



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

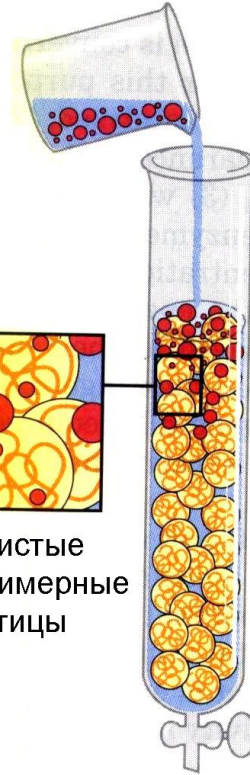


Фракционирование осаждением

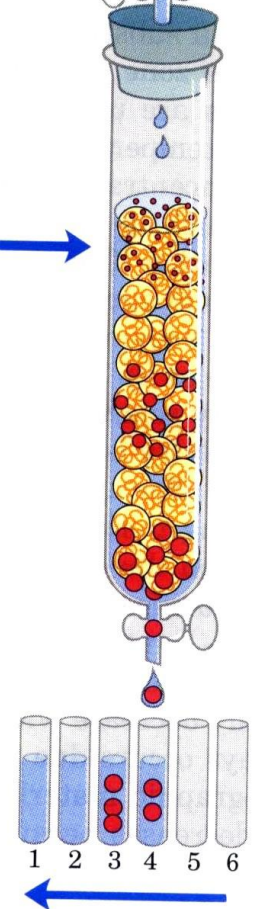
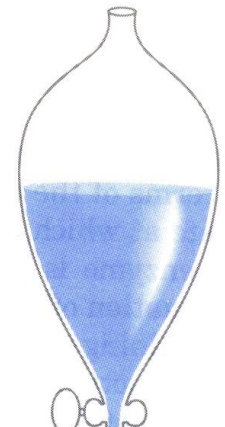
- Сульфатом аммония
- Органическими растворителями
- *Солями тяжёлых металлов*
- *Нагревание до 50-70 °С*

Гельпроникающая хроматография

раствор
белков
(ферментов)

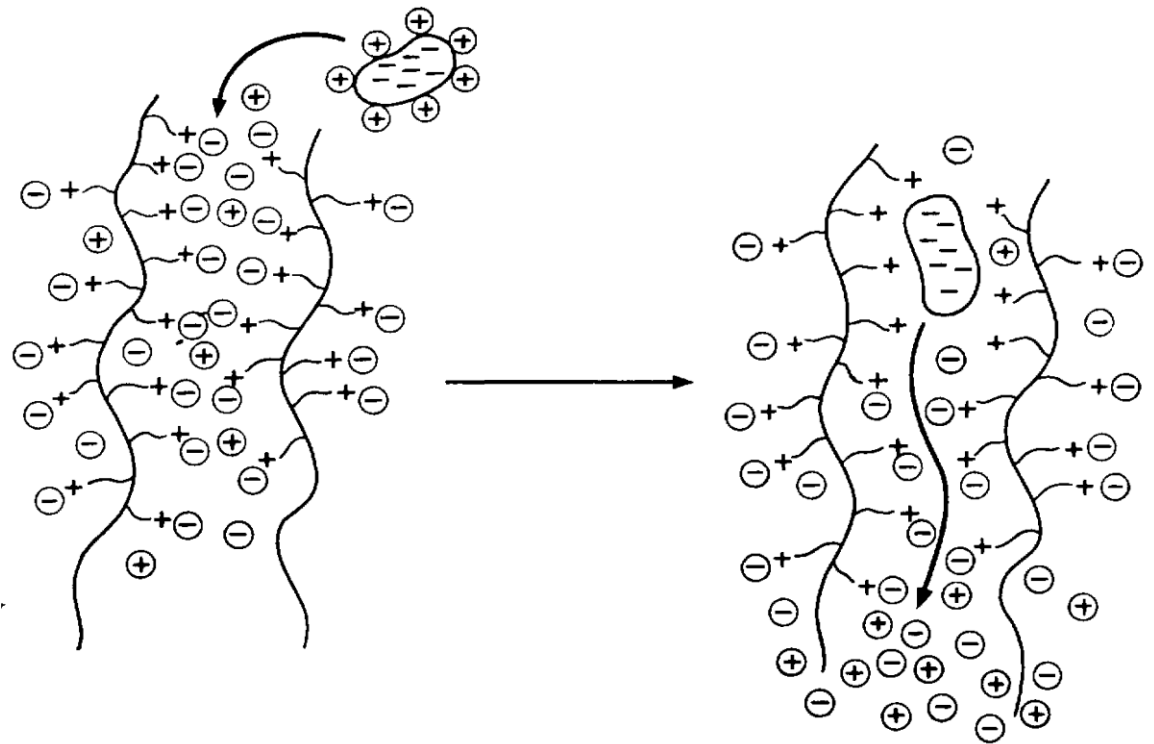


пористые
полимерные
частицы

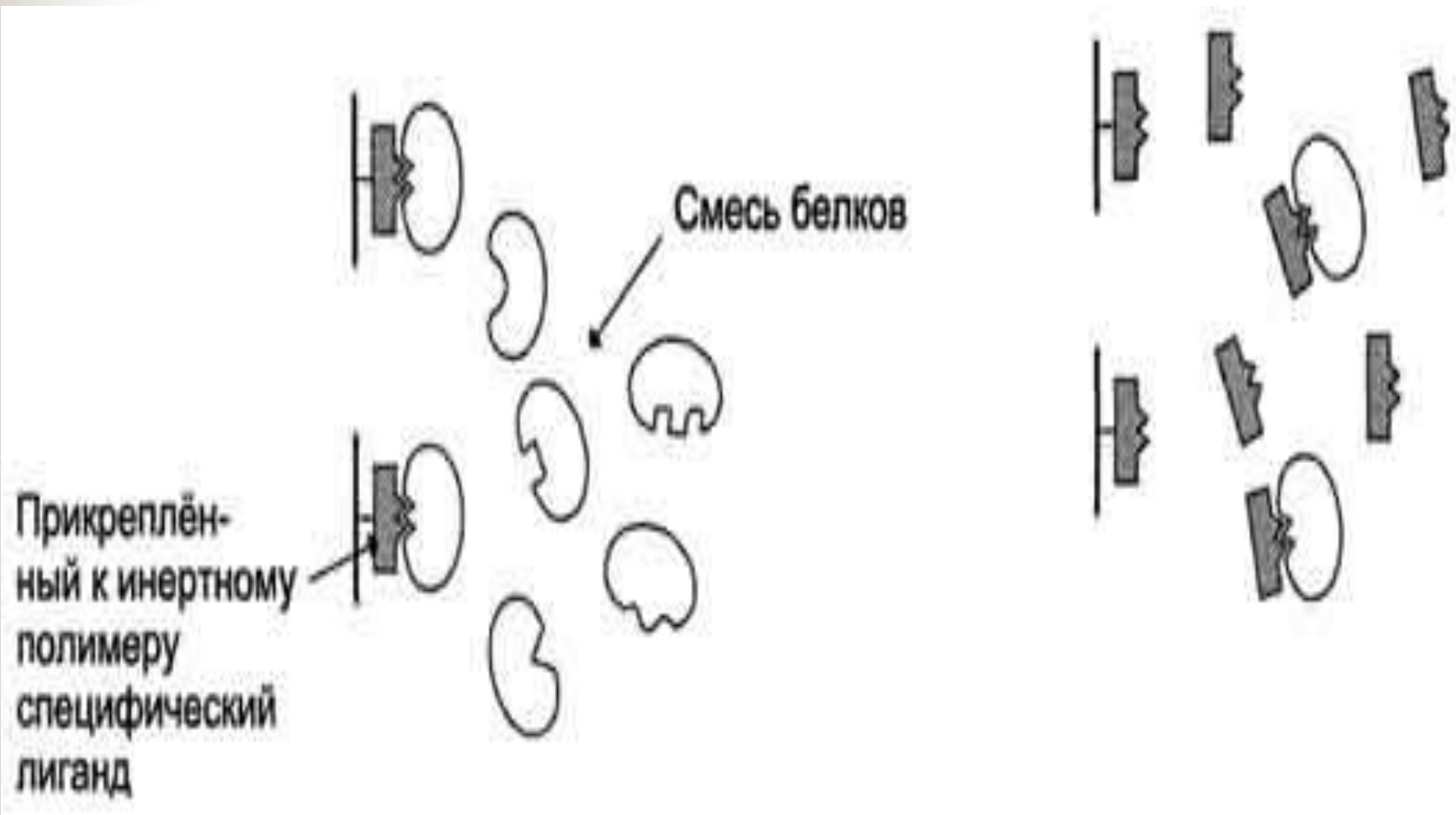


(a)

Ионообменная хроматография



Аффинная хроматография

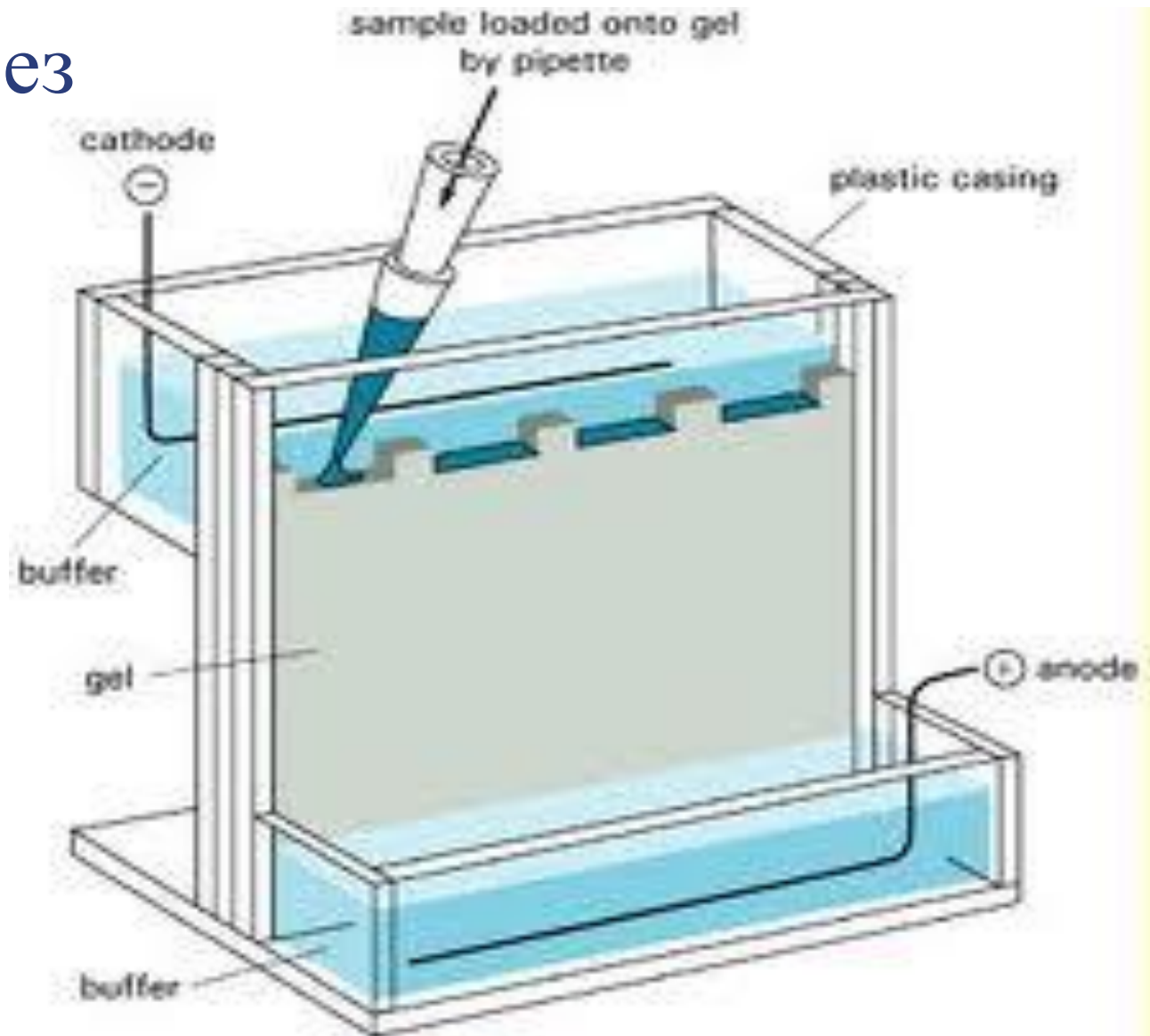




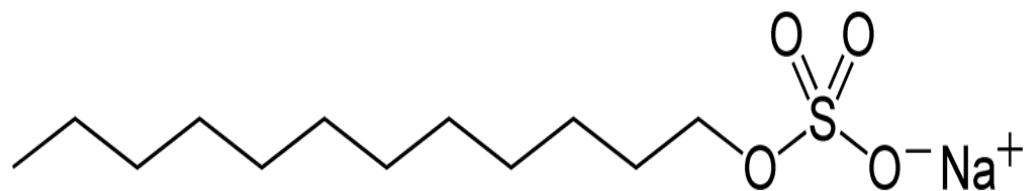
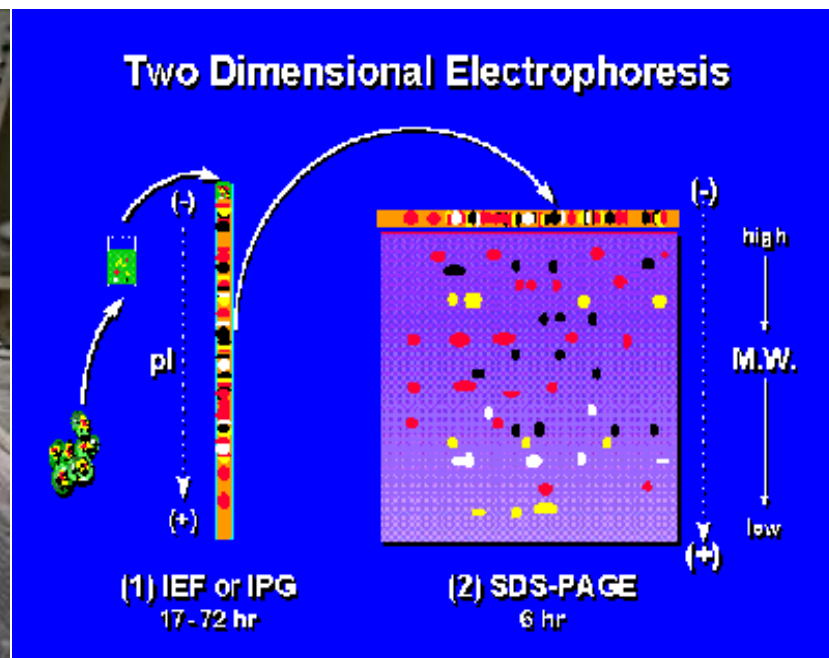
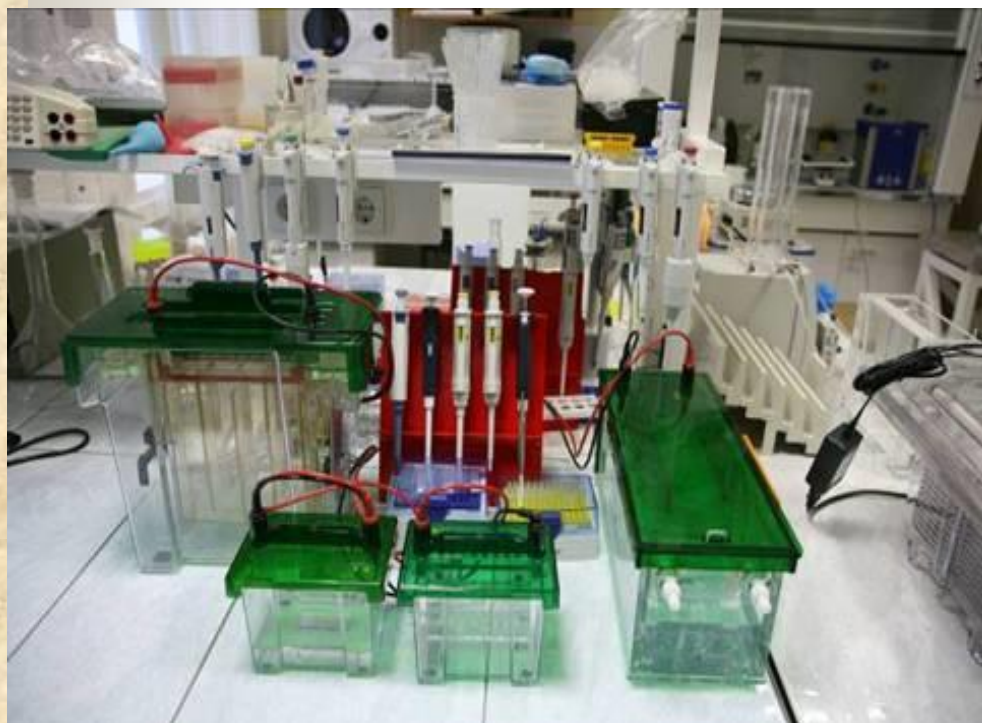
Электрофоретические методы

- Электрофорез в денатурирующих условиях
- Нативный электрофорез
- Изоэлектрофокусирование

Электрофорез

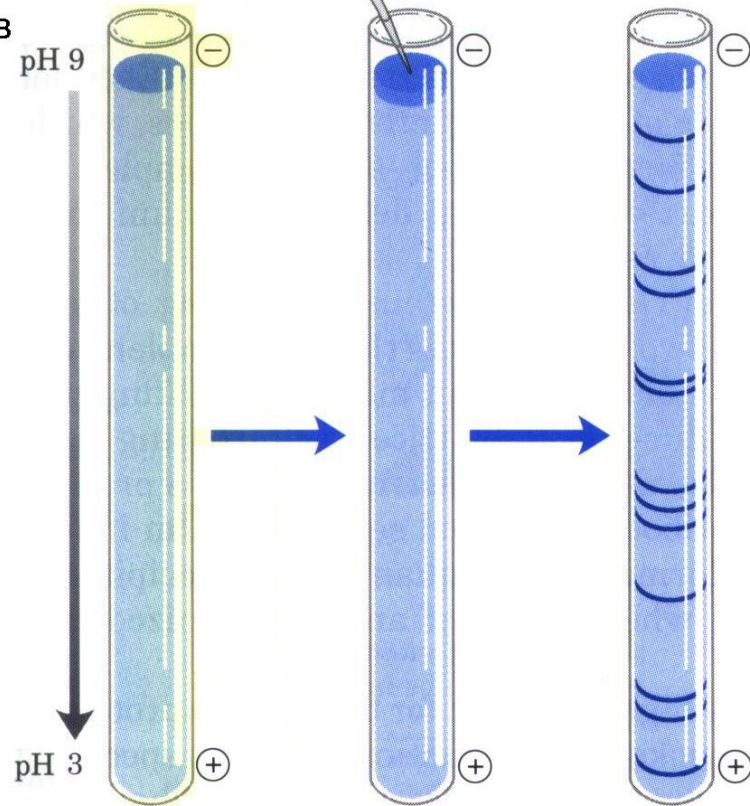


Электрофорез



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	78,1	7,4	11,9	1,4	927,7	577,1	-	-
После 1ого высаливания 30-60% (NH ₄) ₂ SO ₄	33,5	5,6	25,7	4,6	861,2	187,6	93,2	3,3
После 2ого высаливания 30-60% (NH ₄) ₂ SO ₄	13,3	8,4	63,6	7,6	845,3	111,1	91,1	5,4
После хроматографи и Sephadex G200	25,5	0,9	27,2	30,2	693,8	23,4	75,3	21,2
После хроматографи и Toyopearl HW650 DEAE	2,0	2,2	317,7	144,4	635,5	4,4	68,5	103,2



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