

Химические основы биологических процессов

Методы выделения и очистки белков (ферментов)

Тишков Владимир Иванович

zamdekana07@gmail.com

к. 210 кафедры химической энзимологии

Москва - Баку - 2022

Основные характеристики белковой молекулы

- **Молекулярный масса (вес)**
- **Изоэлектрическая точка**
(значение pH, при котором общий заряд молекулы равен нулю)
- **Аминокислотная последовательность** (первичная структура)
- **Трехмерная структура**
 - третичная структура (одна субъединица)
 - четвертичная структура (олигомерный состав)

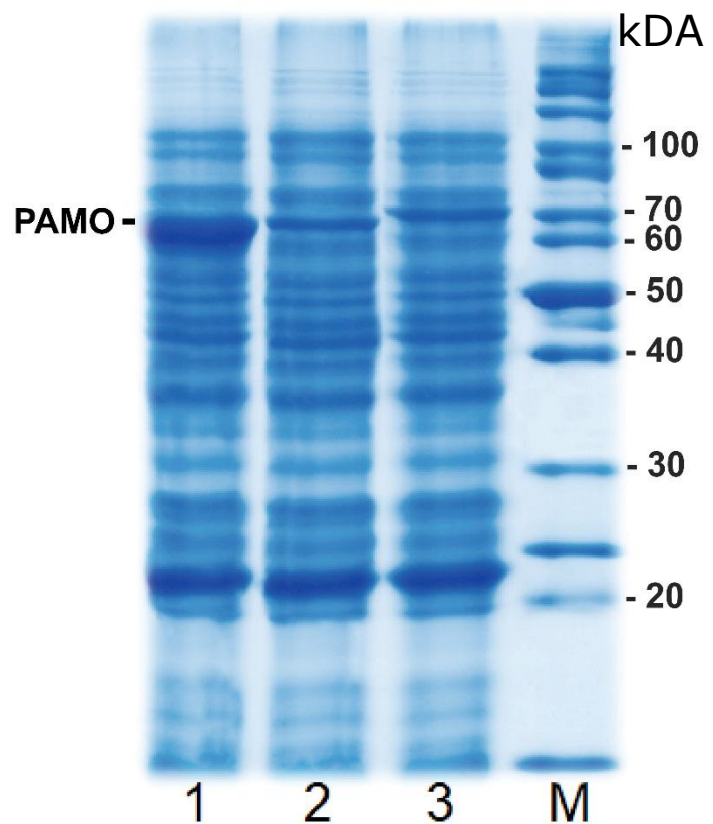
Часто используемые виды биоматериала

- **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**
- **Человек ???**

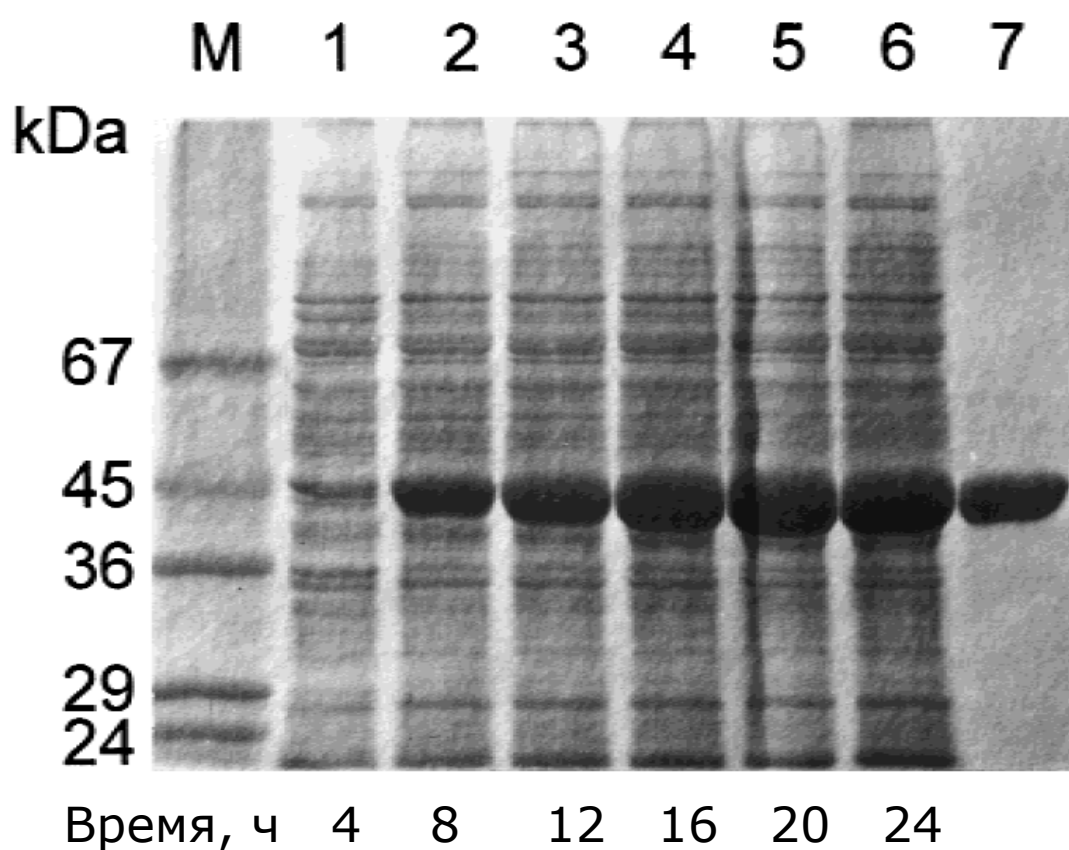
Получение белков и ферментов в современной жизни

**Методы генетической
инженерии и клеточные
технологии позволяют
получать рекомбинантные
белки**

Примеры содержания целевого белка в клетке (экспрессия двух ферментов в клетках *E.coli*)



Фенилацетонмонооксигеназа
по завершении культивирования
(Биохимия 2020)



Экспрессия формиатдегидрогеназы
во время культивирования
(Biotechnology&Bioengineering, 1999)

Этапы выделения и очистки ферментов

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

Этапы выделения и очистки ферментов

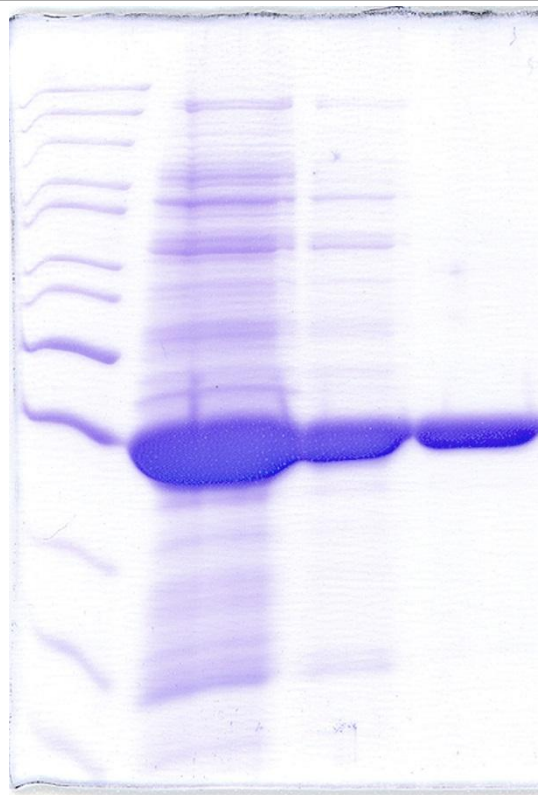
■ Гомогенизация

- механическое разрушение (мельница с шариками, блендер)
- ультразвук
- замораживание-размораживание с последующим добавлением ферментов /или ПАВ
- перепад давления (Х-пресс, French-пресс)
- осмотический шок

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ

- **Неорганические соли (сульфат аммония и др.)**
- **Органические растворители**
- *Соли тяжёлых металлов*
- ***Нагревание до 50-70 °С***

Очистка формиатдегидрогеназы *S.aureus*

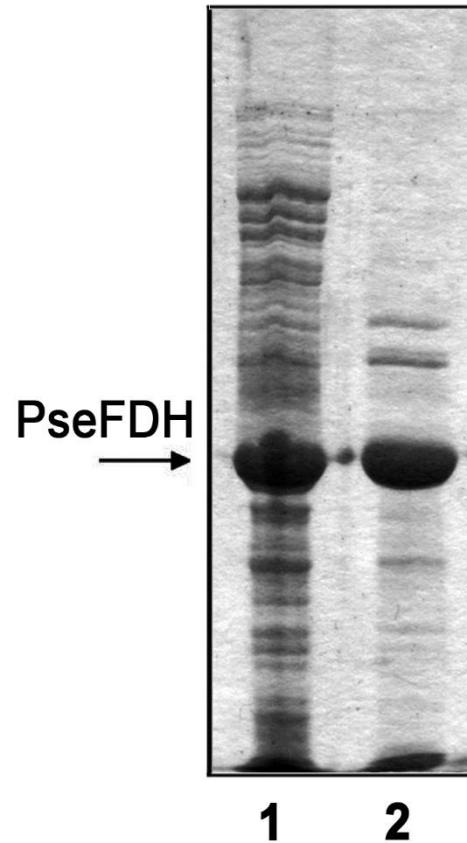


M **1** **2** **3**

- 1 – бесклеточный экстракт
- 2 – после сульфата аммония
- 3 – хроматография

(Биохимия 2020)

Очистка формиатдегидрогеназы термообработкой



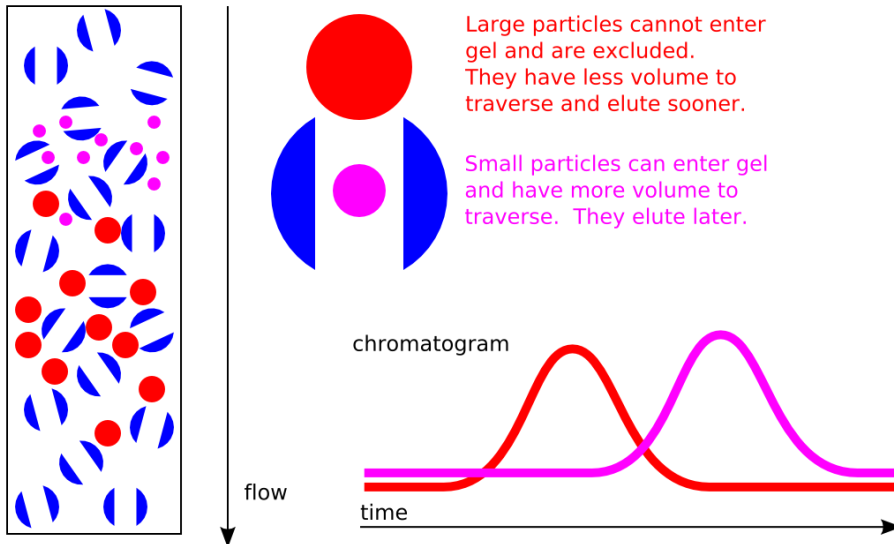
1 – бесклеточный экстракт

2 – после термообработки, 63 °С, 20 мин

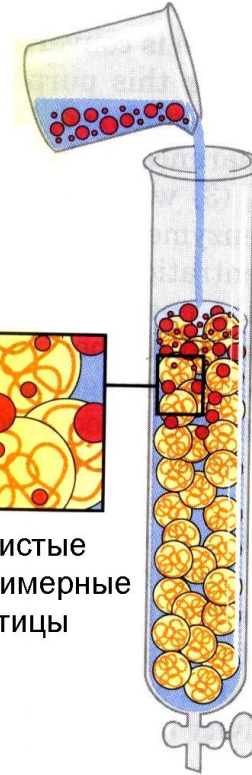
(Biomolecular Engineering 2006)

Гель-проникающая хроматография (гель-фильтрация)

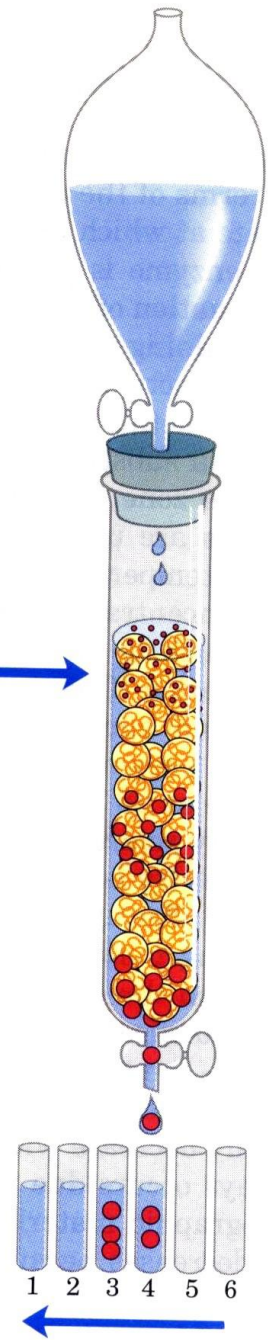
Size-exclusion chromatography
Gel-filtration chromatography
Gel permeation chromatography



раствор
белков
(ферментов)

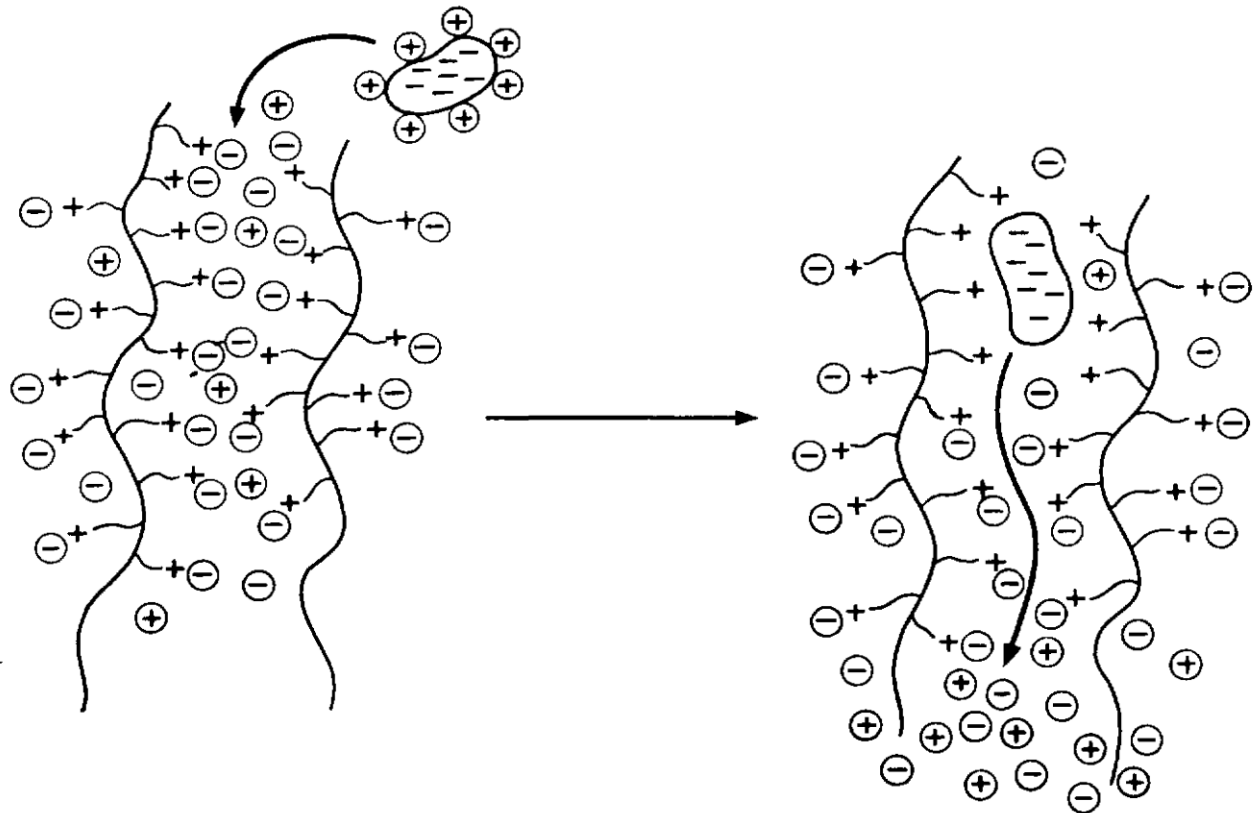


пористые
полимерные
частицы



(a)

Ионообменная хроматография

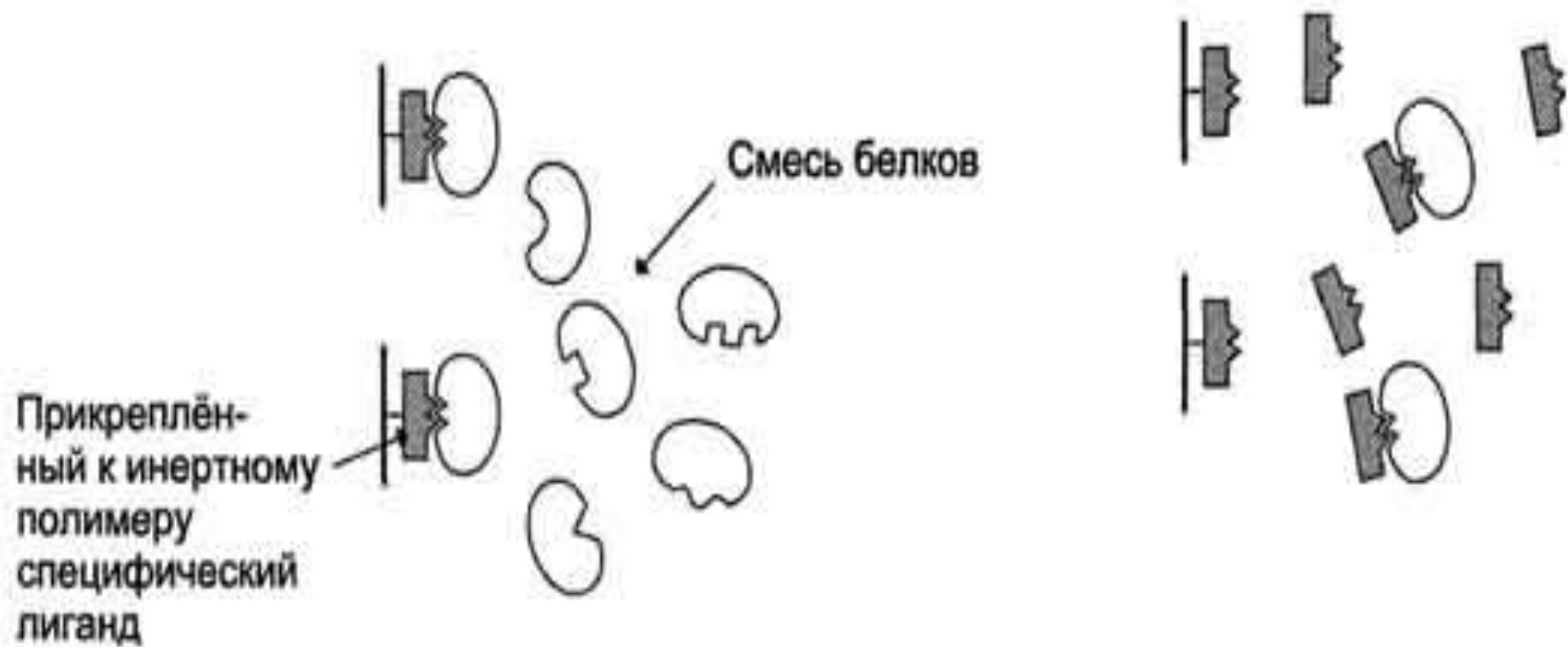


- – сорбция белка в растворе с **НИЗКОЙ ИОННОЙ СИЛОЙ** на носитель, имеющий заряд противоположный заряду фермента
- – десорбция в повышающемся градиенте концентрации соли (обычно NaCL)

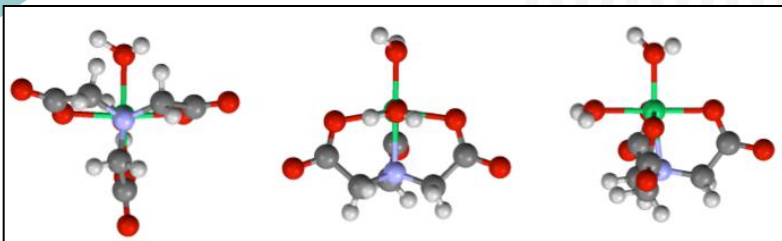
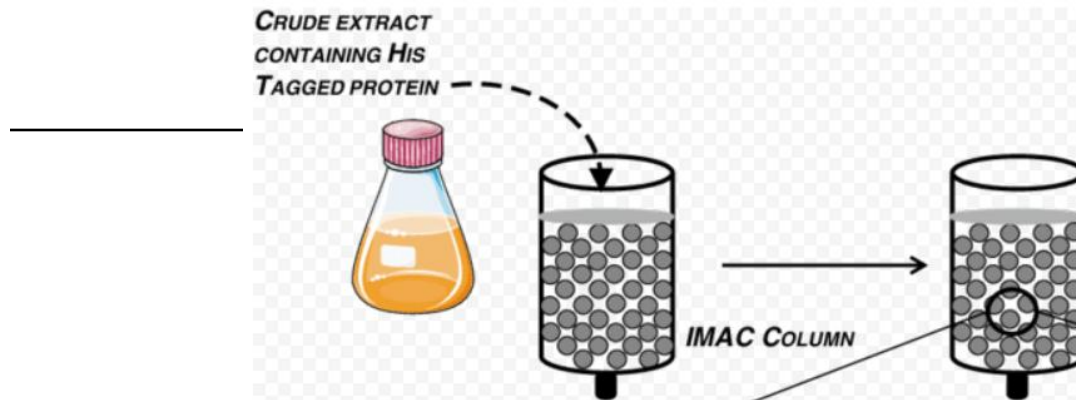
Гидрофобная хроматография

- - используются носители с гидрофобной группой – бутил-, октил-, фенил- и др.
- – сорбция белка на носитель проводится при **ВЫСОКОЙ** концентрации сульфата аммония, когда фермент не выпадает в осадок и связывается с носителем
- – десорбция происходит при понижении концентрации соли

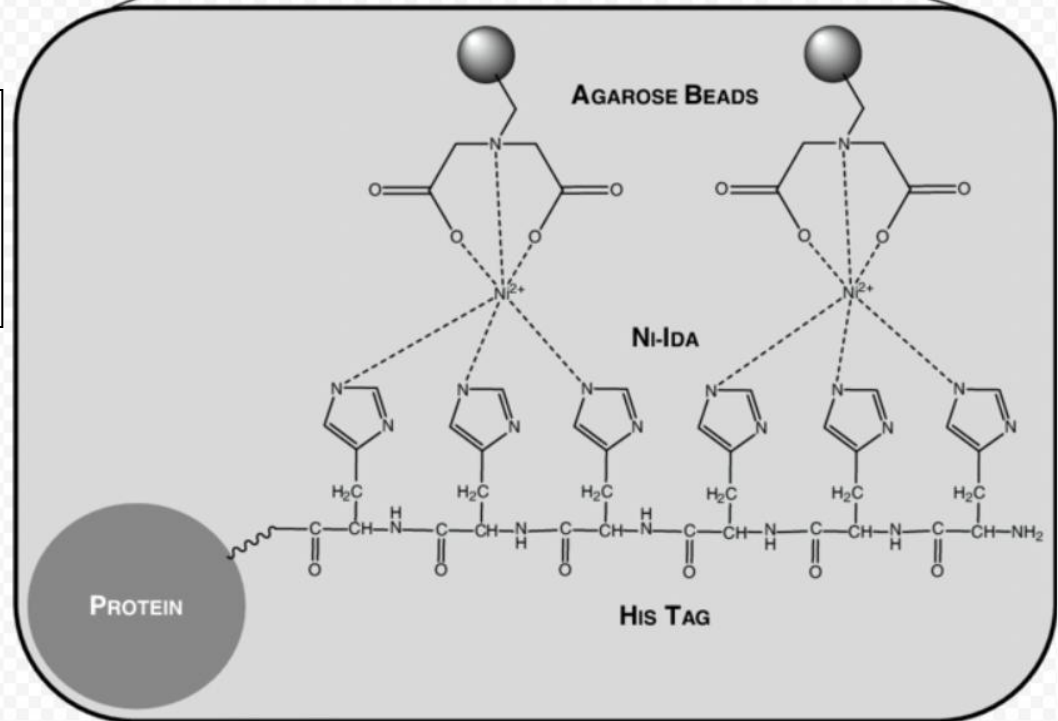
Аффинная хроматография



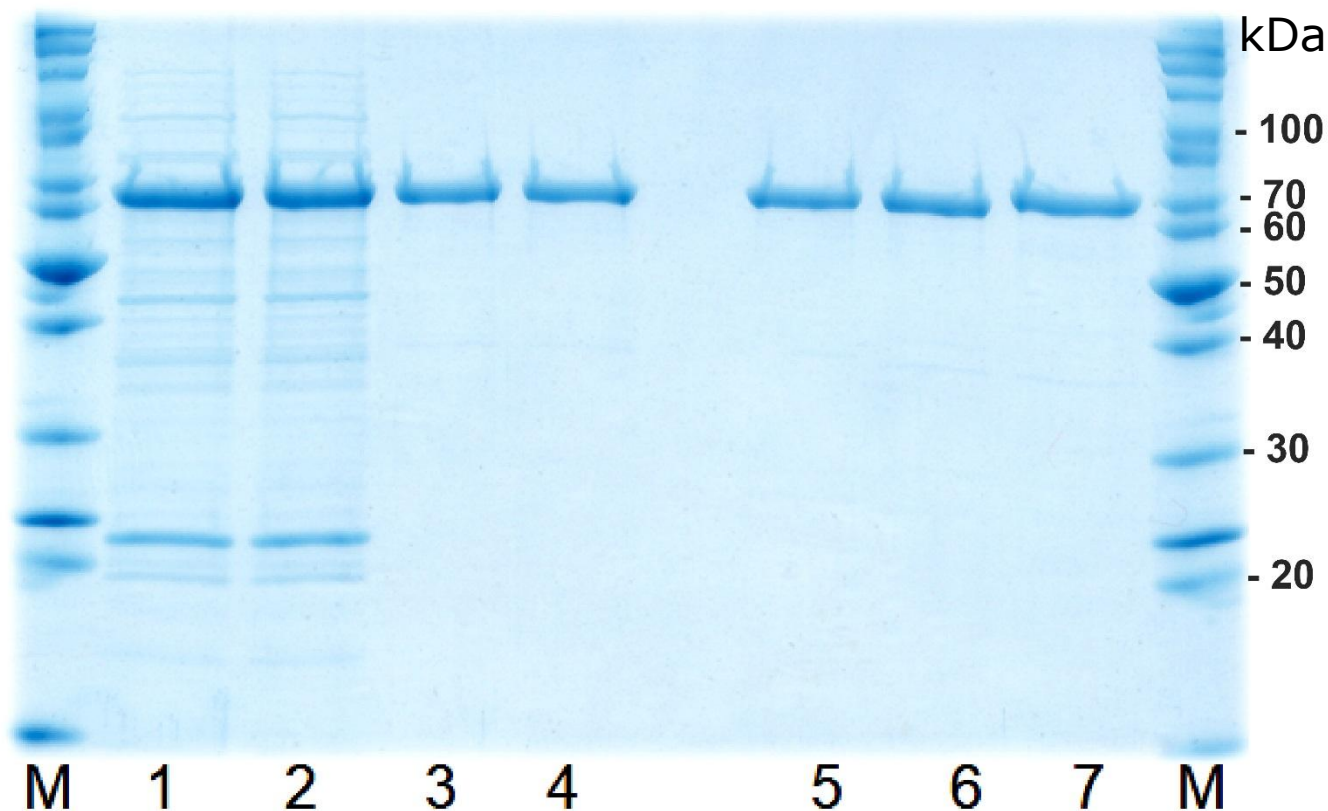
Металл-хелатная хроматография



**Структура комплекса иона
металла и лигандов носителя
в двух проекциях**



ОЧИСТКА ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ (РАМО) на Ni-NTA-Sepharose



1,2 - бесклеточный экстракт N-His-tag РАМО

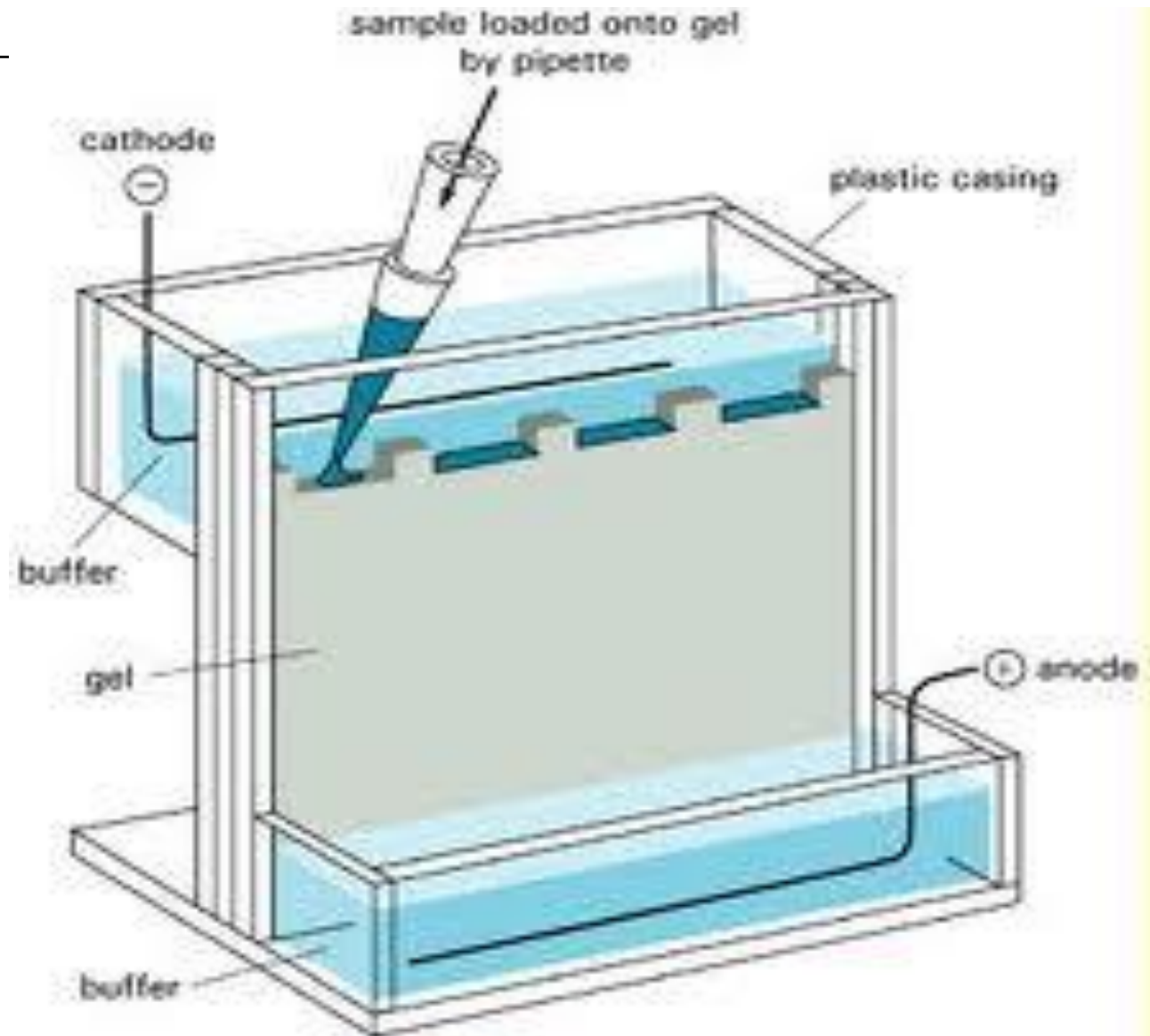
3,4, - N-Nis-tag РАМО после очистки (His-tag на N-конце)

5-7 - очищенная РАМО с His-tag на N- (5) и С- (6,7) конце фермента

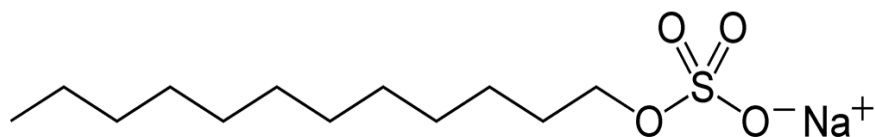
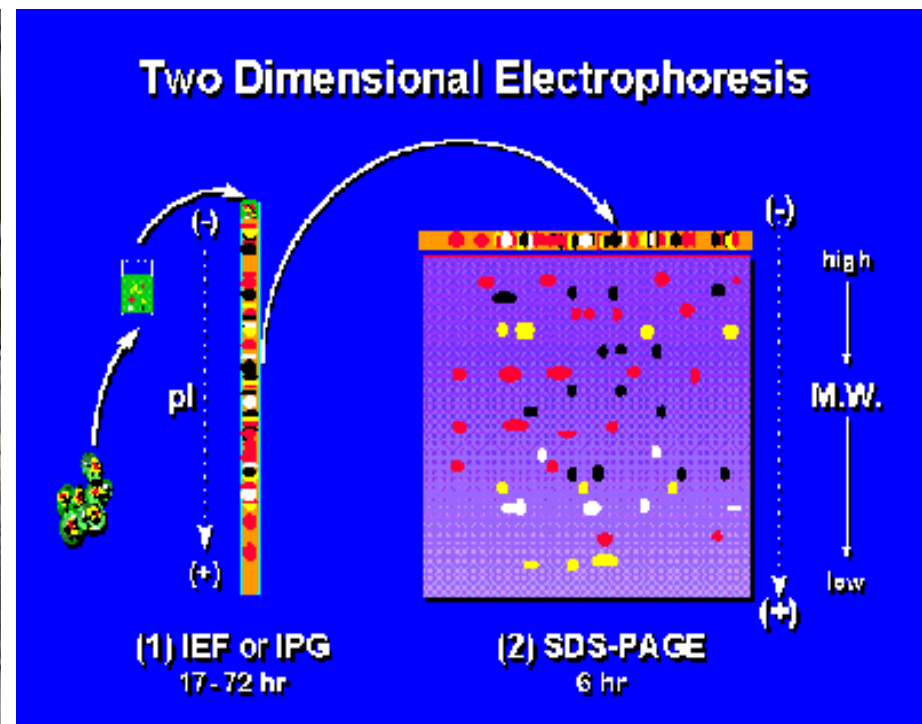
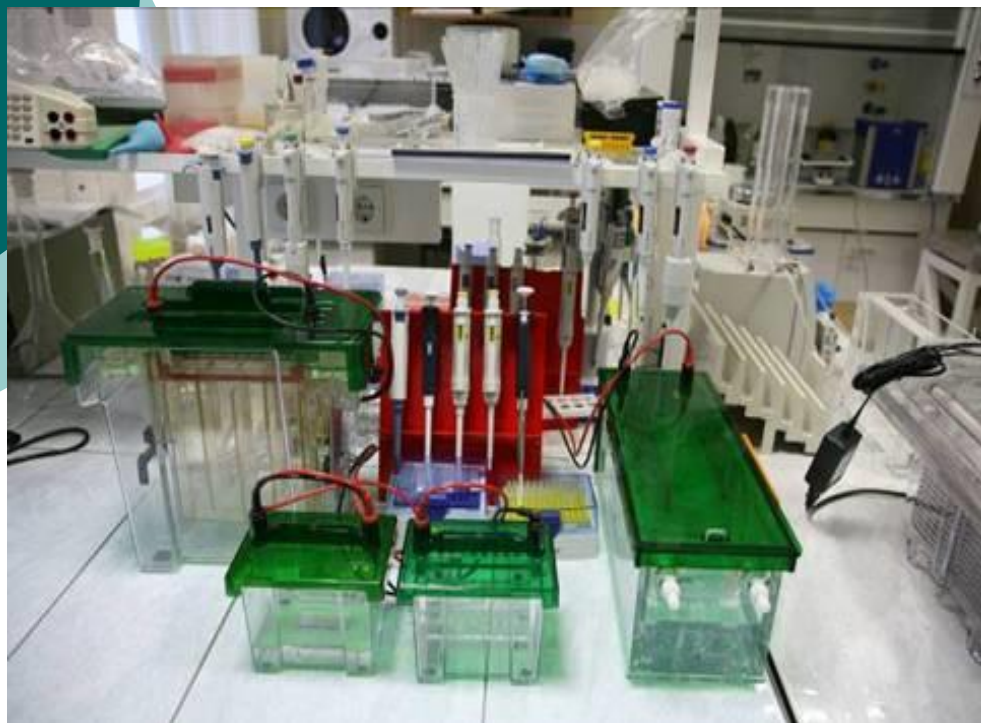
Электрофоретические методы

- **Электрофорез в денатурирующих условиях**
- полиакриламидный гель (ПААГ), пластины, столбики
(анализ чистоты белковых препаратов)
- **Нативный электрофорез**
- ПААГ с постоянной или градиент концентрации (4-30%)
(анализ белковых препаратов, выделение - редко)
- **Изоэлектрофокусирование (ИЭФ)**
(анализ белковых препаратов, на пластинах ПААГ))
- **Изотахорофорез (в капиллярах без геля, каждая зона – собственно сам белок)**
(анализ белковых препаратов)
- **Хроматофокусирование (ИЭФ на колонке)**
(очистка белков)

Электрофорез в пластинах ПААГ



Комбинация методов разделения (двумерный ЭФ)



Додецилсульфат натрия

Пример последовательного анализа смеси белков с помощью изоэлектрофокусирования и электрофореза



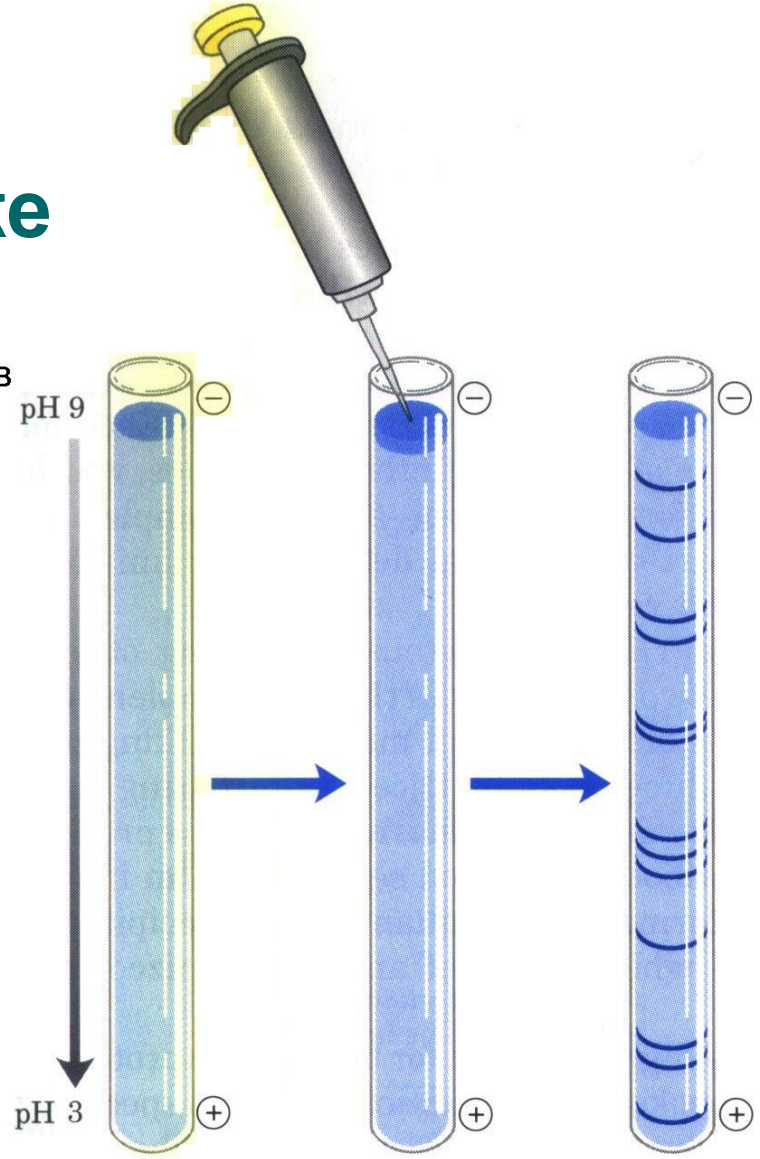
ELECTROPHORESIS

Speeding up SDS-PAGE: theory and experiment

Journal:	<i>ELECTROPHORESIS</i>
Manuscript ID	elps.202300011.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article (Direct Via EEO)
Date Submitted by the Author:	24-Mar-2023
Complete List of Authors:	Koshkina, Maria; Lomonosov Moscow State University Shelomov, Mikhail; Lomonosov Moscow State University Pometun, Anastasia; Lomonosov Moscow State University; FSI Federal Research Centre Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences Tishkov, Vladimir; Lomonosov Moscow State University; FSI Federal Research Centre Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences Savin, Svyatoslav; Lomonosov Moscow State University Atroshenko, Denis; Lomonosov Moscow State University; FSI Federal Research Centre Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences
Keywords:	SDS-PAGE, protein electrophoresis acceleration, Laemmli electrophoresis

Изоэлектрическая фокусировка на колонке

раствор
амфолитов
включен
в гель



введен
раствор
белков

Пример протоколирования процесса выделения ферментов

	Объём, мл	Концентрация белка, мг/мл	Актив-ность, уе/мл *	Удельная активность, уе/мг	Суммарная активность, уе	Суммарный белок, мг	Выход, %	Степень очистки, раз
Гомогенат	78,1	7,4	11,9	1,4	927,7	577,1	-	-
После 1-го высаливания, 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	33,5	5,6	25,7	4,6	861,2	187,6	93,2	3,3
После 2-го высаливания, 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13,3	8,4	63,6	7,6	845,3	111,1	91,1	5,4
После гель-фильтрации Sephadex G200	25,5	0,9	27,2	30,2	693,8	23,4	75,3	21,2
После хроматографии на Toyopearl HW650 DEAE	2,0	2,2	317,7	144,4	635,5	4,4	68,5	103,2

Основные характеристики белковой молекулы

- **Молекулярный масса (вес)**
- **Изоэлектрическая точка**
(значение pH, при котором общий заряд молекулы равен нулю)
- **Аминокислотная последовательность** (первичная структура)
- **Трехмерная структура**
 - третичная структура (одна субъединица)
 - четвертичная структура (олигомерный состав)

Проблемы получения ферментных препаратов

- **1. Низкое содержание целевого фермента в исходном биоматериале (особенно в природных источниках)**
- **2. Высокая степень удерживания**
- **3. Низкая стабильность**
 - А СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ
 - Б ОТДЕЛЕНИЕ (УДАЛЕНИЕ) СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ
 - В ХИМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ МОЛЕКУЛЫ ИЛИ ВСТРОЕННЫХ КОФАКТОРОВ
 - Г ЗАПУСК ДЕЙСТВИЯ ИНАКТИВАТОРОВ
 - Д ДРУГИЕ ФАКТОРЫ
- **4. Форма ферментного препарата**