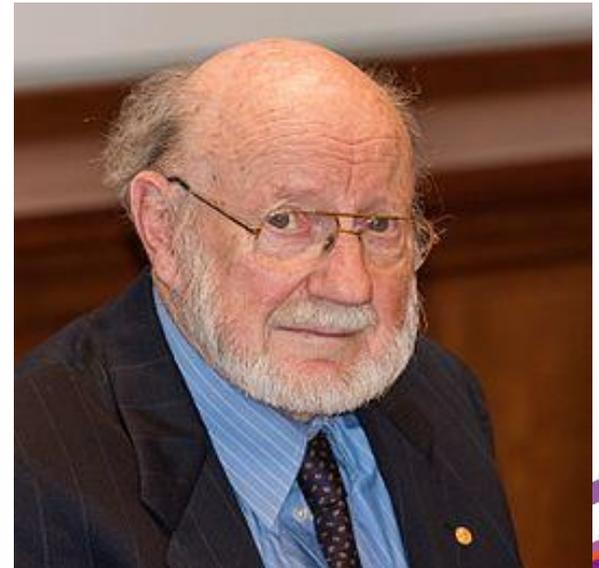
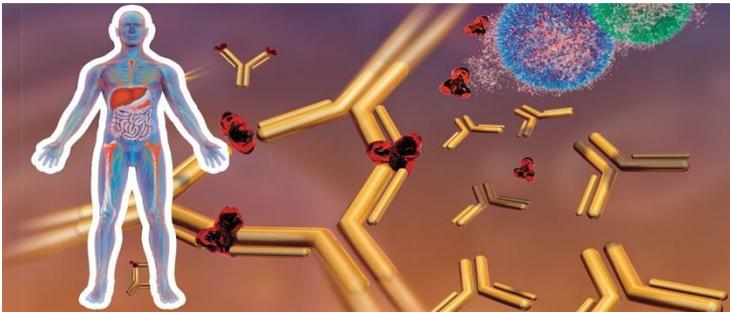
## История метода

- 1910 г. Штаркенштайн – выделение  $\alpha$ -амилазы с помощью нерастворимого субстрата



*Амилоза крахмала*

- 1951 г. У. Кемпбелл – выделение антител на колонке с целлюлозой с ковалентно присоединенным антигеном.



# Аффинная хроматография

## История метода

- 1953 г. Лерман – выделение тирозиназы на колонке с целлюлозой, эфирно связанной остатками резорцина.
- 1968 г. Куатреказас – применение аффинной хроматографии для выделения нуклеазы, химотрипсина и карбоксипептидазы А; предложен термин «аффинная хроматография».



Рис. 10. Модель пространственной структуры фермента тирозиназы, участвующего в биосинтезе меланина (модель на основе PDB 3pt8). Показаны два иона меди в активном центре фермента (сферы розового цвета) и предположительные сайты связывания ионов магния, участвующих в ингибировании фермента (зеленые сферы)



# Аффинная хроматография

## Преимущества метода

- Не требует чистых ферментов и гомогенных изоферментов при проведении разделения.
- Большая быстрота и расход очень небольших количеств фермента для каждого определения.
- Использование аффинной хроматографии для определения, например, констант ингибирования ферментов весьма перспективно.
- Метод аффинной хроматографии открывает новые возможности не только для изучения взаимодействия биологически активных веществ, он перспективен также и для выяснения влияния микроокружения на образование этих комплексов.

# Аффинная хроматография

## Суть метода

- Выделение ферментов основано на их специфическом взаимодействии с лигандами, ковалентно связанными с нерастворимым носителем.
- Сорбентом в этом случае служит гель, к которому присоединен подходящий лиганд, например субстрат фермента.
- Когда раствор, содержащий фермент, пропускают через колонку с соответствующим образом приготовленным сорбентом, взаимодействие этого вещества с закрепленным на сорбенте лигандом (т.е. фермента с его субстратом) приводит к его удерживанию и к концентрированию.
- Поскольку сорбция носит обратный характер, это вещество можно затем элюировать с колонки.

# Аффинная хроматография

Различают две фазы:

- Подвижной фазой служит жидкость, неподвижной фазой может быть твердый сорбент.
- Подвижная фаза аффинной хроматографии должна обладать низкой вязкостью, обеспечивать необходимый уровень селективности, быть дешевой, нетоксичной, инертной, совместимой с методами детектирования.
- Неподвижная фаза представляет собой специально получаемый сорбент, построенный обычно по схеме: носитель - соединяющее звено ("ножка") - специфический лиганд.
- Лигандами могут служить такие субстраты как крахмал или гликоген. Как правило, применяют аналоги субстратов, устойчивые к дальнейшему превращению, т.е. ингибиторы ферментов.

# Аффинная хроматография

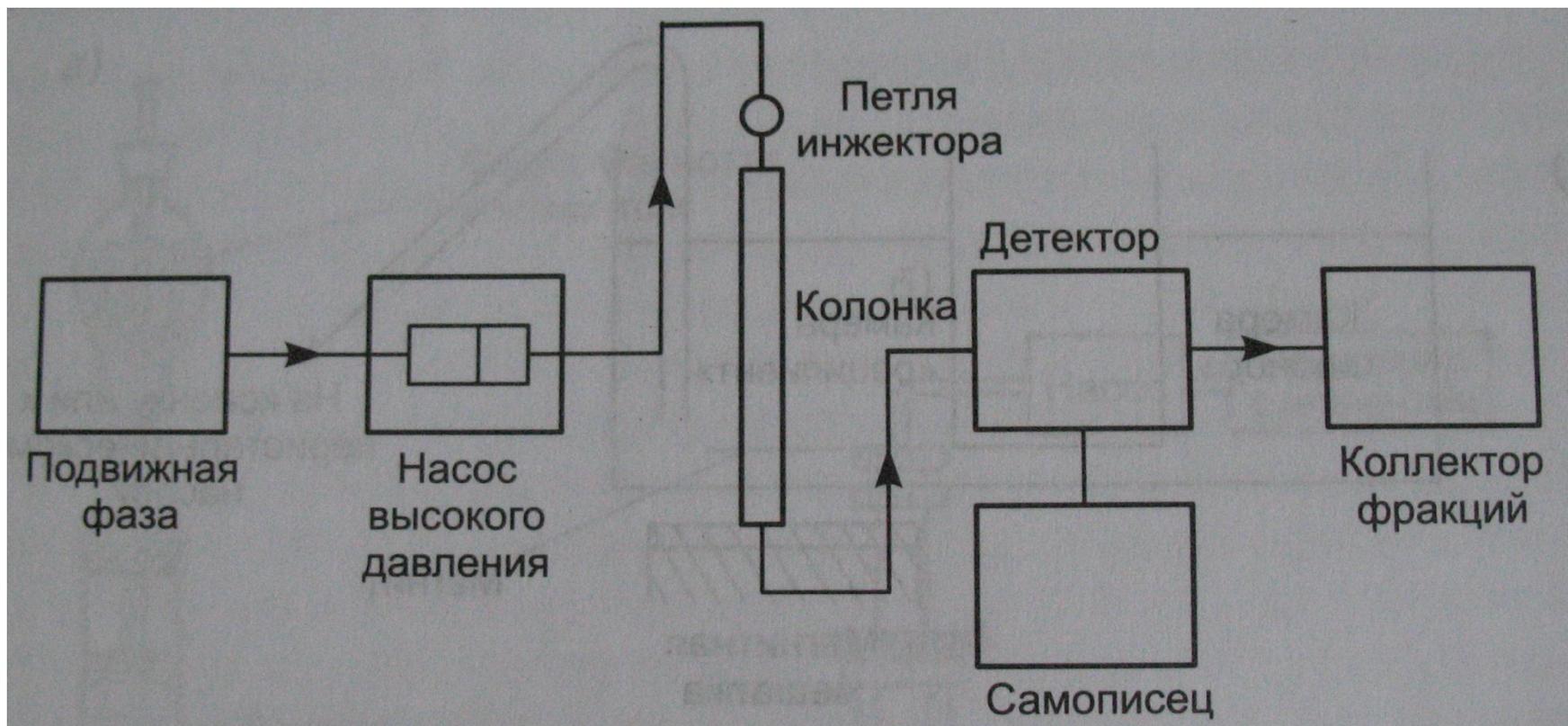
## Аппаратура

Жидкостной хроматограф включает:

- емкости для элюентов,
- насосы высокого давления,
- дозатор,
- хроматографическую колонку,
- детектор,
- регистрирующий прибор,
- систему управления и математической обработки результатов.



# Аффинная хроматография



# Аффинная хроматография

Сорбенты, используемые в аффинной хроматографии

В качестве сорбентов для аффинной хроматографии применяются гели на основе агарозы:

- сефароза 4В,
- сефароза CL,
- аффи-гель.



# Спасибо за

# внимание!

