



# Методы выделения и очистки белков (ферментов)



## Часто используемые виды биоматериала

- Культуральная жидкость
- Клетки одноклеточных прокариот
- Клетки одноклеточных эукариот (чаще всего дрожжи)
- Плазма или сыворотка крови животных
- Клетки крови животных (например, эритроциты или лейкоциты)
- Различные ткани животных (печень, мышцы скелетные или сердце и т.д.)
- Различные ткани растений



## Методы выделения и очистки ферментов

- Гомогенизация
- Фракционирование
- Хроматография
  - гельпроникающая
  - ионообменная
  - гидрофобная
  - афинная
- Электрофорез и изоэлектрическая фокусировка

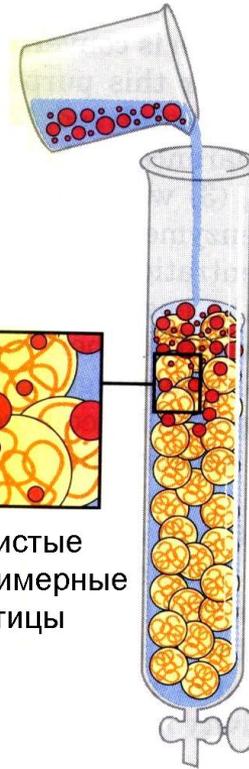


## Фракционирование осаждением

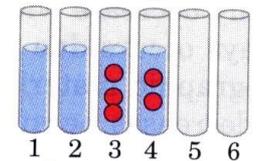
- Сульфатом аммония
- Органическими растворителями
- *Солями тяжёлых металлов*
- *Нагревание до 50-70 °С*

# Гельпроникающая хроматография

раствор  
белков  
(ферментов)

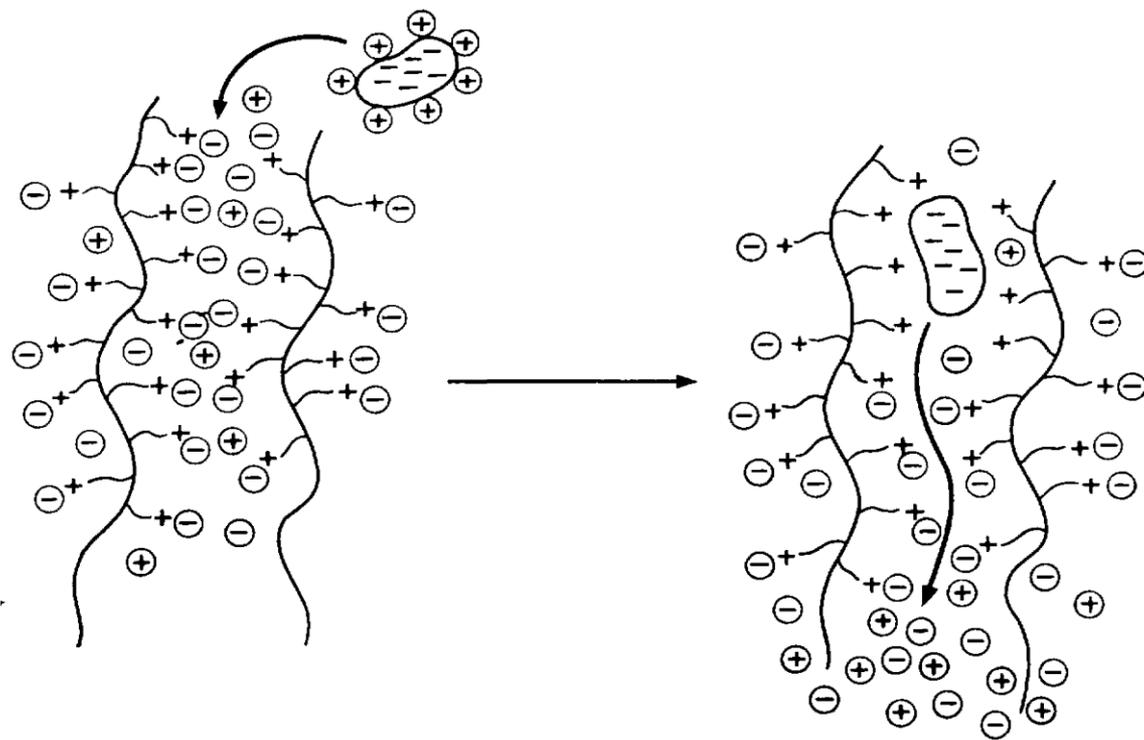


пористые  
полимерные  
частицы

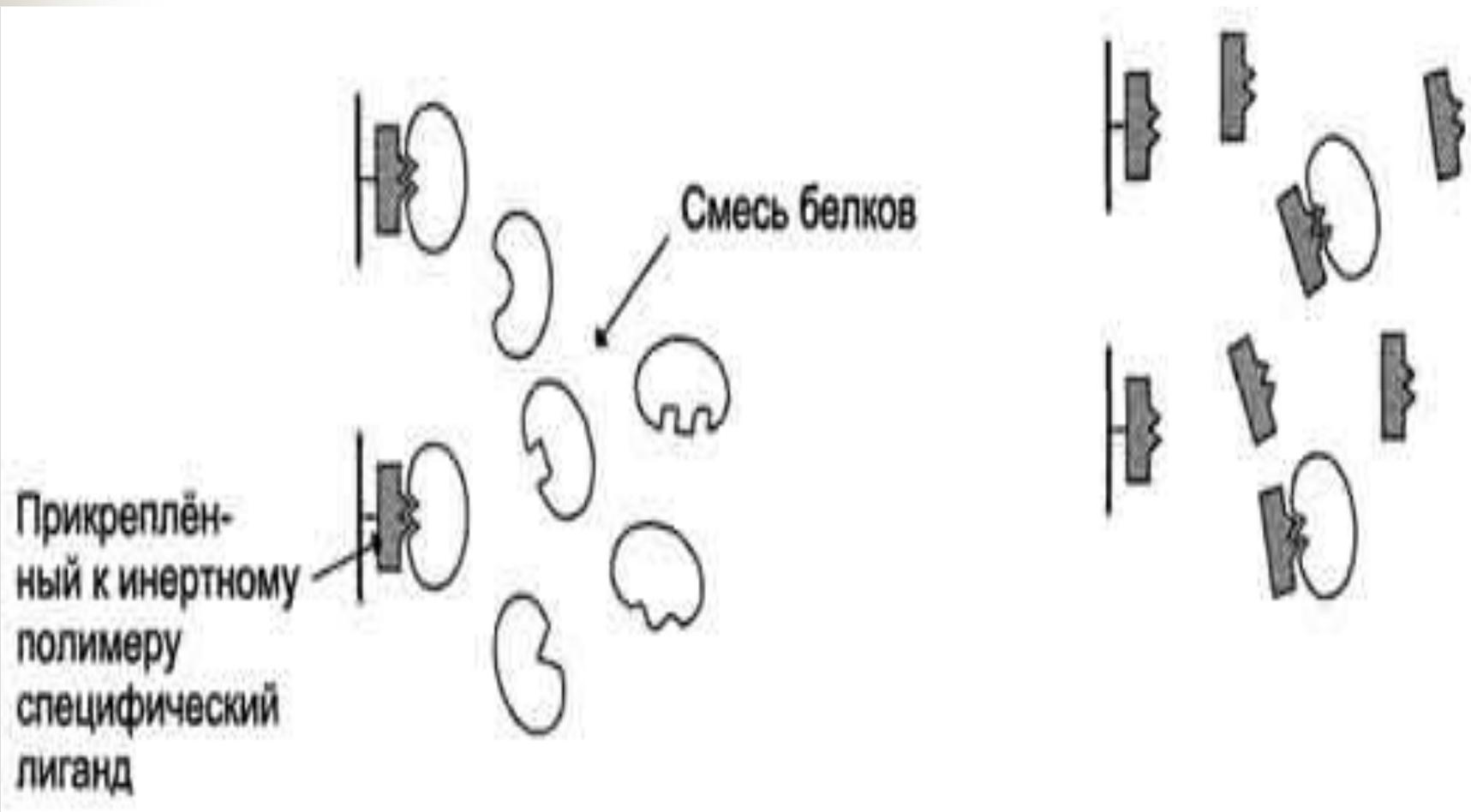


(a)

# Ионообменная хроматография



# Аффинная хроматография

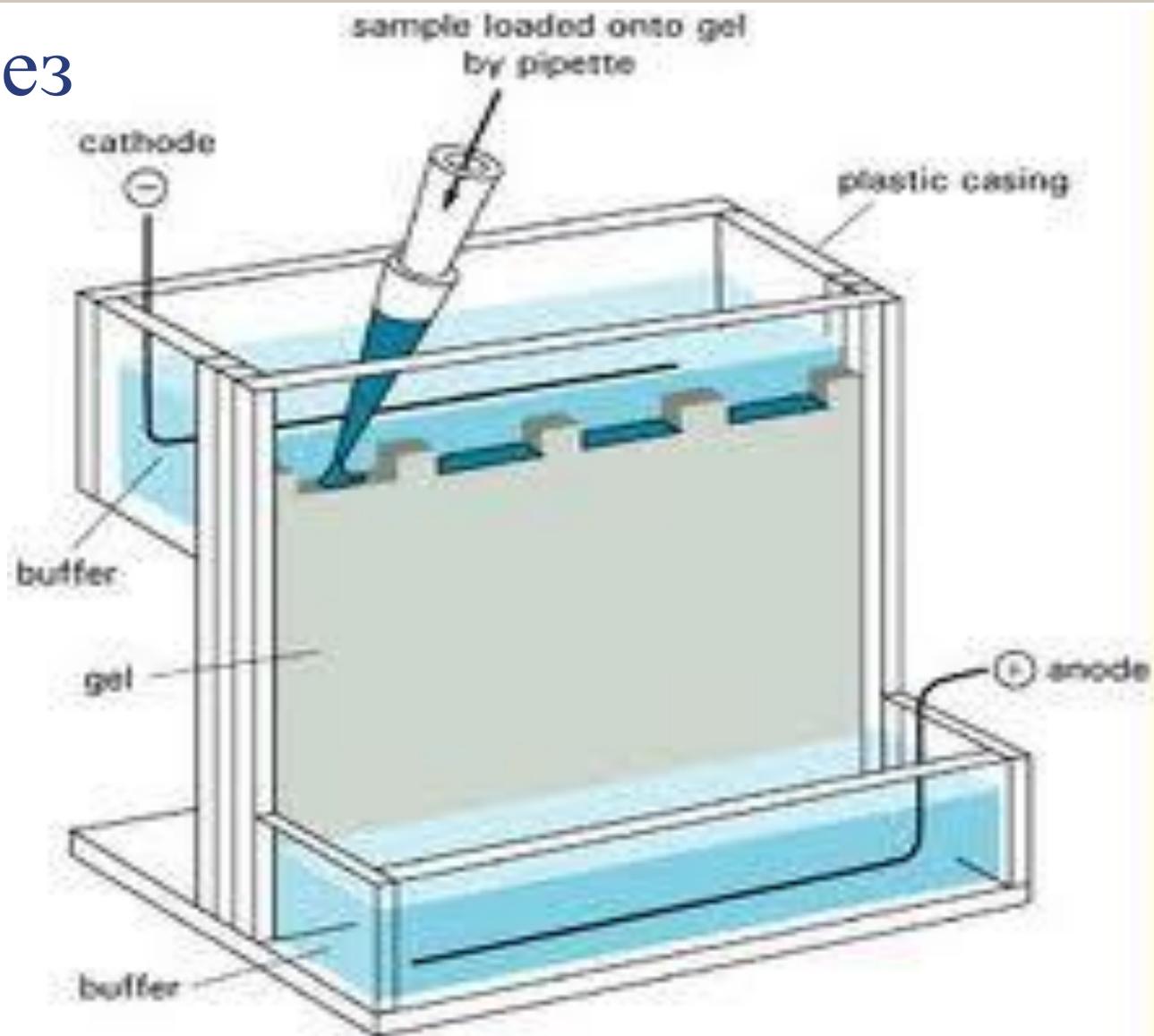




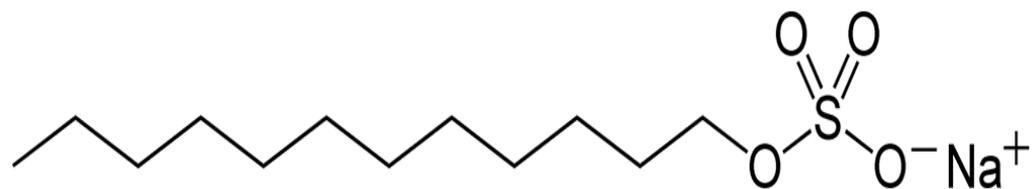
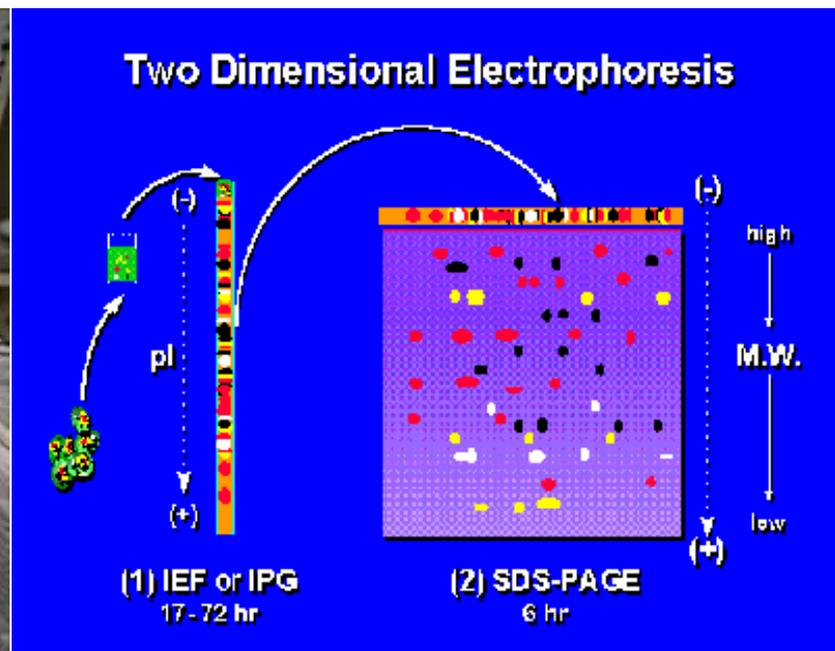
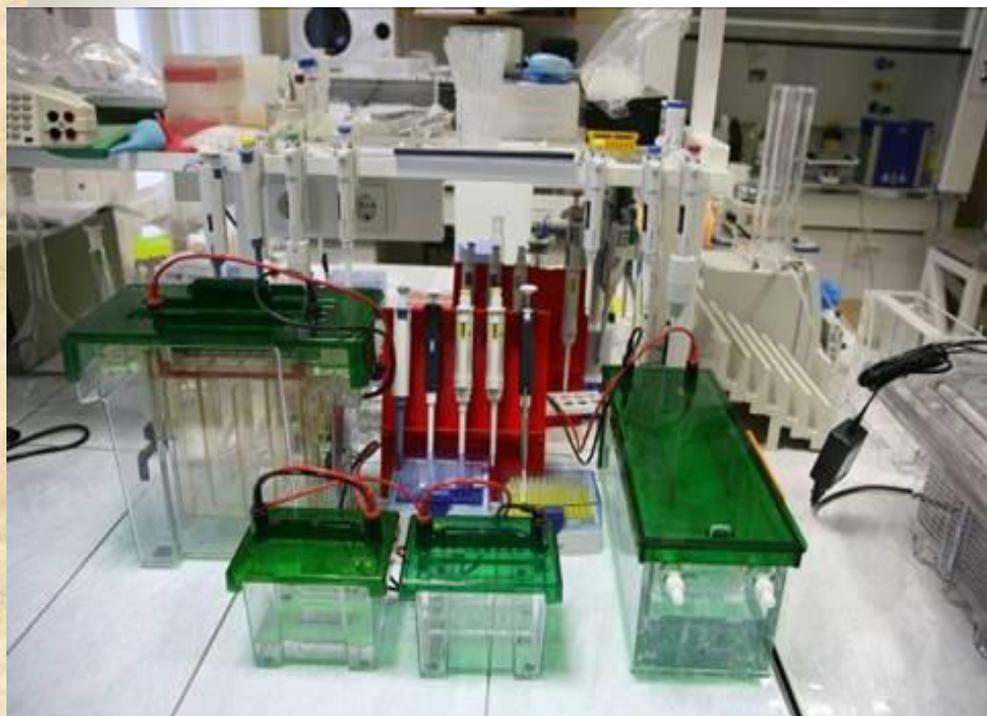
# Электрофоретические методы

- Электрофорез в денатурирующих условиях
- Нативный электрофорез
- Изоэлектрофокусирование

# Электрофорез

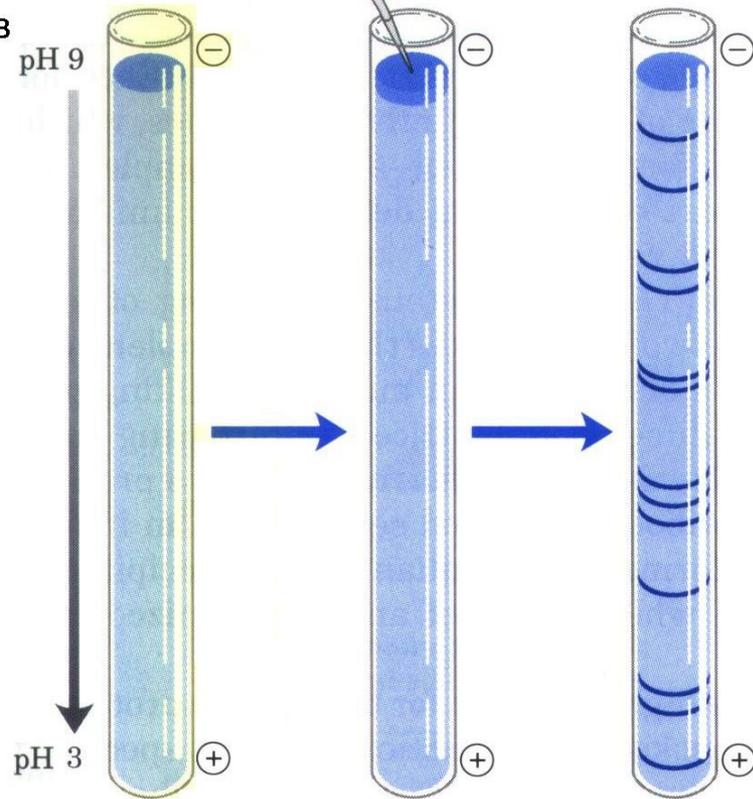


# Электрофорез



# Изоэлектрическая фокусировка

раствор  
амфолитов  
включен  
в гель



введен  
раствор  
белков

## Пример протоколирования процесса выделения ферментов

	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Активность, уе/мл *	Удельная активность, уе/мг	Суммарная активность, уе	Суммарный белок, мг	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	<b>78,1</b>	<b>7,4</b>	<b>11,9</b>	<b>1,4</b>	<b>927,7</b>	<b>577,1</b>	-	-
После 1ого высаливания 30-60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>33,5</b>	<b>5,6</b>	<b>25,7</b>	<b>4,6</b>	<b>861,2</b>	<b>187,6</b>	<b>93,2</b>	<b>3,3</b>
После 2ого высаливания 30-60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>13,3</b>	<b>8,4</b>	<b>63,6</b>	<b>7,6</b>	<b>845,3</b>	<b>111,1</b>	<b>91,1</b>	<b>5,4</b>
После хроматографи и Sephadex G200	<b>25,5</b>	<b>0,9</b>	<b>27,2</b>	<b>30,2</b>	<b>693,8</b>	<b>23,4</b>	<b>75,3</b>	<b>21,2</b>
После хроматографи и Toyopearl HW650 DEAE	<b>2,0</b>	<b>2,2</b>	<b>317,7</b>	<b>144,4</b>	<b>635,5</b>	<b>4,4</b>	<b>68,5</b>	<b>103,2</b>



# Проблемы получения ферментных препаратов

- 1. Низкое содержание целевого фермента в исходном биоматериале
- 2. Высокая степень удерживания
- 3. Низкая стабильность
  - А СОБСТВЕННАЯ
  - Б ОТДЕЛЕНИЕ (УДАЛЕНИЕ) СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ
  - В ПОВРЕЖДЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ
  - Г ЗАПУСК ДЕЙСТВИЯ ИНАКТИВАТОРОВ
- 4. Форма ферментного препарата



# Характеристики белковой молекулы

- Молекулярный вес
- Изоэлектрическая точка (значение рН, при котором общий заряд молекулы равен нулю)
  - Первичная последовательность аминокислот
  - Трехмерная структура