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

1. **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

1. **Ионообменная хроматография** – один широко используемых в практике методов выделения

1. **Гель-проникающая хроматография** (гель фильтрация) – разделение на основе молекулярной массы

1. **Аффинная хроматография** – разделение с использованием биоспецифических лигандов

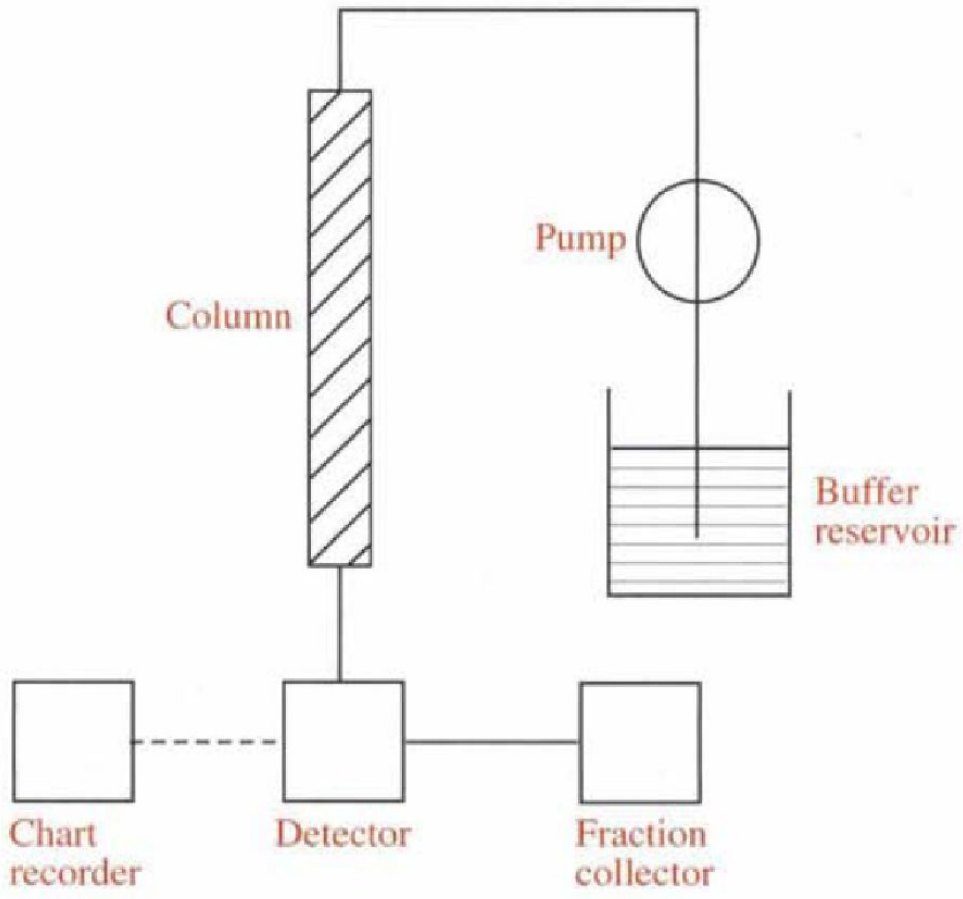
1. **Электрофорез** – разделение белков и пептидов на основе различной подвижности в электрическом поле

1. **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
Специфичекие 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

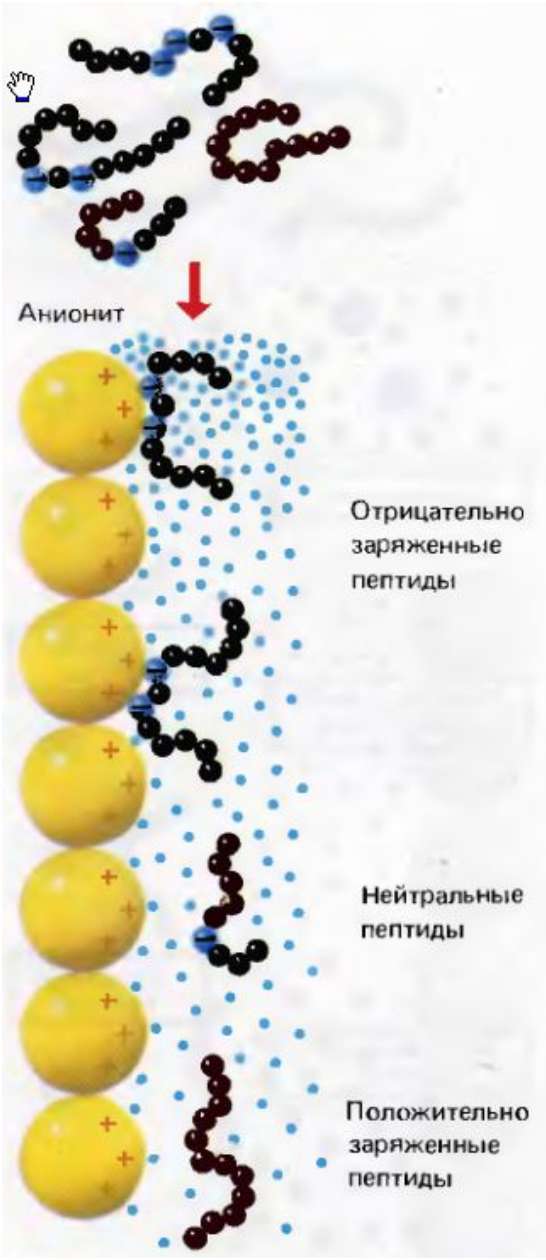
Принцип – взаимодействие зарядов белка (пептида) с заряженными группами на поверхности носителя.

Носитель:

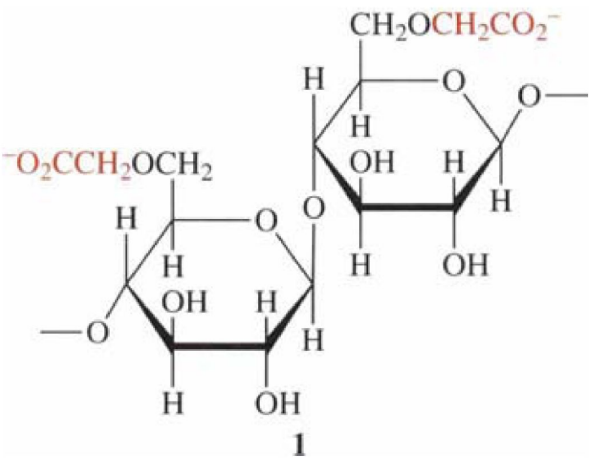
Для **небольших пептидов** проводят хроматографирование на полимерных катионитах (**сульфированный** сополимер стирола и дивинилбензола) или анионитах ($-N^+R_3$)

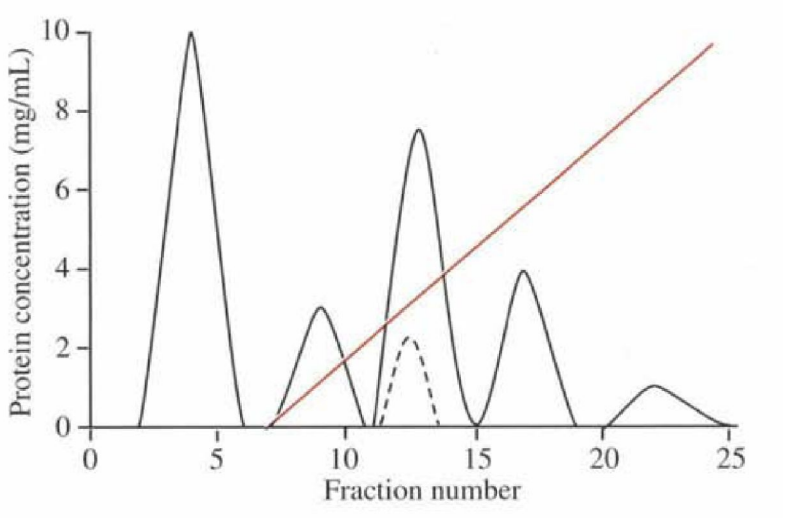
Для выделения **крупных пептидов** (белков) используют носители (целлюлоза, декстран, агароза) способные набухать в водной среде, тем самым обеспечивать лучшие условия проницаемости крупных молекул по сравнению со смолами на основе полистирола.

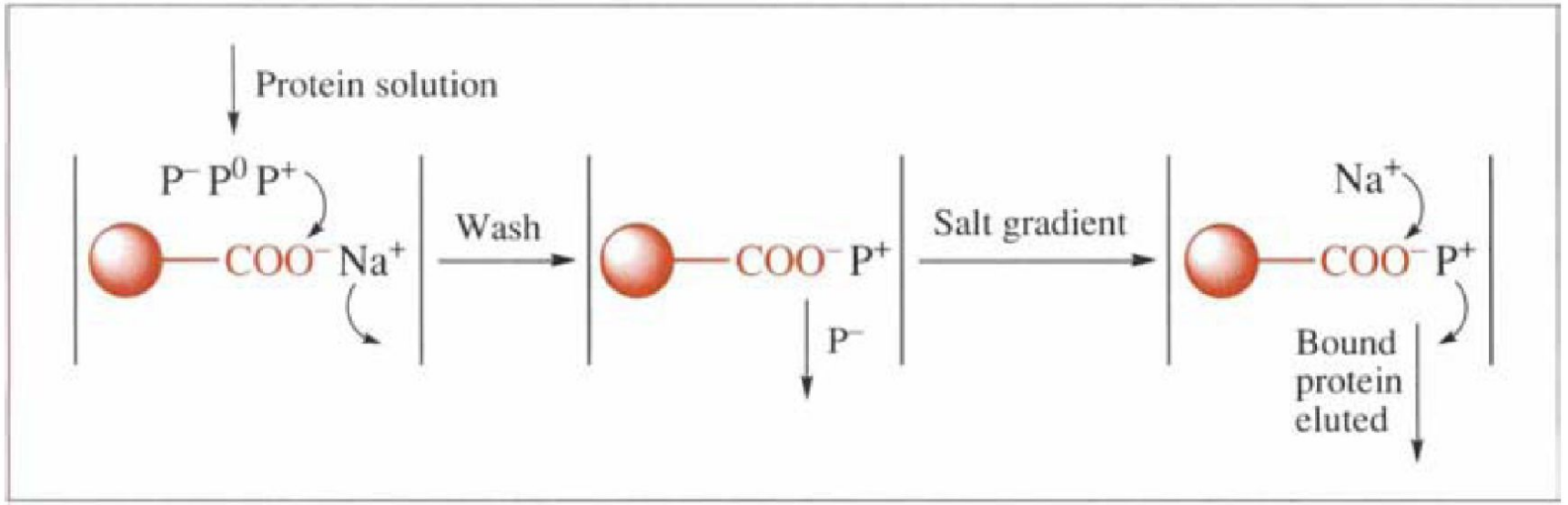
Exchange group	*Abbreviation*	*Structure*	*Type*
Carboxymethyl	CM	$-CH_2CO_2^-$	Weak cation
Propylsulfonate	SP	$-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$	Strong cation
Diethylaminoethyl	DEAE	$-CH_2CH_2NHEt_2^+$	Weak anion
Quaternary methylammonium	Q	$-CH_2NMe_3^+$	Strong anion



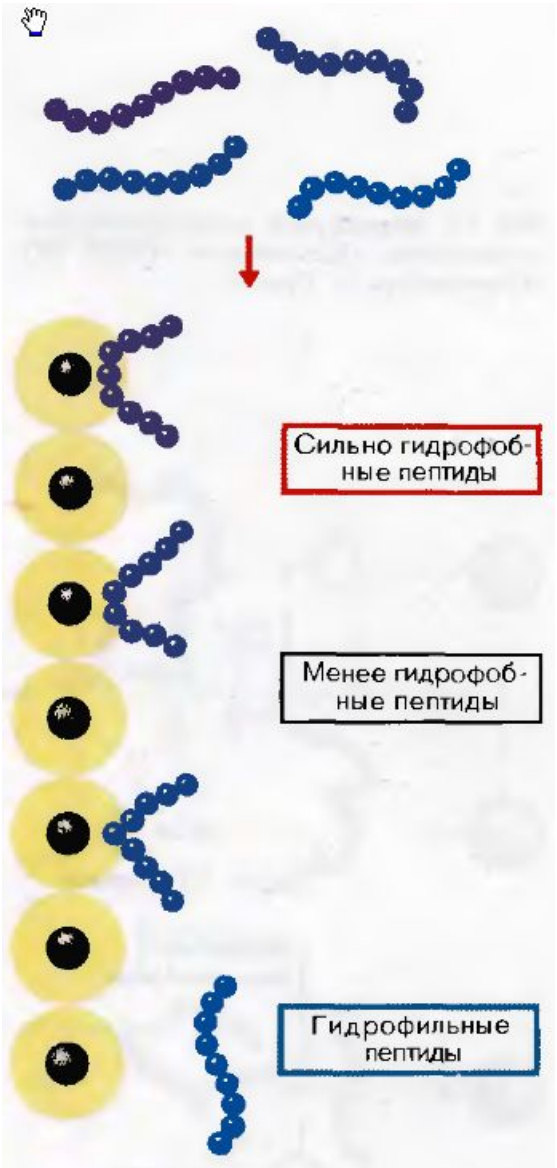
Ионнообменная хроматография на СМ-целлюлозе

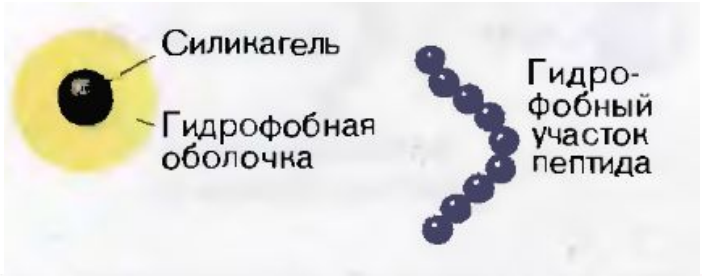






Гидрофобная хроматография





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)

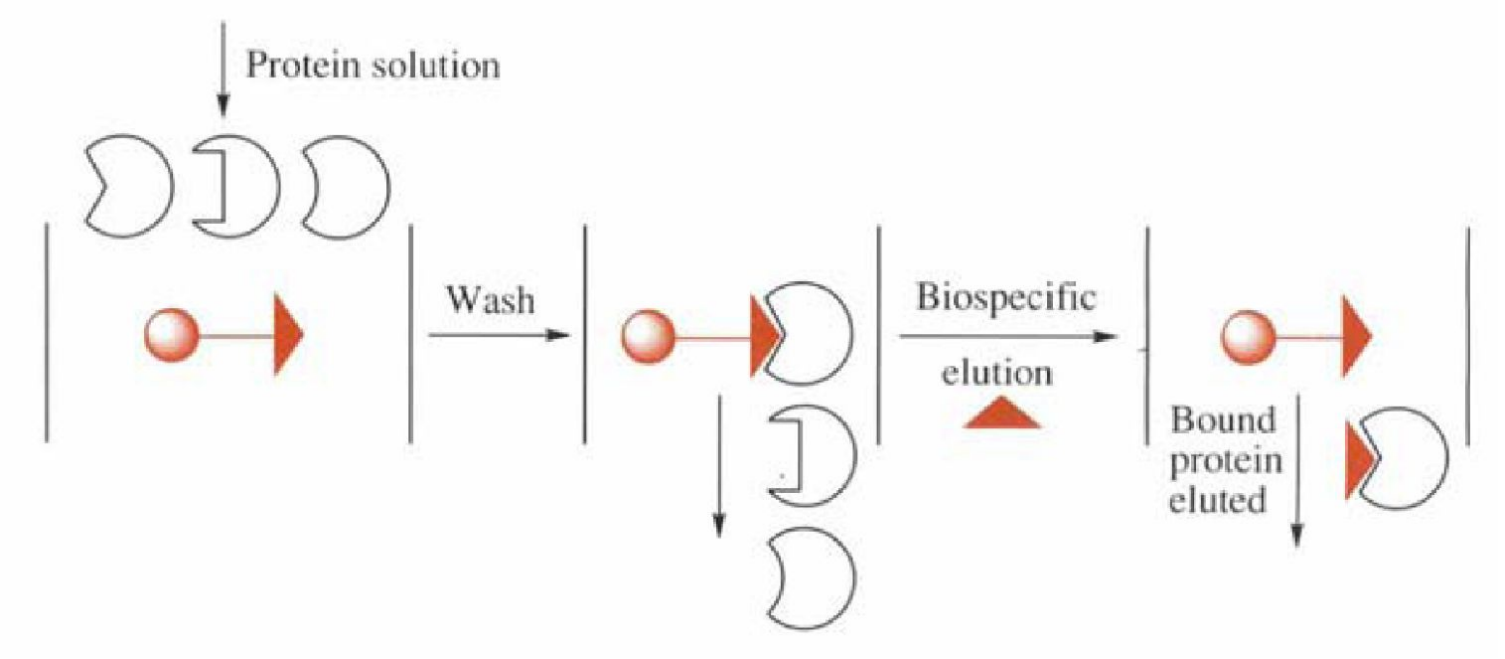
Афинная хроматография

Задача – выделить белок (пептид) с низким содержанием в смеси (клеточный экстракт, биологические жидкости)

Принцип – биоспецифическое связывание (сродство) лиганда и белка

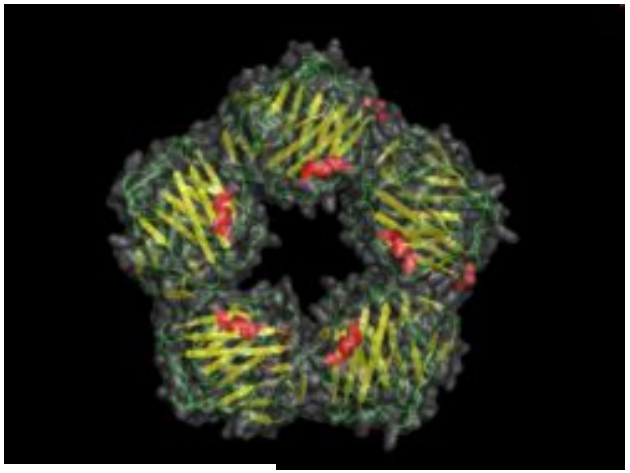
Носитель: инертный пористый материал (агароза, полиакриламид, кросс-сшитый декстран, стеклянные шарики), к которому ковалентно через спейсер присоединен лиганд.

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

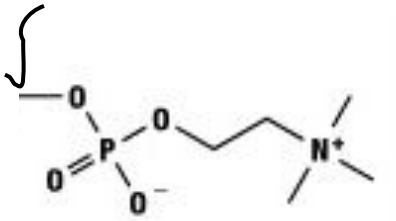


Афинная хроматография С-реактивного белка

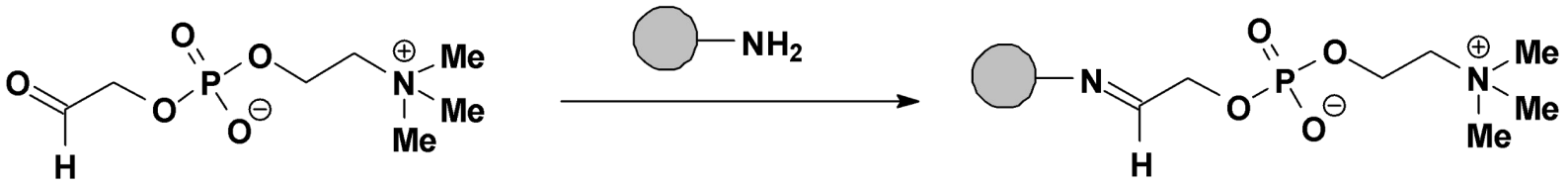
В ответ на инфекцию или повреждение тканей резко увеличивается концентрация некоторых белков плазмы крови , имеющих общее название "белки острой фазы". К этим белкам относится и С-реактивный белок (CRP , от англ. C-reactive protein). С-реактивный белок появляется в сыворотке вскоре после повреждения тканей и начала воспаления.



CRP человека состоит из пяти идентичных, нековалентно связанных полипептидных цепей, образующих замкнутый пентамер. Важное свойство CRP - способность связываться с фосфорилхолином.

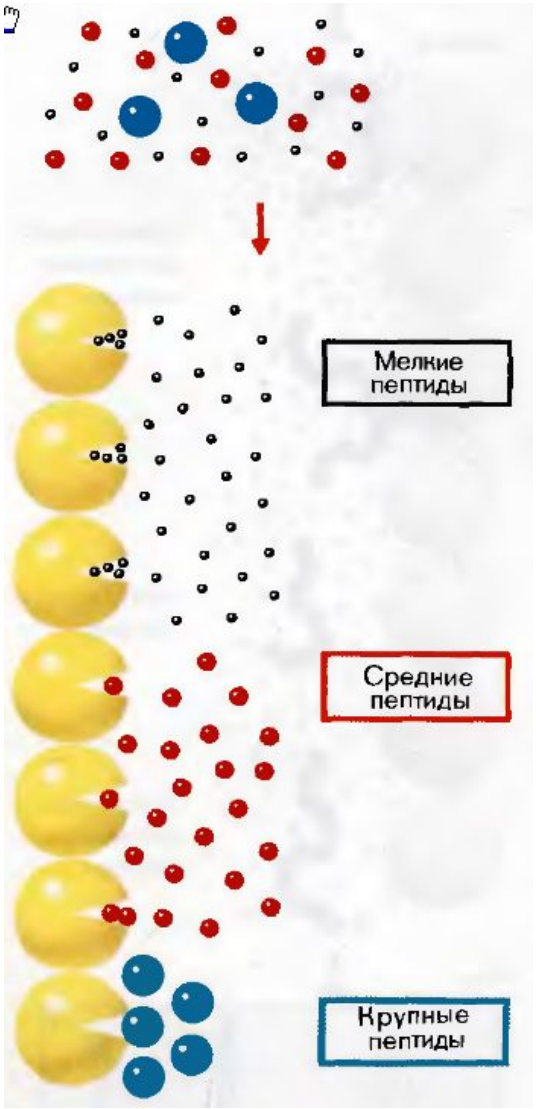


фосфорилхолин



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 поперечных сшивок. Выбор носителя определяется молкулярной массой разделяемых пептидов (белков)

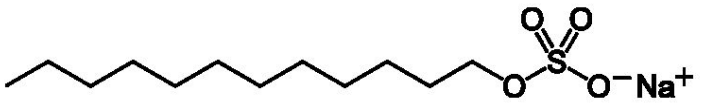
Недостаток – невозможно разделить молекулы с близкими массами!!!

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.

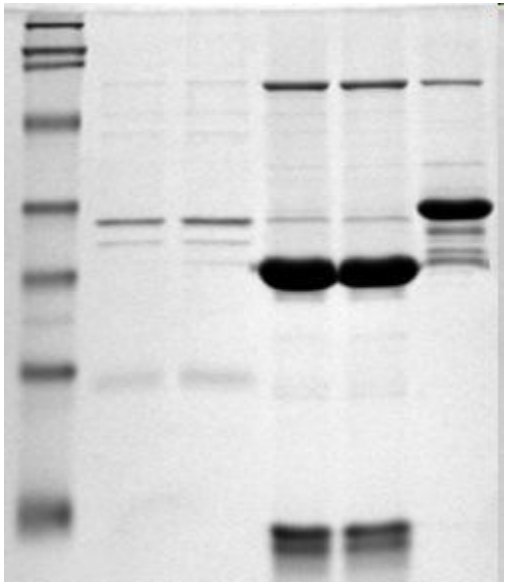
Проблема: электрофоретическая подвижность зависит от заряда белка и его молекулярной массы (пространственной конфигурации)

Наиболее распространенным вариантом электрофоретического анализа белков, является электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE, 1970 году Лэммли (U. K. Laemmli)).



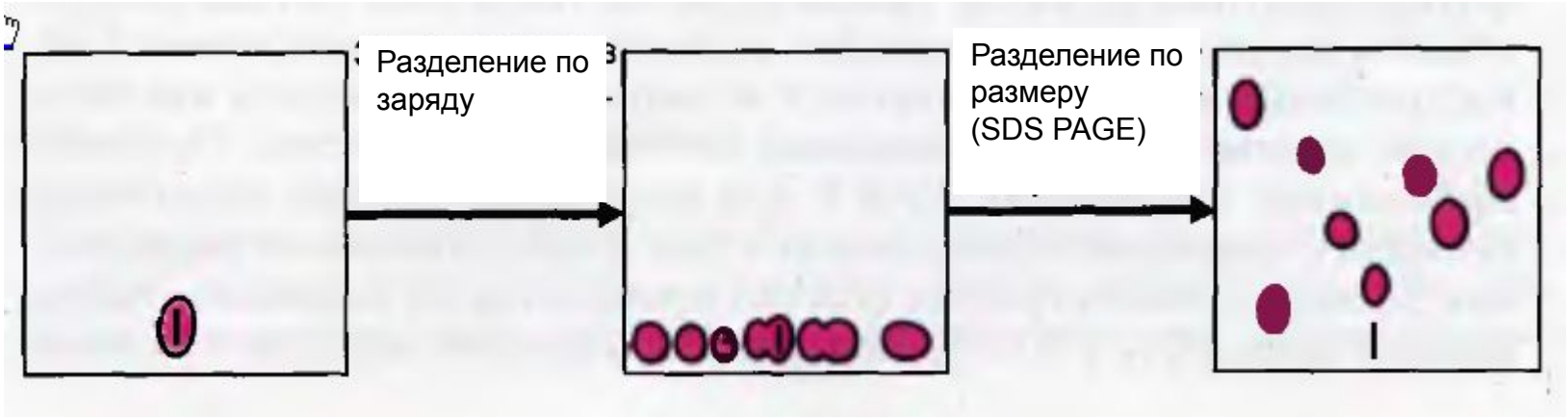
SDS

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 молекулу подвергаются второму разделению в направлении 90 градусов по направлению к первому форезу.

Мало вероятно что 2 молекулы будут обладать двумя одинаковыми индивидуальными свойствами, поэтому белки более эффективно разделяются 2-D электрофорезом, чем обычным электрофорезом.

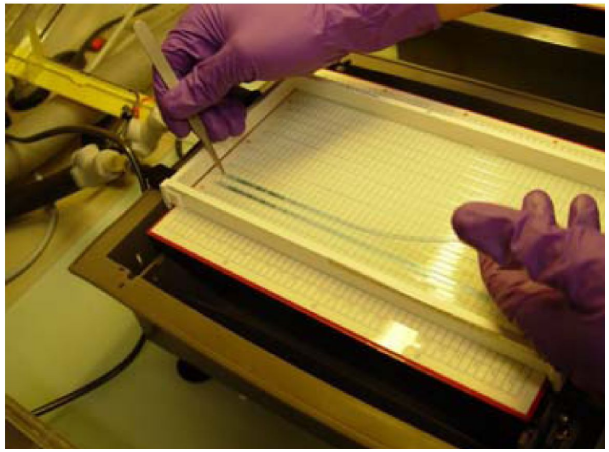
Изоэлектрическая точка (IEP) – значение pH при котором молекула не заряжена (нейтральна).

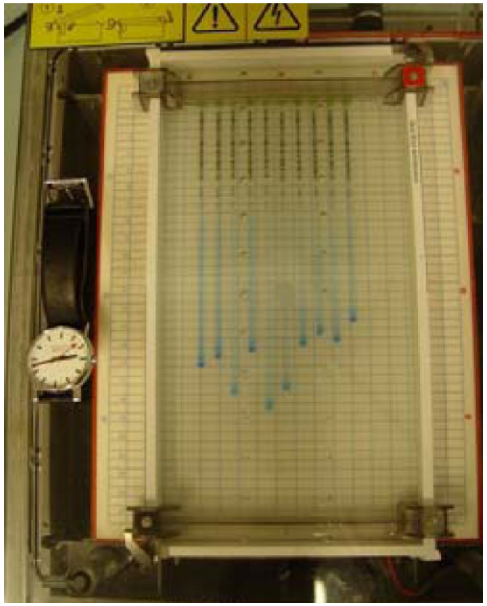
1. **Разделение по изоэлектрической точке**

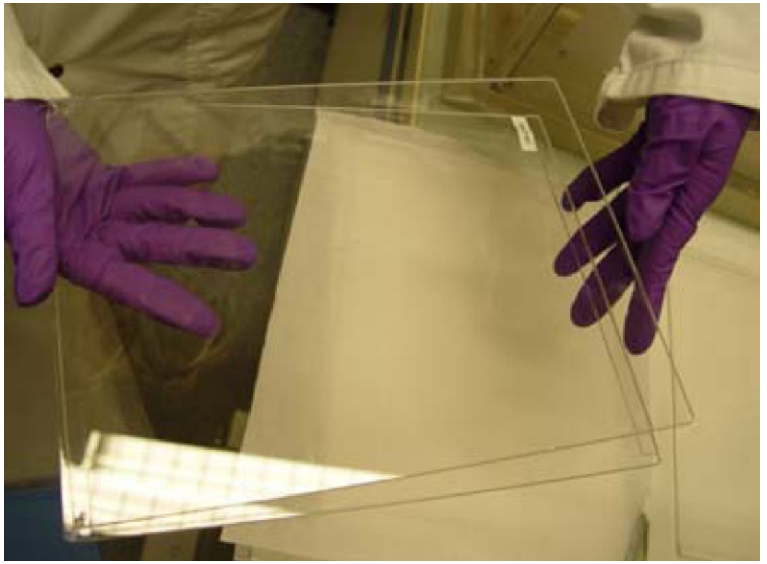
Разделение белков (пептидов) по IEP называется **изоэлектрическое фокусирование** (IEF). Белки распределяются по гелю в первом направлении и «накапливаются в изоэлектрической точке (заряд белка нейтральный)

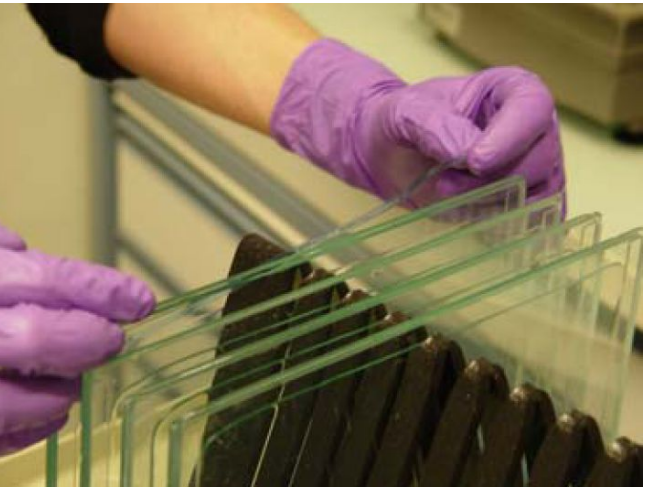
2. **Разделение по массе**

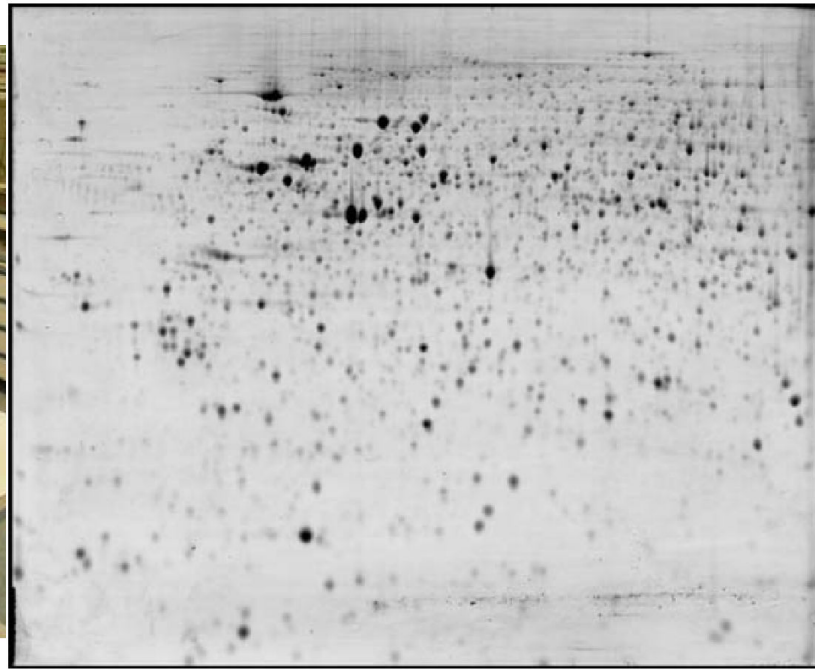
Используется стандартный SDS-электрофорез в направлении перпендикулярном первому.









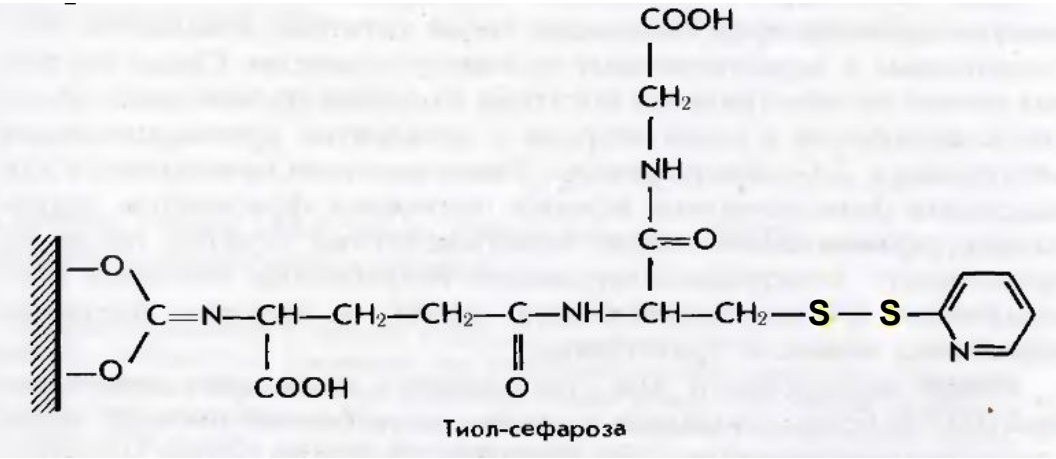
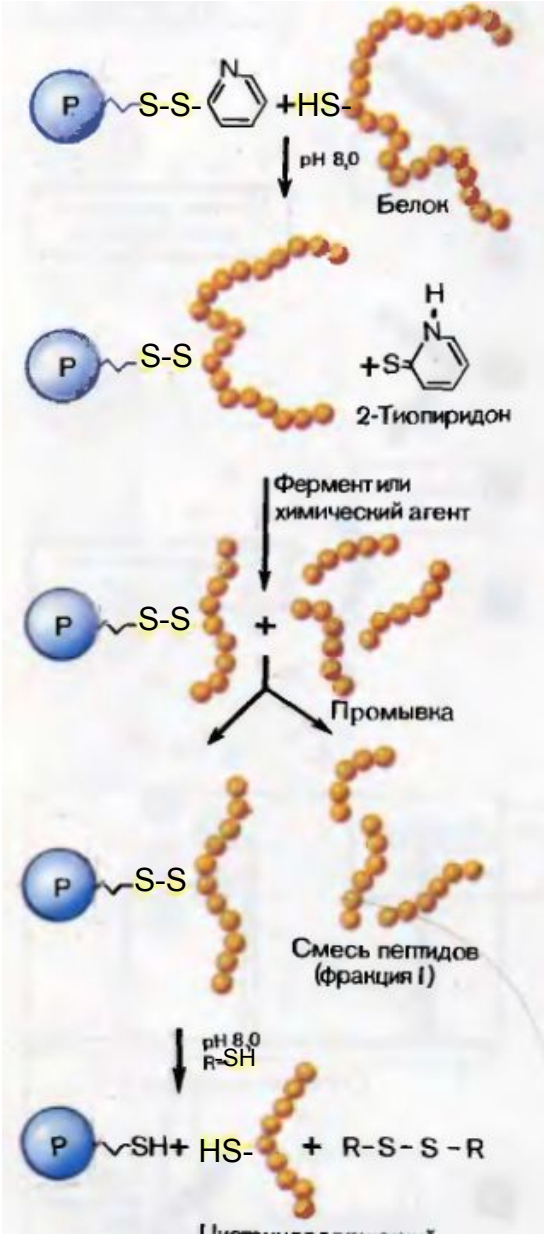


Хемоспецифическая хроматография

Задача – селективное выделение из смеси пептидов, содержащих определенные функцианальные группы (чаще всего SH)

Принцип – образование ковалентной связи между пептидом и носителем

Носитель: сефароза, пористое стекло, кремнезем, содержащие дисульфидную группировку



Тиол-сефароза