

А.Н. Ибрагимов, А.Г. Бикмуллин, Д.А. Сатаева,
Л.В. Лопухов, Л.И. Зайнуллин, Ф.К. Алимова

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ



Казань 2013

*Печатается согласно решению кафедры биохимии института фундаментальной
медицины и биологии К(П)ФУ от 18 января 2013 г.*

Рецензент –

доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии ИФМиБ К(П)ФУ,

Т.В. Багаева

Рецензент –

кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии ИФМиБ К(П)ФУ,

Т.А. Невзорова

**Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А., Лопухов Л.В.,
Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Хроматографические методы очистки
белков. Учебно-методическое пособие. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. –
48с.**

В пособии в простой и доступной форме описаны основные виды белковой хроматографии с практическими рекомендациями по ее проведению. Так же представлены две лабораторные работы по разделению смесей белков.

Предназначено для студентов, магистрантов, аспирантов и сотрудников биологических факультетов университетов.

УДК 577.2

**© Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А.,
Лопухов Л.В., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К., 2013**

Введение

Развитие способов и методов очистки белков является необходимой предпосылкой для прогресса биотехнологии. Ключ к успешной и эффективной очистке белка - это выбор наиболее подходящих техник и объединение их в единый логический путь, увеличивающий выход и минимизирующий количество шагов. Большинство стратегий очистки включает те или иные формы хроматографии. В результате хроматография стала важным инструментом в каждой лаборатории, где требуется очистка белка. Различные методы хроматографии с различной селективностью могут образовывать мощные комбинации для очистки любых биомолекул.

Хроматографический метод был предложен в 1903 году русским ученым М.С. Цветом. Он писал: «При фильтрации смешанного раствора через столб адсорбента пигменты... расслаиваются в виде отдельных, различно окрашенных зон. Подобно световым лучам в спектре, различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному определению. Такой расцветенный препарат я назвал хроматограммой, а соответствующий метод анализа хроматографическим методом». Работы М.С. Цвета послужили фундаментом для развития остальных видов хроматографии.

Целью этого пособия является ознакомление студентов с основами хроматографии и получение практических навыков её проведения. В первой части дается краткое описание разных видов хроматографии с практическими рекомендациями по выбору сорбентов, во второй части представлены лабораторные работы по разделению смесей белков.

1. Основные положения хроматографии

Хроматография - это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами - подвижной и неподвижной. **Неподвижной** (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество, которое называют сорбентом или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. **Подвижная** фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу (иногда под давлением).

Компоненты анализируемой смеси (**сорбаты**) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Неподвижную фазу обычно помещают в трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются **неудерживаемыми**, а время их удерживания определяет т.н. "**мертвое время**" колонки).

Таким образом происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов. Следует подчеркнуть следующие достоинства хроматографических методов:

1. Разделение носит динамический характер, причем акты сорбции-десорбции разделяемых компонентов повторяются многократно. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.

2. При разделении используют различные типы взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы: от чисто физических до хемосорбционных. Это обуславливает возможность селективного разделения широкого круга веществ.

3. На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.

4. Хроматография - гибридный метод, сочетающий одновременное разделение и определение нескольких компонентов.

5. Хроматография позволяет решать как аналитические задачи (разделение, идентификация, определение), так и препаративные (очистка, выделение, концентрирование). Решение этих задач можно сочетать, выполняя их в режиме “on line”.

Многочисленные методы классифицируются по агрегатному состоянию фаз, механизму разделения и технике проведения разделения. Хроматографические методы различаются и по способу проведения процесса разделения на фронтальный, вытеснительный и элюентный.

Для решения аналитических задач используется элюентный метод, он имеет следующие достоинства:

- дает наиболее полное разделение, поскольку зоны сорбатов разделены зонами элюента;
- сорбент непрерывно регенерируется;
- параметры удерживания хорошо воспроизводимы.

Элюентная хроматограмма, являющаяся зависимостью сигнала прибора (ось ординат) от времени или объема подвижной фазы (ось абсцисс), представляет собой совокупность пиков разделяемых компонентов. Обычно отдельный пик представляет собой **гауссову кривую**. Типичная хроматограмма приведена на рис. 1.

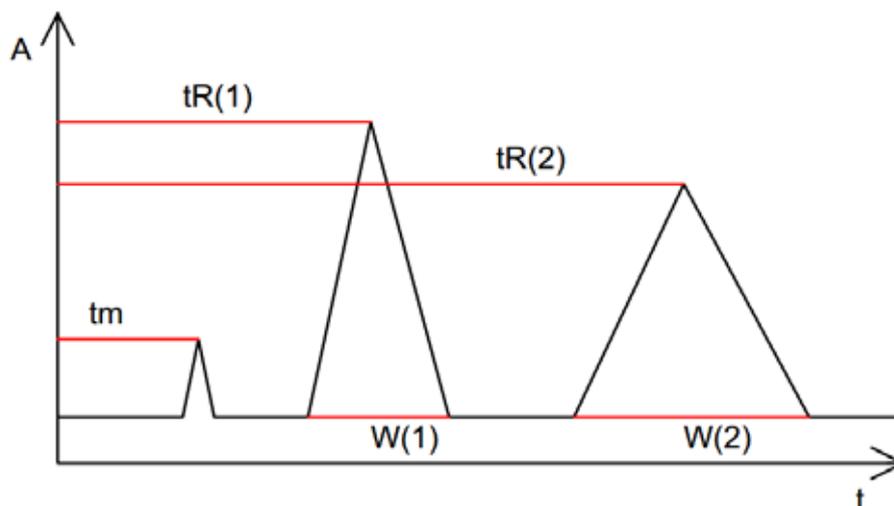


Рис.1 Хроматограмма смеси двух веществ

Рассмотрим основные хроматографические параметры, характеризующие поведение вещества в колонке. Время от момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума хроматографического пика

называют **временем удерживания** и обозначают - t_R . Время удерживания складывается из двух составляющих - времени пребывания веществ в подвижной фазе (t_m) и времени пребывания в неподвижной фазе (t_s)

Значение t_m фактически равно времени прохождения через хроматограф несорбируемого компонента. Значение t_R не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но зависит от природы вещества и сорбента (если изотерма сорбции вещества линейна), а также от упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности колонки следует ввести **исправленное время удерживания** (t'_R)

$$t'_R = t_R - t_m \quad (1)$$

Часто для характеристики удерживания **используют удерживаемый объем** — V_R - объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = F \cdot t'_R \quad (2),$$

где F - объемная скорость потока подвижной фазы ($\text{см}^3/\text{с}$) или (мл/мин).

По полученной хроматограмме смеси (рис. 1) можно рассчитать экспериментальные значения хроматографических параметров (**фактор удерживания (емкости) (k)**, **коэффициент селективности (α)**, **разрешение (R_s)**) и оценить эффективность хроматографической колонки.

Фактор удерживания показывает во сколько раз дольше вещество пребывает в неподвижной фазе, чем в подвижной. Стараются выбирать условия хроматографического разделения таким образом, чтобы эта величина составляла от 1,5 до 4к, её рассчитывают по формуле:

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3),$$

Расстояние между максимумами хроматографических пиков определяет селективность неподвижной фазы. **Фактор разделения (коэффициент селективности) α** есть мера относительного удерживания или относительной подвижности двух разделяемых веществ, и описывается уравнением:

$$\alpha = t'_{R2} / t'_{R1} = D_2 / D_1 \quad (4),$$

Для разделения двух веществ необходимо подобрать условия разделения так, чтобы **$D_1 \neq D_2$ и $\alpha > 1,00$**

Степень размывания хроматографического пика определяет эффективность колонки. Чем эффективнее колонка, тем уже пик, тем большее число компонентов можно разделить за более короткое время, т.е. время анализа сокращается. Количественно эффективность колонки может быть выражена **числом теоретических тарелок N** . Согласно концепции теоретических тарелок хроматографическую колонку представляют как ряд дискретных, соприкасающихся горизонтальных слоев, на которых мгновенно устанавливается равновесие между неподвижной и подвижной фазами, и акт сорбции-десорбции вещества повторяется многократно на каждом слое. Высота слоя - **высота, эквивалентная теоретической тарелке**, обозначается через **H** . Между параметрами существует соотношение:

$$H = L/N \quad (5),$$

где L - длина колонки.

Чем меньше **H** , тем большее число раз устанавливается равновесие между фазами при данной длине колонки, тем эффективнее разделение компонентов анализируемой смеси.

Из экспериментальных данных рассчитывают **N** по формуле:

$$N = 16 \left(\frac{tR}{W} \right)^2 \quad (6),$$

где W - ширина пика у основания.

Разделение двух соседних пиков характеризуется **разрешением R_s** . Разрешение является мерой полноты разделения двух веществ. Разделение считается полным, если R_s равно или больше 1,5.

Суммарное влияние основных параметров хроматографической колонки (эффективности, селективности и коэффициентов удерживания) на разрешение хроматографических пиков описывается уравнением:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot 2 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (7),$$

Таким образом, полнота разделения компонентов является функцией D, R_s, H и L.

Полученная хроматограмма анализируемой смеси позволяет определить ее качественный и количественный состав. Качественной характеристикой определяемых веществ являются их времена удерживания (объемы удерживания) и другие характеристики удерживания (t'_R, V'_R, k, индексы удерживания). Для целей идентификации используют также корреляционные зависимости параметров удерживания с некоторыми физико-химическими свойствами соединений в гомологическом ряду (например, числом метиленовых групп, температурой кипения).

Сопоставление площадей или высот хроматографических пиков позволяет оценить количественный состав смеси. В хроматографии используют три основных метода количественного анализа.

Метод абсолютной калибровки обычно предполагает построение градуировочного графика по стандартным смесям, как и в других физических методах.

В методе внутренней нормализации предполагается, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме, и сумма их площадей (S) равна 100%. Различия в чувствительности детектора к разным компонентам учитываются введением поправочных коэффициентов (K_i). Расчет ведут по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum_{i=1}^n (S_i \cdot K_i)} \quad (8),$$

где n - число компонентов смеси, S - площадь хроматографического пика, K_i - поправочные коэффициенты для каждого i-компонента.

Метод внутреннего стандарта предусматривает введение в

анализируемый образец известного количества эталонного соединения, хроматографирование полученной смеси и расчет по формуле:

$$c_i (\%) = \frac{S_i}{S_{st}} k c_{st} \quad (9),$$

где c_{st} - концентрация внутреннего стандарта введенного в пробу, k - поправочный множитель, который рассчитывают по стандартной смеси эталонного соединения.

2. Принципы и стандартные условия проведения хроматографической очистки белков

2.1 Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография (ИОХ) представляет собой метод, позволяющий разделять ионы и полярные молекулы на основе их заряда. Она может быть использована для разделения практически любых заряженных молекул, в том числе крупных белков, небольших нуклеотидов и аминокислот. Взаимодействие образца и сорбента основано на обратимом кулоновском взаимодействии. Сорбент имеет на поверхности ионные функциональные группы, которые взаимодействуют с ионами аналита противоположного заряда. Вид хроматографии, при которой отрицательно заряженные группы сорбента связывают положительно заряженный аналит, называется катионообменной. Если для связывания отрицательно заряженного аналита используют положительно заряженный сорбент, то говорят об аниообменной хроматографии. При выборе вида ионообменной хроматографии руководствуются изоэлектрической точкой белка pI (если она известна), при значении pH выше pI белок приобретает отрицательный заряд, если ниже то положительный.

Белки имеют многочисленные функциональные группы, которые могут иметь как положительные, так и отрицательные заряды. Во время ионообменной хроматографии белки разделяются в соответствии с их суммарным зарядом. Разделение осуществляется изменением pH или концентрации ионов подвижной фазы. Изменения вносят поэтапно или

непрерывным градиентом. Чаще всего образцы элюируют градиентом соли (NaCl).

Например, если белок имеет отрицательный заряд при $pH=7$, то он будет связываться с положительно заряженным сорбентом, в то время как положительно заряженные белки будут смыты потоком элюента (элюированы). При понижении pH , белок будет приобретать растущий положительный заряд и, в конце концов, также будет элюирован, что даст пик УФ поглощения на хроматограмме (Рис2).

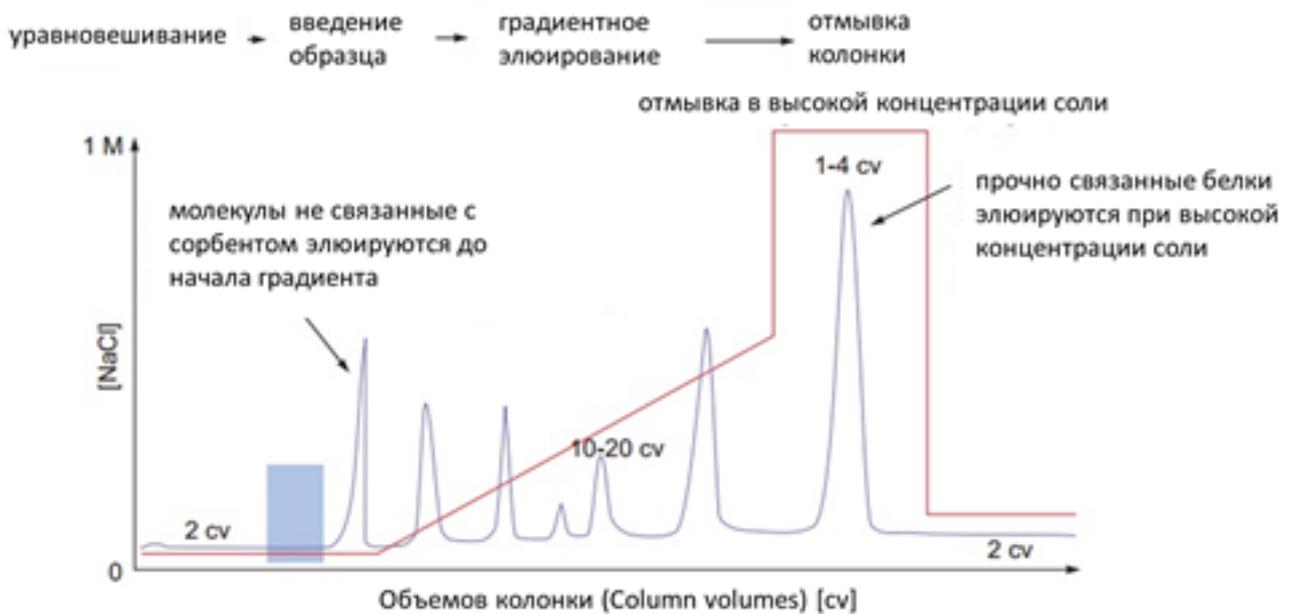


Рис. 2. Типичная хроматограмма ионообменного разделения.

Выбор ионообменника

В большинстве случаев рекомендуется начинать очистку с использования сильного ионообменника, позволяющего работать в широком диапазоне pH .

Сильные ионообменники:

Q (анионообменник), S и SP (катионообменники) полностью заряжены в широком диапазоне pH (2-12).

Слабые ионообменники:

DEAE (анионообменник) и CM (катионообменник) полностью заряжены в узком диапазоне pH (2-9 и 6-10, соответственно), но дают дополнительную избирательность при очистке.

Функциональные группы

Функциональные группы, используемые в ионообменных матрицах, представлены в таблице 1. Сила или слабость ионообменника относится к степени, в которой меняется ионизация функциональных групп в зависимости от рН. Но не относится к силе, с которой функциональные группы связываются с белками. Сильные ионообменники не присоединяют и не теряют протоны при изменении рН и поэтому не имеют буферную емкость, оставаясь полностью заряженными в широком диапазоне рН (Рис.3).

Таблица 1

Функциональные группы, используемые в ионообменных сорбентах

АНИОНООБМЕННИКИ		Функциональные группы
Quaternary ammonium (Q)	сильный	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$
Diethylaminoethyl (DEAE)	слабый	$-O-CH_2CH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
Diethylaminopropyl (ANX)	слабый	$-O-CH_2CHONCH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$
КАТИОНООБМЕННИКИ		Функциональные группы
Sulfopropyl (SP)	сильный	$-O-CH_2CHONCH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Methyl sulfonate (S)	сильный	$-O-CH_2CHONCH_2OCH_2CHONCH_2SO_3^-$
Carboxymethyl (CM)	слабый	$-O-CH_2COO^-$

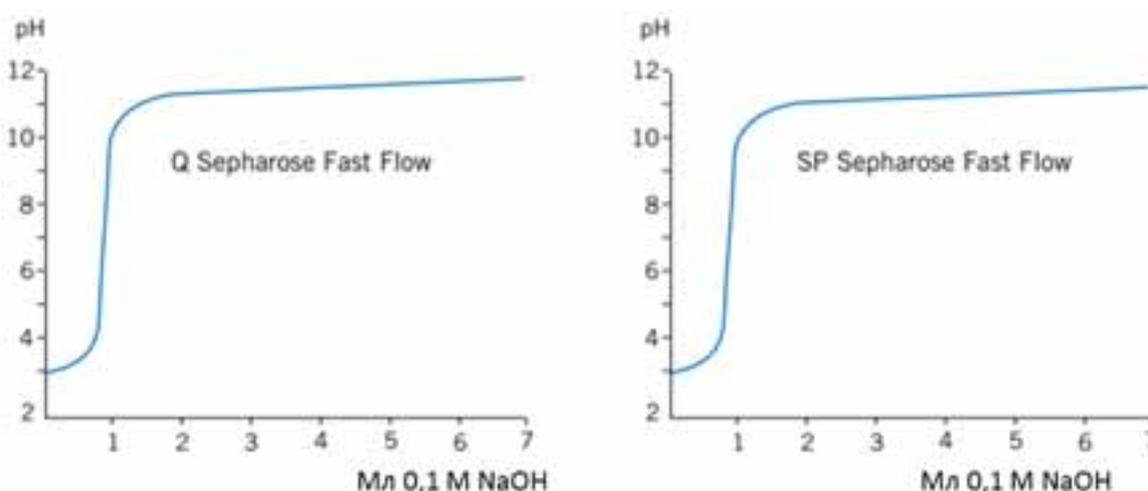


Рис.3 Кривые титрования сильных ионообменников Q Sepharose и SP Sepharose.

От работы с сильными ионитами есть несколько преимуществ:

- Механизм взаимодействия прост, поскольку нет промежуточных форм взаимодействия зарядов
- Способность к связыванию поддерживается и при высоком и при низком рН
- Легкая разработка и оптимизация протокола очистки

Большинство белков имеют изоэлектрические точки в пределах от 5,5 до 7,5 и могут быть разделены на любом из слабых или сильных ионообменников. Преимущество слабых ионообменников в том, что они дают различную селективность по сравнению с сильными. Их недостаток в том, что они меняют ионообменную емкость, присоединяя и отдавая протоны, в зависимости от рН (Рис.4).

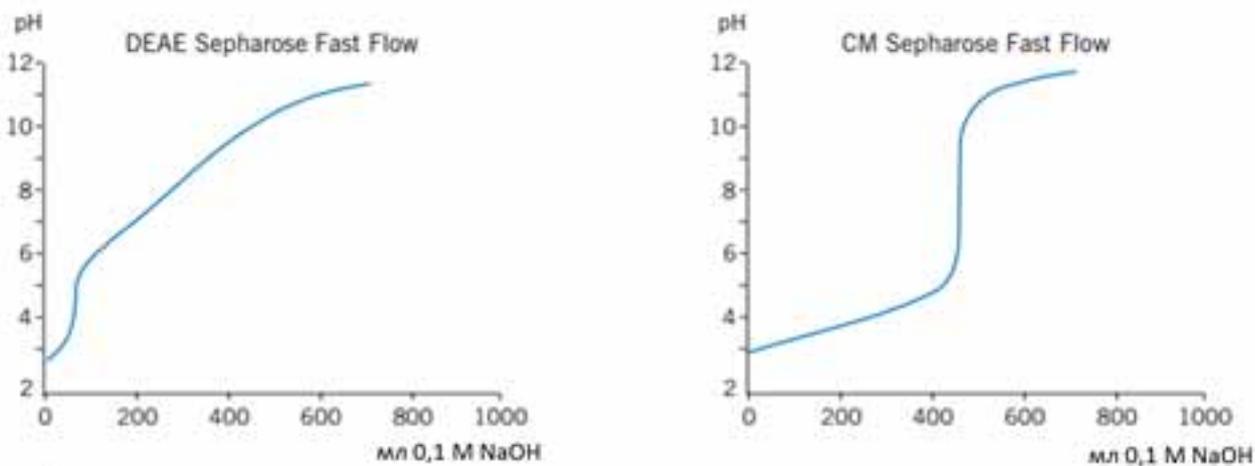


Рис.4 Кривые титрования слабых ионообменников DEAE Sepharose и CM Sepharose

Выбор сорбента

Такие параметры, как масштаб очистки, скорость разделения, разрешение, связывающая способность сорбента и стабильность образцов следует учитывать при выборе сорбента.

Подготовка образцов

Правильная подготовка образцов обеспечивает хорошее разрешение и продлевает срок службы колонки. Для эффективного связывания образцы должны находиться в том же рН и ионной силе, что и исходный буфер. Образцы должны быть свободны от твердых частиц, особенно при работе с бусинами диаметром 34 мкм или меньше. Общее количество белка, загружаемое на колонку не должно превышать общую связывающую способность колонки. Для оптимального разделения при градиентном элюировании используйте примерно одну пятую общей связывающей способности колонки.

Подготовка колонки

Для оптимизации методики, а так же для увеличения скорости и эффективности очистки, используйте небольшие готовые колонки. Придерживайтесь следующих правил, если вы решили набить колонку самостоятельно:

Размер колонки = Обычно слой геля составляет 5-15 см.

Количество геля = Рассчитайте количество геля, необходимое для связывания образца и используйте в пять раз больше, чтобы набить колонку.

Смотрите также отдельные инструкции к каждому конкретному сорбенту для получения подробной информации.

Приготовление буфера

Используйте очищенную воду и реактивы, не содержащие посторонних примесей и включений. Профильтруйте буфер через 0,45 или 0,22 мкм фильтр и убедитесь, что в нем не осталось пузырьков, которые в результате смогут существенно повлиять на разрешение. Ионы буфера должны иметь тот же заряд, что и выбранный сорбент, со значением $pK_a \pm 0,6$ рН единиц от рабочего рН. Выбирайте рН на 0,5-1 единицу выше pI точки, если она известна. Концентрация буфера должна быть достаточной для поддержания буферной емкости и постоянного рН во время загрузки образца, и когда используется градиент соли.

При работе с образцами, для которых pI неизвестно, попробуйте эти условия:

Анионообменник

Градиент 0-100%: 10-20 объемов буфера В

Начальный буфер А: 20мМ Tris-HCl, pH 8,0

Элюирующий буфер В: 20мМ Tris-HCl + 1М NaCl, pH 8,0

Катионообменник

Градиент 0-100%: 10-20 объемов буфера В

Начальный буфер А: 20мМ Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 6,8

Элюирующий буфер В: 20мМ Na₂HPO₄ x 2H₂O + 1М NaCl, pH 6,8

Очистка и хранение колонок

Рекомендуемые условия для хранения описываются в инструкции к колонке. Обычно это 20% этанол при 4 °С.

2.2 Хроматография гидрофобных взаимодействий

Гидрофобная хроматография (ГХ) представляет собой метод разделения, основанный на свойстве гидрофобности белков. Белки, содержащие гидрофобные аминокислоты на поверхности, могут обратимо связываться с гидрофобными группами сорбента (фенил, октил, бутил и др.). Образец в буфере с высокой ионной силой (например, 1,5М сульфат аммония) связывается с сорбентом. Это взаимодействие усиливается за счет высокой ионной силы буфера, поэтому ГХ идеальный «следующий шаг» после осаждения белка сульфатом аммония или элюирования солью во время ИОХ. В обоих случаях в образце присутствует высокая концентрация соли, и он может быть разделен с помощью ГХ без дополнительной подготовки. После связывания с сорбентом условия изменяются так, что вещества поочередно вымываются. Элюирование обычно осуществляется уменьшением концентрации соли (Рис.5). Изменения вносят поэтапным или непрерывным уменьшением солевого градиента. Другие виды элюции такие, как градиент этилен гликоля, добавление хоатропных агентов (мочевина, гуанидин хлорид и др.) и детергентов или изменение pH и температуры так же могут быть применены.

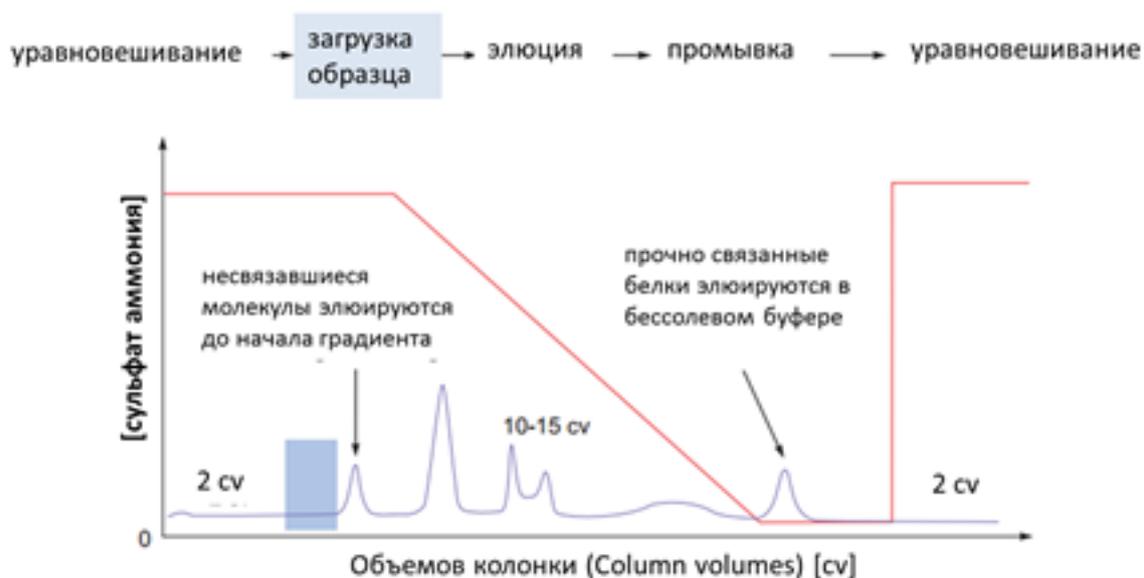


Рис.5 Типичная хроматограмма гидрофобного разделения.

На рис.6 показано, как стандартные белки могут быть разделены ГХ. В этом примере все белки взаимодействуют с гидрофобной поверхностью сорбента. По мере уменьшения ионной силы буфера связь ослабевает и белки с самой низкой степенью гидрофобности элюируются в первую очередь. Наиболее гидрофобные белки элюируются в последнюю очередь.

Сорбенты для гидрофобной хроматографии состоят из лиганда, содержащего алкильные или арильные группы, который связан с инертной матрицей сферической формы. Матрица содержит поры для увеличения внутренней поверхности.

При использовании ГХ стоит учитывать способность определенных солей влиять на гидрофобные взаимодействия белков. Способность ионов элюировать или осаждать белки представлена в ряду Гоффмайстера (Рис.7). Маленькие ионы несущие большой заряд являются сильными "соосаждателями", тогда как органические кислоты и основания повышают растворимость и стабилизируют белки в растворе. Соли натрия, калия, аммония и сульфаты являются сильными осаждающими агентами и оказывают стабилизирующее действие на белки. Именно поэтому наиболее часто используемые соли - это сульфат аммония, сульфит аммония, хлорид натрия, хлорид калия и ацетат аммония.

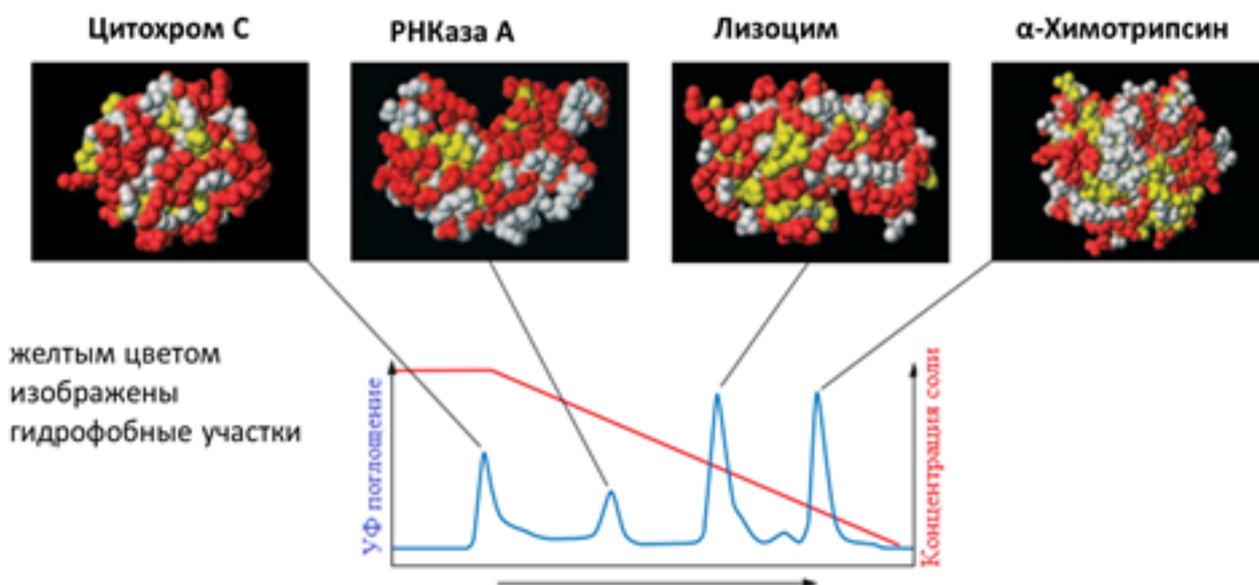


Рис.6 Разделение белковых молекул в зависимости от площади поверхностей их гидрофобных участков (желтым цветом показаны гидрофобные аминокислоты, красным – гидрофильные) (<http://www.gelifesciences.com>)

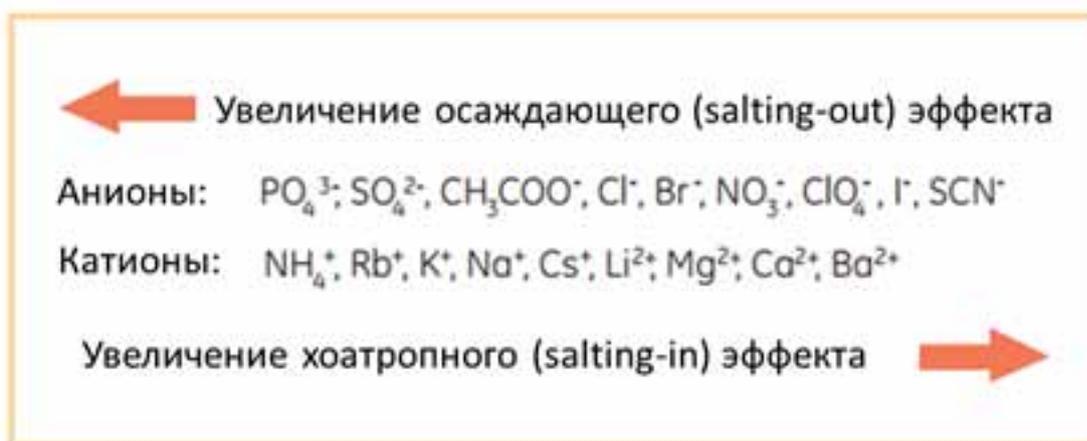


Рис.7 Ряд Гофмейстера, показывающий влияние некоторых ионов на растворимость белков.

Количество белка, которое связывается с гидрофобным сорбентом, увеличивается почти линейно до определенной концентрации соли. Затем, при дальнейшем увеличении концентрации соли, количество продолжает увеличиваться экспоненциально. Если белок является нестабильным или его стабильность не известна, то предпочтительнее выполнить связывание белка в том регионе, где количество связанного белка линейно возрастает с концентрацией соли.

Выбор гидрофобного сорбента

В то время как лиганд в значительной степени определяет гидрофобность сорбента, матрица может также оказывать влияние на конечную селективность. Матрицы для гидрофобной хроматографии представляют собой пористые инертные материалы, физически и химически устойчивые к экстремальным условиям очистки. Оптимальный баланс между пористостью и размером частиц предполагает большую площадь поверхности, и поэтому обеспечивает высокую связывающую способность. Так же высокая пористость с открытой пористой структурой позволяет увеличить скорость потока без ущерба связывающей способности. Инертность матрицы уменьшает неспецифическое взаимодействие с образцами. Высокая физическая стабильность гарантирует то, что объем сорбента останется постоянным, несмотря на резкие изменения концентрации соли и pH, тем самым улучшая воспроизводимость. Высокая химическая стойкость позволяет очищать колонку агрессивными чистящими средствами. Современные сорбенты изготавливаются на основе химически и физически стабильных полимерных или агарозных матриц (Табл. 2).

Таблица 2

Гидрофобные матрицы компании “GE healthcare”

Матрица	Материал	Средний размер частиц
SOURCE 15	Полистирол/дивинилбензол	15 мкм
Sepharose High Performance	Агароза 6%	34 мкм
Sepharose 6 Fast Flow	Агароза 4%	90 мкм
Sepharose 4 Fast Flow	Агароза 4%	90 мкм

Матрица торговой марки SOURCETM изготовлена из полистирола/дивинилбензола и представляет собой сферические (монодисперсные) малые (15мкм) частицы (Рис.8), которые обеспечивают высокое разрешение разделения при высокой скорости потока. Матрицы под

коммерческими названиями Sepharose™ представляет собой гидрофильные цепочки агарозы с различной степенью межцепочечного сшивания (Рис.9). Наиболее подходящая матрица подбирается в соответствии с необходимой скоростью потока, степенью разрешающей и связывающей способностей. Например, градиентное элюирование на Sepharose 34мкм даст высокое разрешение разделения в то время как более крупные частицы Sepharose 90 мкм имеют больший объем и пригодны для большей скорости потока.



Рис.8 Электронная микрофотография SOURCE™. Сферические, монодисперсные частицы.
(<http://www.gelifesciences.com>)



Рис.9 Структура поперечно-сшитой агарозы (Sepharose™).

(<http://www.gelifesciences.com>)

Очень гидрофобные белки связываются гидрофобным лигандом очень сильно и могут требовать экстремальных условий элюирования, например, хоатропных агентов или детергентов. Поэтому следует начинать с сорбентов с низкой гидрофобностью. Выберите сорбент, который дает лучшее разрешение и большую емкость при достаточно низкой концентрации соли. Обычно сила связывания лигандов с белком увеличивается в ряду: эфир, изопропил, бутил, октил, фенил. Тем не менее, характер связывания, селективность и прочность взаимодействия могут варьировать и должны быть проверены в каждом отдельном случае. Наиболее распространенные гидрофобные лиганды приведены в таблице 3. В общем, сорбенты для гидрофобной хроматографии делятся на две группы, в зависимости от характера их взаимодействия с компонентами образца. Прямые алкильные цепи (бутил, октил, эфир, изопропил) демонстрируют только гидрофобные свойства, а арильный лиганд (фенил) проявляет и ароматические и гидрофобные свойства.

Гидрофобные лиганды используемые в гидрофобной хроматографии

Фенил	$-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$	Октил	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
Бутил-S	$-\text{S}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	Эфир	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$
Бутил	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	Изопропил	$-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Подготовка образцов

Правильная подготовка образцов обеспечивает хорошее разрешение и продлевает срок службы колонки. Для эффективного связывания образцы должны находиться в том же pH и ионной силе (например, 1,5М сульфат аммония или 4М NaCl), что и исходный буфер. Образцы должны быть свободны от твердых частиц, особенно при работе с бусинами диаметром 34 мкм или меньше. Общее количество белка, загружаемое на колонку не должно превышать общую связывающую способность колонки. Для оптимального разделения при градиентном элюировании используйте примерно одну пятую общей связывающей способности колонки.

Подготовка колонки

Для оптимизации методики, а так же для увеличения скорости и эффективности очистки, используйте небольшие готовые колонки.

Придерживайтесь следующих правил, если вы решили набить колонку самостоятельно:

Размер колонки = обычно слой геля 5-15 см.

Количество геля = рассчитайте количество геля, необходимое для связывания образца и используйте в пять раз больше, что бы набить колонку.

Смотрите также отдельные инструкции к каждому конкретному сорбенту для получения подробной информации.

Приготовление буфера

Выберите рН совместимое со стабильностью и активностью белка. Концентрация буфера должна быть достаточной для поддержания рН во время нанесения образца и изменения концентрации соли.

При работе с образцами, характеристики которых вам не известны, попробуйте следующие условия:

Градиент 0-100%: 10-20 объемов буфера В;

Начальный буфер А: 50мМ фосфат натрия, рН 7,0+ 1-1,5 М сульфата аммония;

Элюирующий буфер В: 50мМ фосфат натрия, рН 7,0.

Очистка и хранение колонок

Рекомендуемые условия для хранения описываются в инструкции к колонке. Обычно это 20% этанол при 4 °С.

2.3 Гель-фильтрация

Гель-фильтрация (ГФ) или эксклюзионная хроматография (ситовая, гель-проникающая, гель-фильтрационная хроматография) представляет собой метод разделения молекул в соответствии с их размером. В отличие от ионообменной и аффинной хроматографии молекулы образца не связываются с сорбентом, таким образом, состав буфера не влияет на разрешающую способность (расстояние между пиками) метода. Следовательно, важным преимуществом ГФ является то, что условия среды могут быть изменены в соответствии с типом образца или требованиями для дальнейших шагов очистки и хранения. ГФ хорошо подходит для биомолекул, которые чувствительны к изменениям рН, концентрации ионов металлов, кофакторов и других условий среды. Разделение может быть выполнено в присутствии необходимых ионов, кофакторов, детергентов, мочевины, гуанидин гидрохлорида, при высокой или низкой ионной силе, при 37°C или на холоду, в соответствии с требованиями эксперимента.

Переход молекул вещества из подвижной фазы в неподвижную и обратно за счет диффузии ничем не затруднен. Иная ситуация складывается внутри гранул сорбента. Здесь диффузия более или менее затруднена из-за столкновений молекул диффундирующего вещества с нитями пространственной сетки полимера или стенками пор.

Если размеры молекул соизмеримы со средним диаметром каналов в гранулах, то эти затруднения становятся весьма существенными и диффузия тормозится. Может сложиться и такое положение, когда часть внутреннего объема гранул, т.е. часть объема неподвижной фазы (а иногда и весь этот объем), оказывается недоступной для молекул вещества, растворенного в подвижной фазе. Различие степени доступности объема неподвижной фазы для молекул различных компонентов исходной смеси веществ является фактором, определяющим возможность их фракционирования. Очевидно, что оно будет происходить по размерам молекул (Рис10). Крупные молекулы, вовсе не проникающие внутрь гранул, будут выходить из колонки первыми. В то же время мелкие молекулы, свободно диффундирующие внутрь гранул, часть времени будут находиться в неподвижной фазе. Таким образом, все мелкие молекулы выйдут из колонки более или менее одновременно и заведомо позднее, чем крупные. Очевидно, что размеры молекул связаны с их массами, но отнюдь не целиком ими определяются. Это особенно важно учитывать в случае макромолекул, размеры которых могут существенно

зависеть от плотности упаковки полипептидной или полинуклеотидной цепи. В ограничении свободы диффузии через пространственную сетку пор внутри гранул немалую роль может играть и форма молекулы. Очевидно, что сферическая глобула будет диффундировать иначе, чем молекула такого же объема, но вытянутая в виде палочки.

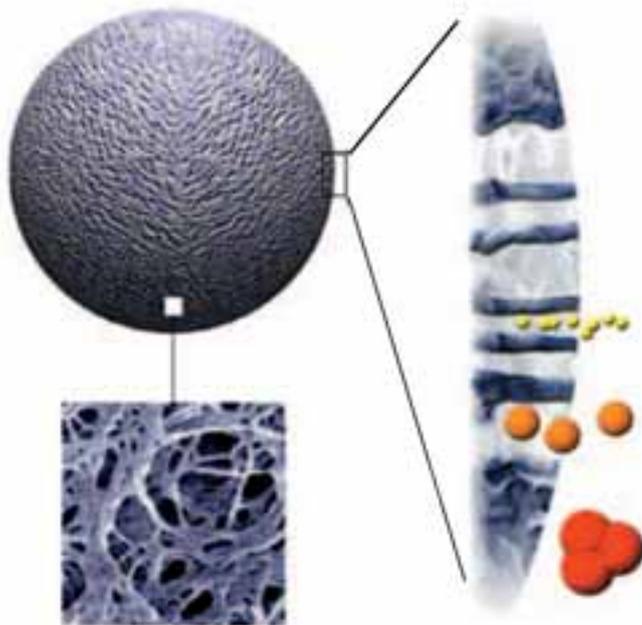


Рис. 10 Схематическое изображение шарика сорбента и его электронное приближение (<http://www.gelifesciences.com>)

Гель-фильтрация используется для сравнительного определения молекулярных масс, на завершающем этапе очистки, для обессоливания или быстрой смены буфера. Типичная ГФ хроматограмма представлена на рисунке 11.

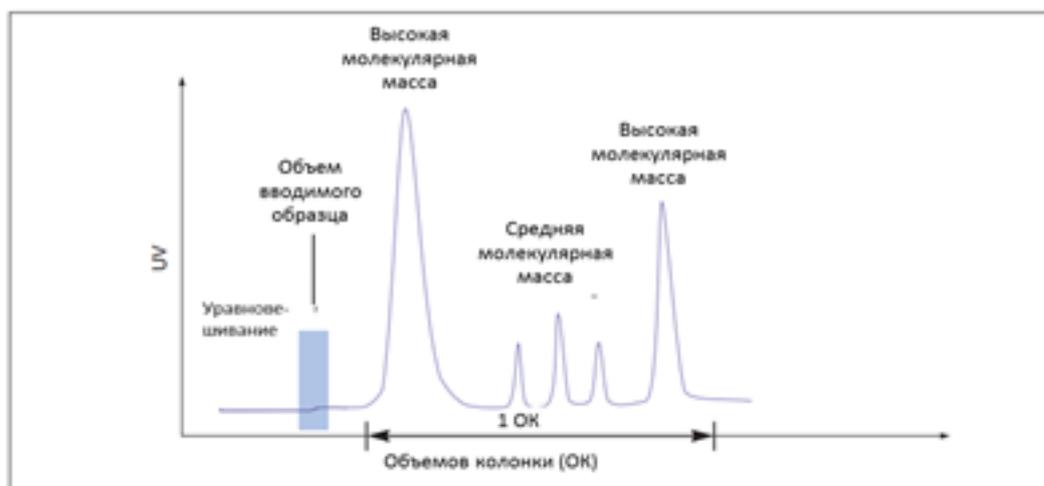


Рис. 11 Типичная ГФ хроматограмма

Выбор сорбента

Пористые материалы для гель-фильтрации чаще всего выпускаются в виде сферических гранул целого набора диаметров с различными средними размерами пор. Для разделения смесей биополимеров, прежде всего белков, используют гидрофильные полимерные сорбенты (сефадексы, супердексы - декстраны с поперечными сшивками, а также полиакриламидные гели - сефакрилы) или модифицированные полисахаридами макропористые силикагели. Они названы универсальными коммерческими именами. В таблице 4 изображена схема, на которой можно наблюдать соответствие различных типов сорбентов для ГФ молекулярным массам исследуемых молекул белков. С помощью существующих сорбентов можно разделять вещества с молекулярной массой от 100 до 80 000 000 Да. В таком диапазоне можно разделять как пептиды, так и большие белковые комплексы. Селективность сорбента зависит исключительно от количества и размера пор и описывается кривой селективности. Диапазон фракционирования - это диапазон молекулярных масс, которые способны частично проходить в поры сорбента, т.е. молекулы в пределах этого диапазона могут быть разделены с высоким разрешением.

В таблице 4 приведены некоторые типичные носители, используемые в гель-фильтрации. Данный список не является исчерпывающим, и есть множество других материалов сорбентов. Выбор материала и марки сорбента зависит от конкретных требований условий гель-фильтрации. Sephacryl[®], Sephadex[®], Sepharose[®] и Superdex[®] являются зарегистрированными торговыми марками компании "GE healthcare". Сорбенты Toyopearl[®] компании "Tosoh Bioscience" также могут быть применены в ГФ. Сорбенты, изготовленные из полиметакрилата применимы для различных диапазонов фракционирования молекул.

Некоторые распространенные сорбенты для ГФ

Материал сорбента	Название колонки и диапазон фракционирования молекул (глобулярных белков, kDa)	Преимущества	Недостатки
Декстран	Sephadex G-10 0–700 Da Sephadex G-25 1–5 kDa Sephadex G-50 1.5–30 kDa Sephadex G-100 4–150 kDa Sephadex G-200 5–600 kDa	Меньший диапазон фракционирования (G-10, G-25) благоприятен для обессаливания	Расширенные формы требуют низкого давления / гидростатичность
Агароза	Sepharose 6B 10–4,000 kDa Sepharose 4B 60–20,000 kDa Sepharose CL-4B 60–20,000 kDa Sepharose CL-2B 70–40,000 kDa	Благоприятно для больших молекул. Химически "сшитая" форма сорбента более прочная.	Колонка постоянно должна быть смоченной, чтобы избежать высыхания
Аллил-декстран-бис акриламид	Sephacryl S-200 HR 5–250 kDa Sephacryl S-300 HR 10–1,500 kDa Sephacryl S-400 HR 20–8,000 kDa	Материал сорбента не подвержен биodeградации / механ. надежность	Колонка постоянно должна быть смоченной, чтобы избежать высыхания

Подготовка образцов

Правильная подготовка образцов обеспечивает хорошее разрешение и продлевает срок службы колонки. Состав буфера не влияет на эффективность разделения. Образцы должны быть свободны от твердых частиц, особенно при работе с бусинами диаметром 34 мкм или меньше.

Подготовка колонки

В ГФ правильная набивка колонки имеет решающее значение. Разрешающая способность между двумя фазами увеличивается пропорционально квадратному корню длины колонки. Придерживайтесь следующих правил, если вы решили набить колонку самостоятельно:

Размер колонки = min 50см высота слоя для Sephacryl, min 30 см высота слоя для Superdex, Superose

Количество геля = в зависимости от объема образца.

Смотрите также отдельные инструкции к каждому конкретному сорбенту для получения подробной информации.

Приготовление буфера

Выбор буфера не влияет на эффективность разделения. Выберите буфер, в который образец должен быть собран и в котором образец сохраняет активность и стабильность. Концентрация буфера должна быть достаточной для поддержания pH. Ионную силу рекомендуется не повышать выше 150мМ NaCl, чтобы избежать неспецифического ионного взаимодействия с матрицей.

Очистка и хранение колонок

Рекомендуемые условия для хранения описываются в инструкции к колонке. Обычно это 20% этанол при 4 °С.

2.4 Аффинная хроматография

Аффинная хроматография (АХ) представляет собой метод разделения биологических молекул, который основана на специфичных взаимодействиях между белком (или белковым компонентом) и специфическим лигандом связанным с матрицей. Техника обладает высокой селективностью и, следовательно, дает высокое разрешение, а само вещество может быть очищено в несколько тысяч раз. Аффинная хроматография является уникальной технологией очистки т.к. только она позволяет очистить биомолекулы на основе их биологических функций или химической структуры. Очистка белков, которая была бы затруднена или вовсе не возможна с использованием других методов бывает, возможна благодаря АХ. Биологическое взаимодействие между лигандом и молекулой - мишенью может быть результатом образования водородных связей, электростатического, Ван-дер-Ваальсового или гидрофобного взаимодействия. Элюция осуществляется либо специфически – использованием конкурентного лиганда, либо неспецифически – путем изменения рН, ионной силы или полярности. Один шаг аффинной очистки дает огромную экономию времени по сравнению с менее селективными многоступенчатыми процедурами.

Успешная аффинная очистка требует биоспецифического лиганда, который может быть ковалентно связан с хроматографической матрицей. К лиганду предъявляются два требования: во-первых он должен сохранить свое сродство после вымывания не связываемого материала, во-вторых связь между лигандом и молекулой-мишенью должна быть обратимой, чтобы целевое вещество могло быть удалено в активной форме. Некоторые типичные биологические взаимодействия, часто используемые в АХ представлены ниже:

- Фермент – субстрат, ингибитор, кофактор;
- Антитело – антиген, вирус, клетка;
- Лектин – полисахарид, гликопротеин, рецептор на клеточной поверхности, клетка;

- Нуклеиновые кислоты – комплементарные последовательности, гистоны, ДНК или РНК полимеразы, белки связывающие нуклеиновые кислоты;
- Гормон, витамин – рецептор, белок-переносчик;
- Глутатион – глутатион-S-трансфераза или связанный с ней протеин;
- Ионы металлов – белки с полигистидиновым тегом, белки с цистеновыми и/или триптофановыми остатками на поверхности.

Так же аффинная очистка может использоваться для удаления определенных загрязнителей, например, Benzamidine Sepharose[®] удаляет сериновые протеазы (тромбин, фактор свертывания X и др.). Ключевые этапы аффинного разделения представлены на рисунке 12.

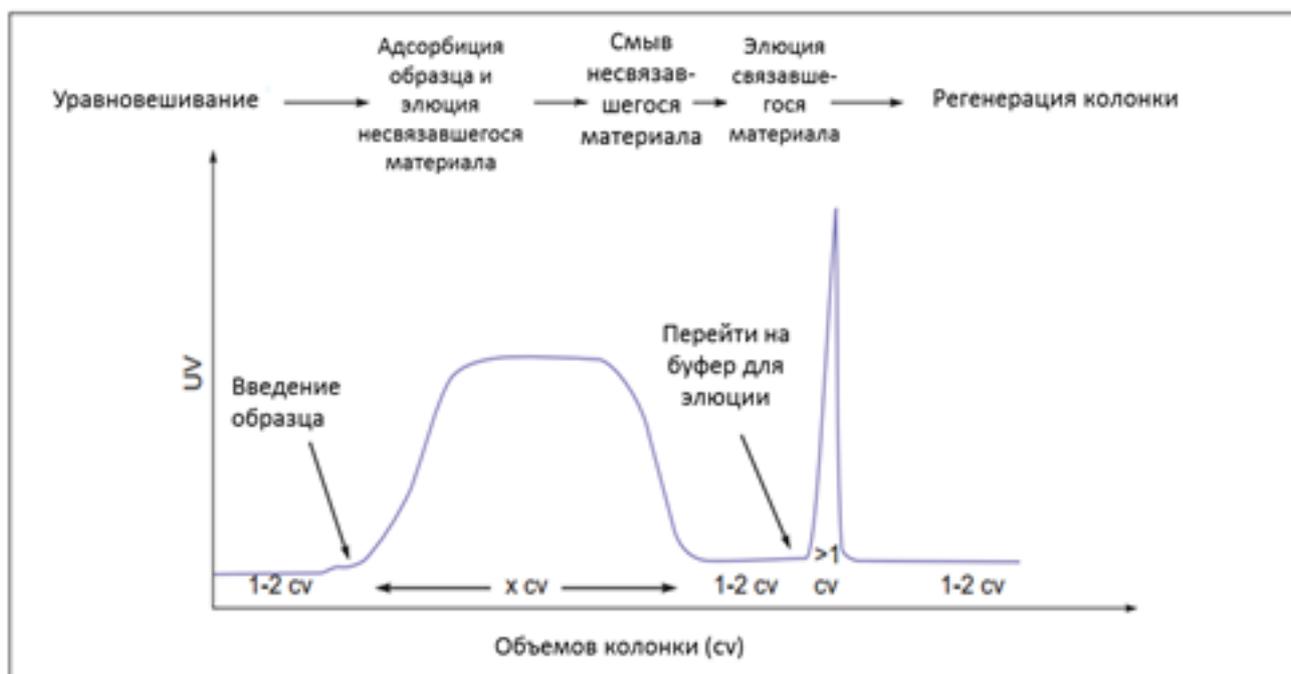


Рис. 12 Этапы аффинного разделения белков

Некоторые белки разделяемые аффинной хроматографией

Иммуноглобулины

Разнообразие антиген – антитело взаимодействий создало множество приложений для антител и их фрагментов. Они используются в терапии, диагностике и научных исследованиях. Использование технологии рекомбинантных ДНК дало возможность манипулировать их свойствами для решения многих задач. Значительным преимуществом для очистки антител и их фрагментов является то, что известно много информации о свойствах молекул – мишеней антител.

IgG, фрагменты IgG и подклассы

Разделение IgG и его фрагментов основано на высоком сродстве к белку А. Аналогичный белок G связывается с Fc-фрагментом IgG. Белки А и G – это бактериальные протеины (из *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus*, соответственно) которые на сефарозной матрице образуют чрезвычайно полезный и простой сорбент для многих рутинных процедур.

Рекомбинантные белки, содержащие метку

Очистка рекомбинантного белка часто может быть упрощена за счет включения тега определенного размера, который дает возможность простой аффинной очистки. Чаще всего используются теги глутатион-S-трансферазы (GST) и гексагистидина (His)₆. Метка белка А так же используется для достижения аффинности между IgG и белком. Теги вводятся либо в плазмиду либо в ПЦР праймеры, во время амплификации целевого фрагмента.

Тег глутатион-S-трансферазы является одним из наиболее распространенных, используемых для облегчения очистки рекомбинантных белков. Ассортимент продукции для одностадийной очистки GST-меченых белков огромен. Гистидиновые теги такие как (His)₆ и (His)₁₀ так же часто используются для аффинной очистки.

Белки с гистидиновыми тегамы сильно связываются с сорбентом и элюируются высокими концентрациями имидазола. Это обеспечивает

удаление загрязнений, которые могут элюироваться совместно с целевым белком.

Очистка или удаление сериновых протеаз

Во время многих процедур очистки внутриклеточные протеазы попадают в раствор, и что бы избежать нежелательного протеолиза добавляются ингибиторы протеаз. Вместо добавления ингибиторов можно использовать аффинные сорбенты для удаления или выделения протеаз из образца. Синтетический ингибитор пара-аминобензамидин используется в качестве аффинного лиганда для трипсина, трипсиноподобных сериновых протеаз и зимогенов (Рис.13).

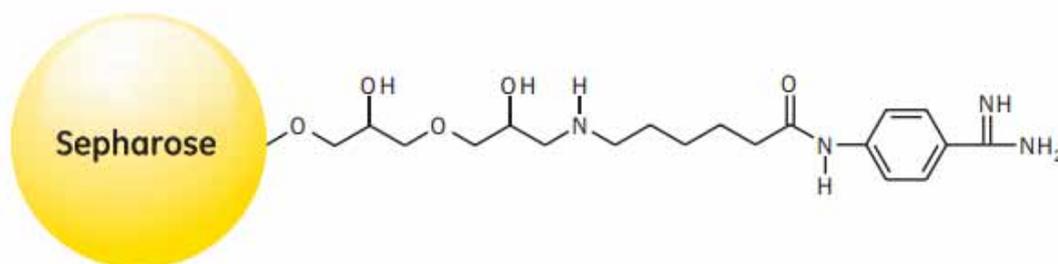


Рис.13 Частичная структура бензамидин сефарозы
(<http://www.gelifesciences.com>)

Бензамидин сефароза часто используется для удаления протеаз из клеточного супернатанта, бактериальных лизатов и сыворотки. При получении рекомбинантных белков с тегом, например GST, после включается сайт для специфичной протеазы, например тромбина, это позволяет при необходимости избавиться от тега. Очистку от примесей тромбина можно провести на бензамидин сефарозе.

ДНК-связывающие белки

ДНК-связывающие белки образуют чрезвычайно разнообразный класс белков объединенных по их способности связывать ДНК. Они включают в себя белки ответственные за репликацию и ориентацию ДНК, такие как гистоны, рестриктазы, транскрипционные активаторы, ДНК- и РНК-полимеразы. Они могут быть слиты с целевым белком. В качестве лиганда часто используется гепарин. Гепарин является сильно сульфатированным

гликозамином, способным связывать широкий диапазон биомолекул, в том числе:

- ДНК-связывающие белки, такие как факторы инициации, факторы элонгации, рестриктазы, ДНК-лигазы, ДНК- и РНК-полимеразы;
- Ингибиторы сериновых протеаз, такие как антитромбин III; протеолитические нексины;
- Факторы роста, такие как фактор роста фибробластов, фактор роста Шванна, эндотелиальный фактор роста;
- Белки внеклеточного матрикса, такие как фибронектин, витронектин, ламинин, тромбоспондин, коллаген.
- Рецепторы гормонов, такие как рецепторы эстрогена и андрогенных гормонов;
- Липопротеины;

Гепарин имеет два режима взаимодействия с белками и, в обоих случаях взаимодействие может быть ослаблено ростом ионной силы:

1. В этом случае взаимодействие с ДНК-связывающими белками имитирует полианионные структуры нуклеиновых кислот.
2. В этом случае взаимодействует с коагулянтами, такими как антитромбин III, гепарин действует как аффинный лиганд.

Выбор сорбента

Матрица является инертным носителем, с которым лиганд может быть ковалентно или не ковалентно связан. Ниже перечислены основные свойства хроматографических матриц:

- Чрезвычайно низкая неспецифическая адсорбция;
- Гидроксильные группы углеводных остатков идеально подходят для ковалентного связывания аффинных лигандов;
- Открытая пористая структура обеспечивающая высокую связывающую способность даже для больших биомолекул;

- Стабильность в диапазоне условий эксперимента, таких как высокий и низкий pH, детергенты и т.д.

Сефароза – агароза в форме шариков (Рис. 14), демонстрирует многие из этих свойств. Сефарозы изменяют и модифицируют в соответствии с конкретными требованиями разделения. В основном все виды агарозы отличаются диаметром частиц и количеством внутренних сшивок.

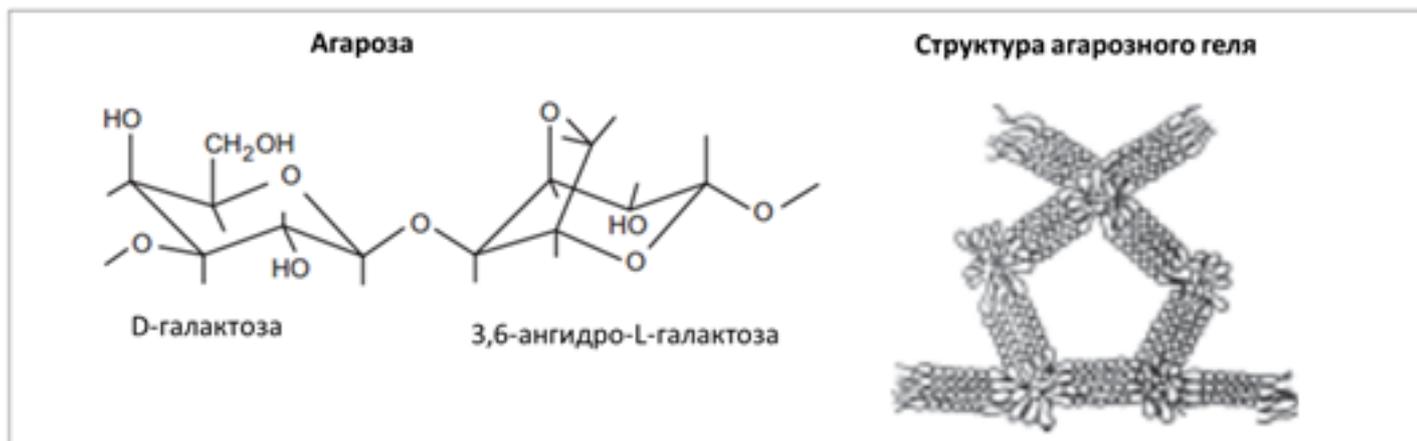


Рис.14 Структура агарозы (<http://www.gelifesciences.com>)

Выбор лиганда для аффинной хроматографии зависит от двух факторов: лиганд должен обладать обратимым сродством к целевому белку и должен содержать химические группы, через которые он может быть иммобилизован на матрице без нарушения связывающей активности.

Приготовление буфера

Используйте высокочистую воду и реактивы. Профильтруйте буфер через 0,45 или 0,22 мкм фильтр и убедитесь, что в нем не осталось пузырьков, которые могут существенно влиять на разрешение. Буферы для связывания, элюции и регенерации колонки являются специфичными для каждого сорбента и подбираются исходя из вида лиганда.

Подготовка образцов

Правильная подготовка образцов обеспечивает хорошее разрешение и продлевает срок службы колонки. Компоненты способные помешать аффинному связыванию должны быть удалены из образца. Объем образца не влияет на разделение до тех пор, пока условия связывания с белка с лигандом поддерживаются.

Подготовка колонки

Колонка должна быть уравновешена в буфере для связывания перед началом загрузкой образца. Высокая скорость потока может быть применена, если белок имеет сильное сродство к лиганду. Если сродство слабое, то скорость необходимо уменьшить. Оптимальная скорость потока для достижения эффективного связывания может варьировать в зависимости от конкретного взаимодействия и должна быть определена в случае необходимости.

Очистка и хранение колонок

Рекомендуемые условия для хранения описываются в инструкции к колонке.

Практическая работа №1

Разделение смеси белков на хроматографической системе

Bio-Rad BioLogic LP

Для практической работы используется хроматографическая система Bio-Rad BioLogic LP. Это простая и надежная хроматографическая система, оснащенная перистальтическим насосом, миксером для создания градиента и детекторами поглощения в УФ – диапазоне и проводимости раствора.

Студентам предлагается провести разделение смеси белков, содержащей лошадиный миоглобин, кональбумин, куриный овальбумин и соевый ингибитор трипсина, с помощью ионообменного картриджа Econo-Pac High Q объемом 1 мл или Macro-Prep High Q объемом 1 мл. (При необходимости

можно провести разделение другой тестовой смеси, содержащей какие-либо другие 4-5 белков.) После проведения хроматографического разделения фракции белков могут быть подвергнуты студентами электрофоретическому анализу.



Рис. 15 Хроматографическая система Bio-Rad BioLogic LP

Оборудование и реактивы.

Оборудование: Хроматографическая система Bio-Rad BioLogic LP.

Для проведения практической работы используется хроматографическая система Bio-Rad BioLogic LP. Система должна быть установлена и подготовлена в соответствии с инструкцией по применению. Система должна быть подключена к компьютеру для регистрации результатов с помощью программы BioLogic LP DataView, которая должна быть предварительно установлена на данном компьютере. Для подключения системы к компьютеру используется COM-порт компьютера и соответствующий кабель, поставляемый в комплекте с хроматографической системой. Обратите внимание, что программа BioLogic LP DataView предназначена только для регистрации хроматограммы и не позволяет управлять хроматографической системой. Все управление хроматографической системой Bio-Rad BioLogic LP осуществляется с ее контроллера.

При инсталляции системы в ней должен быть указан использующийся с ней коллектор фракций. Работа с коллектором фракций осуществляется в соответствии с инструкцией по применению используемого коллектора фракций (для данной работы рекомендуется использовать систему Bio-Rad BioLogic LP, оснащенную коллектором фракций Bio-Rad BioFrac или Bio-Rad Model 2110 Fraction Collector).

Петля для ввода образца, установленная на систему Bio-Rad BioLogic LP при инсталляции должна иметь объем 2 мл. Система Bio-Rad BioLogic LP оснащена перистальтическим насосом и является системой низкого давления. Для данной работы с ней используются хроматографические картриджи Bio-Rad BioLogic LP Econo-Pac High Q объемом 1 мл или Macro-Prep High Q объемом 1 мл производства компании Bio-Rad или аналогичные хроматографические картриджи/колонки с сильным анионообменным носителем. На рис.16 приведена схема соединений хроматографической системы Bio-Rad BioLogic LP и указаны ее компоненты.

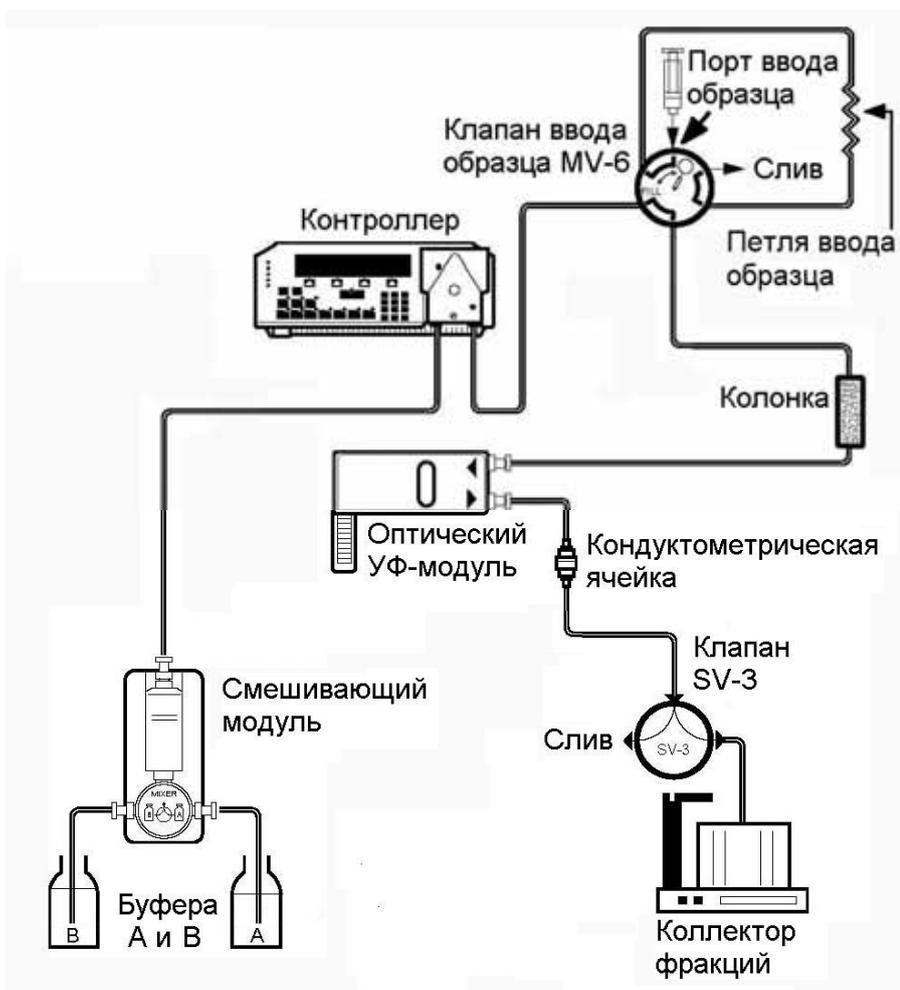


Рис. 16 Схема соединений хроматографической системы Bio-Rad BioLogic LP

Подготовка буферов.

Подготовьте следующие буферы:

1. Буфер А (буфер с низкой ионной силой) – 500 мл;
2. Буфер В (буфер с высокой ионной силой) – 25 мМ Трис-НСl, рН 8,1;
0,5 М NaCl - 500 мл;

После приготовления буферы желательно профильтровать с помощью системы фильтрации растворителей на фильтре с размером пор 0,45 мкм. Хранить в холодильнике. Перед употреблением дать нагреться до комнатной температуры, при которой будет проводиться эксперимент (если хроматографическая система стоит не в холодной комнате – то до комнатной температуры), чтобы избежать образования в системе пузырей воздуха.

Обратите внимание: традиционно в хроматографии буфер, с которого начинается метод (в котором производится «посадка» белка на колонку) обозначается как буфер А. Буфер, который используется для создания градиента, элюирующего белка с колонки, путем его смешивания в необходимых пропорциях с буфером А в специальном смешивающем модуле хроматографической системы обозначается как буфер В. При ионообменной хроматографии буфером А является буфер с низкой ионной силой (низкосолевой), а буфером В является буфер с высокой ионной силой (высокосолевой).

Подготовка смеси белков.

Возьмите навески по 10 мг лошадиного миоглобина, кональбумина, куриного овальбумина и соевого ингибитора трипсина и поместите их в одну коническую пластиковую пробирку с закручивающейся крышкой объемом 15 мл (тип «Фалькон»). Добавьте 10 мл деионизированной воды. Перемешайте до полного растворения белков, но не взбалтывайте (избегайте вспенивания). Смесь белков можно хранить перед употреблением в холодильнике в течение 1-2 дней, если необходимо более длительное хранение – разделить на аликвоты и поместить в морозильник на -20 °С. Размораживать непосредственно перед употреблением.

Подготовка хроматографической системы.

1. Заполните систему буферами А и В (перед установкой картриджа/колонки):

- Опустите трубки системы для ввода буферов А и В в сосуды с подготовленными буферами А и В. Обратите внимание, что в сосудах должно быть достаточное количество буферов, и трубки системы должны быть опущены в сосуды с буферами до самого дна, чтобы избежать случайного попадания воздуха в трубки во время работы.

- Заполните канал ввода буфера В: Нажмите кнопку режима **Manual**. Выберите меню функций насоса (**Pump**). Выберите буфер В. Запустите функцию **Purge** (промывка). Подождите 3 минуты. Остановите промывку (функция **Stop**).

- Заполните канал ввода буфера А и всю систему буфером А. Нажмите кнопку режима **Manual**. Выберите меню функций насоса (**Pump**). Выберите буфер А. Запустите функцию **Purge** (промывка). Подождите 5 минут. Остановите промывку (функция **Stop**).

Обратите внимание, что при заполнении системы буферами сначала заполняется канал буфера В а затем канал буфера А и вся следующая за ним система заполняется буфером А. (При этом канал буфера В до смешивающего модуля остается заполненным буфером В.). Это позволяет сформировать при проведении эксперимента правильный градиент.

2. Установите картридж/колонку в хроматографическую систему согласно инструкции.

Ход работы:

1. Запрограммируйте метод.

Обратите внимание: Программирование метода проводится на контроллере системы Bio-Rad BioLogic LP.

Программирование метода:

Нажмите кнопку **Program**, выберите **New Method**.

1. Выберите функцию программирования по времени (Time).
2. введите программу работы насоса:

- a. Нажмите **ADD**
- b. Выберите буфер “А” с помощью кнопок **Previous/Next**
- c. Введите продолжительность шага (Step length) 3 минуты, нажмите **OK**.
- d. Введите скорость потока (flow rate) 1,5 мл в минуту, нажмите **OK**.
- e. Вы ввели первый шаг метода (буфер А, продолжительность шага 3 минуты, скорость потока 1,5 мл в минуту). Введите оставшиеся шаги:

Шаг 2. Градиент (Gradient) от 0 до 50% буфера В, продолжительность шага 10 минут, скорость потока 1,5 мл в минуту.

Шаг 3. Буфер В, продолжительность шага 6 минут, скорость потока 1,5 мл в минуту.

Шаг 4. Буфер А, продолжительность – 6 минут, скорость потока 1,5 мл в минуту.

После ввода шага 4, нажмите **OK**.

2. Установите сигналы.

- a. Выберите функцию **Alarm**.
- b. Нажмите **ADD**.
- c. Введите время до сигнала – 3 минуты и проверьте, что Hold Method (приостановить метод) установлено на NO (метод не будет приостановлен) .
- d. Нажмите **OK** дважды.

Сигнал прозвучит через 3 минуты (после начала метода), чтобы напомнить Вам о необходимости перевести инъекционный клапан обратно в позицию загрузки. Если клапан не будет переведен в позицию загрузки, градиент пойдет сначала через петлю образца, вместо того, чтобы идти прямо в колонку, что приведет к некоторому «размыванию» градиента.

3. Введите программу для коллектора фракций.

- a. Выберите функцию **Frac Coll**.
- b. Выберите **ALL**.
- c. Введите размер фракции 2 минуты (если вы используете большие пробирки) (или 1 минута, если вы используете микропробирки «Эшпендорф 1,5 мл»).

- d. Нажмите ОК дважды, затем выберите DONE.
- e. Нажмите SAVE, назовите метод (например, «DEMO1») нажмите DONE.

4. Загрузите петлю раствором белка.

Для загрузки петли раствором белка используйте стандартный шприц с объемом 2,5- 5 мл.

- A) Поверните ручку инжекторного клапана MV-6 против часовой стрелки «до упора».
- B) Наберите 2,2 мл раствора белка в шприц. Удалите из шприца воздух.
- C) Присоедините шприц к верхнему порту инжекторного клапана MV-6 и заполните петлю образца раствором белка из шприца. Оставьте шприц присоединенным к порту клапана – это предотвратит вытекание образца из петли.

Внимание! При наполнении петли образца раствором белка она должна заполниться целиком. В петле образца не должно оставаться пузырьков воздуха. Объем образца при тестовой хроматографии должен немного превышать объем петли, чтобы полностью заполнить петлю. После того, как образец введен в петлю, шприц должен оставаться вставленным в верхний порт инжекционного клапана (чтобы образец не вытек из петли) и плунжер шприца должен оставаться неподвижным.

5. Финальная проверка хроматографической системы

- A) Нажмите кнопку режима **Manual**, потом кнопку **Start**, чтобы запустить насос. Убедитесь, что выбран буфер А. Скорость потока насоса должна быть установлена на 1,5 мл/мин. Проверьте все соединения на предмет утечек и воздуха в трубках. Прокачайте систему, если необходимо (например, если в трубках имеются пузырьки воздуха) (команда **Purge**).
- B) Нажмите кнопки прибора, чтобы проверить установки.
 - а) УФ-монитор (UV monitor): Диапазон (Range) 0,05 AUFS. Повторно обнулите показания УФ-монитора, если нужно. (Проводите обнуление показаний УФ-монитора только тогда, когда жидкость движется через ячейку.)
 - б) Проводимость (Conductivity): Минимум и максимум должны соответствовать значениям проводимости буферов А и В, соответственно. (Эти значения нужно определить заранее.)

в) Метод: Нажмите «Programm», потом «View Method» - проверьте программу градиента и сбора фракций.

С) **Запись показаний** - на подключенном через COM-порт компьютере запустите программу BioLogic LP DataView Software и запустите в данной программе режим записи (**Record**).

Д) **Коллектор фракций** – Убедитесь, что коллектор фракций подключен, что пробирки помещены в барабан коллектора фракций. Убедитесь, что формиратель капель коллектора фракция находится над пробиркой №1.

6. Промывка колонки

Перед запуском метода промойте колонку 10 объемами буфера А. Для этого нажмите кнопку режима **Manual**, потом кнопку **Start**, чтобы запустить насос. Убедитесь, что выбран буфер А. Скорость потока насоса должна быть установлена на 1,5 мл/мин. Прокачивайте систему с указанным потоком буфера А в течение 7 минут.

7. Запуск метода

А) Нажмите кнопку **Run** – система отсчитает 10 секунд и запустит метод.

В) Когда метод будет запущен, поверните ручку инжекторного клапана MV-6 по часовой стрелке «до упора». Это переведет клапан в положение «ввод». При этом поток растворителя идет через петлю ввода образца и образец из петли поступает на колонку. По истечении времени, запрограммированного на осуществление загрузки в созданном методе, зазвучит сигнал. Когда зазвучит сигнал, поверните ручку клапана против часовой стрелки до упора. Это переведет клапан в позицию «загрузки». При этом растворитель снова начнет поступать на колонку напрямую (минуя петлю образца). (Если клапан не будет переведен в позицию «загрузки», градиент пойдет сначала через петлю образца, вместо того, чтобы идти прямо в колонку, что приведет к некоторому «размыванию» градиента.)

Наблюдайте за записью показаний оптической плотности и проводимости в программе BioLogic LP DataView Software. Типичная хроматограмма будет выглядеть так:

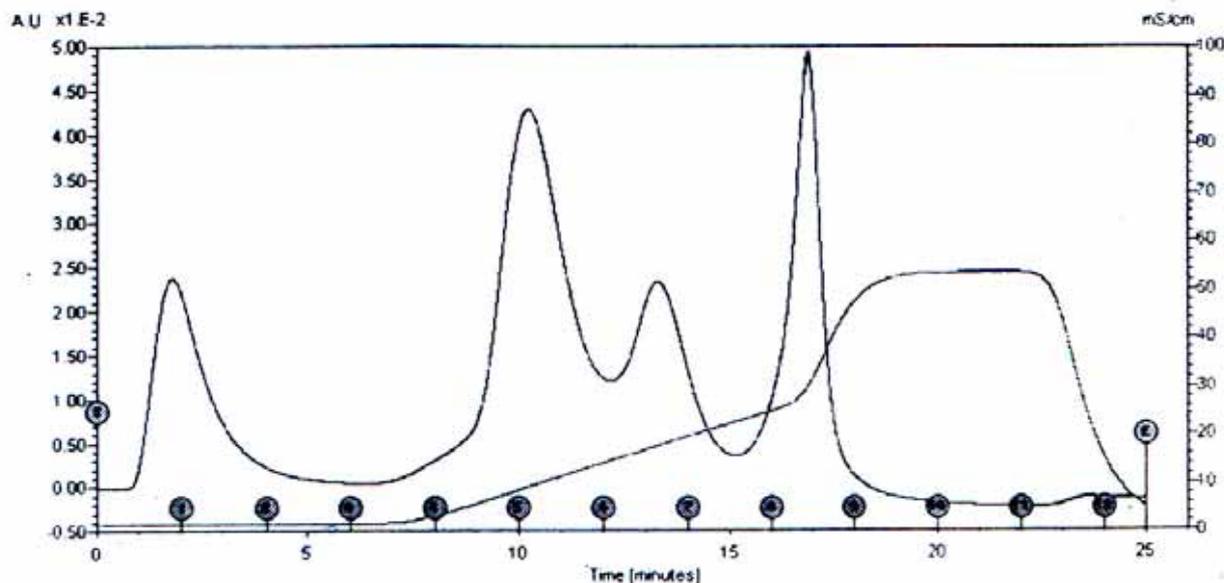


Рис 17 Типичная хроматограмма разделения тестовой смеси белков

8. Анализ хроматографического разделения

Лошадиный миоглобин не задерживается на колонке — он выходит в нулевом объеме (первый пик). Оставшиеся три белка связываются с колонкой и последовательно элюируются при возрастании ионной силы. Сохраните полученную хроматограмму в программе LP DataView. С помощью сохраненной хроматограммы приблизительно определите, при каких значениях проводимости элюировались белки разделяемой смеси. Установите соответствие фракций и хроматографических пиков (с помощью анализа хроматограммы). Проведите SDS-PAAG электрофорез полученных фракций белка. Обратите внимание, что электрофорезу желательно подвергнуть все разделенные фракции, так как возможно некоторое смещение фракций относительно хроматограммы. По молекулярной массе белков определите соответствие пиков конкретным белкам. Сделайте предположения о соотношении суммарных зарядов разделенных белков при тех условиях, в которых проводилось разделение.

Практическая работа №2

Очистка ксиланазы гриба *Trichoderma reesei* M18

Цель работы: создание протокола очистки ксиланазы гриба *Trichoderma reesei* M18

Подготовка образца.

1.1. Концентрирование образца.

Перед разделением проведите высаливание белков культуральной жидкости для концентрирования образца. Для этого культуральную жидкость отцентрифугируйте при 4000 об/мин в течении 20 минут. Далее супернатант аккуратно перелейте из центрифужных стаканчиков в чистые фальконы. Осаждение белков проводится высаливанием в 65% растворе сульфата аммония. Необходимая концентрация раствора для высаливания достигается путём добавления в отобранный супернатант насыщенного раствора сульфата аммония в необходимом количестве (65 мл раствора соли и 35 мл культуральной жидкости (супернатанта) = 65% раствор).

Для приготовления насыщенного раствора сульфата аммония возьмите стакан дистиллированной воды, подогрейте на плитке и постепенно добавляйте соль сульфата аммония до тех пор, пока она не перестанет растворяться. Как только соль перестанет растворяться, раствор снимите с плитки и пока он не остыл, профильтруйте через стеклянную воронку с фильтровальной бумагой. По мере остывания вы будете наблюдать выпадение кристаллов, что говорит о получении насыщенного раствора сульфата аммония. Смешайте культуральную жидкость с раствором сульфата аммония. Полученный раствор с осаждающимися белками поставьте в холодильник на 24 часа. Через 24 часа вы сможете наблюдать выпадение темного осадка на дне стакана.

1.2. Диализ высаленного белка.

Полученный раствор отцентрифугируйте при 10 тыс. об/мин. 20 мин. Осадок растворите в минимальном количестве 0,05 М ацетатного буфера (рН 5,0). Объём буфера не должен превышать объёма осадка более чем в 2 раза (Л. А. Остерман, 1985). При этом раствор перемешивайте аккуратно, чтобы не образовывались пузыри.

Диализные мешки предварительно отмочите в дистиллированной воде. Затем с одной стороны мешок скрепите диализной прищепкой, с другой стороны мешочек откройте и заполните растворенным осадком. После, также скрепите мешок прищепкой, проверьте при этом, чтобы раствор не вытекал. Поместите полученный мешочек в 0,05 М ацетатный буфер (рН 5,0).

Раствор оставьте на 48 часов в холодильник. Первые 24 часа меняйте буфер каждые 4-5 часов, остальные 24 часа буфер меняется 2 раза. Количество буфера зависит от объёма диализуемого раствора. Например, при диализе 3 мл растворенного осадка объём буфера составлял 250 - 300 мл. Отдиализованный материал аккуратно соберите в чистые пробирки типа Эппендорф.

Создание протокола измерения.

Концентрирование диализата и разделение белков проводится на трёх колонках High Q - сильный анионообменник, DEAE- слабый анионообменник и High S- сильный катионообменник для сравнения степени разделения белков между собой. Вариация сорбентов обуславливается тем, что, как известно из литературных данных, ксиланазная активность *Trichoderma reesei*, обусловлена наличием 4 типов ксиланаз. Все они имеют разную изоэлектрическую точку и разный рН – оптимум действия.

1.3. Хроматография на колонке High Q – сильном анионообменнике. Используется следующий протокол (параметры задаются вышеописанным методом):

- Промывка буфером А (0,01 М ацетатный буфер, рН 5,0) со скоростью 1,5 мл/мин в течение 15 мин.
- Ввод образца (концентрированные белки в 0,01 М ацетатном буфере, рН 5,0) на 7 минуте промывки.
- Промывка буфером Б с заданным градиентом соли (1М КСl) от 0 до 50 % со скоростью 1,5 мл/мин в течение 30 мин.
- Промывка чистым буфером Б со скоростью 1,5 мл/мин в течение 15 мин.

Во время хроматографии собирайте фракции, по 1,5 мл каждая.

В каждой фракции измерьте активность ксиланазы.

1.4. Хроматография на колонке DEAE – слабом анионообменнике:

- Промывка буфером А (0,01 М ацетатный буфер, рН 5,0) со скоростью 1,5 мл/мин в течение 15 мин.
- Ввод образца (концентрированные белки в 0,01 М ацетатном буфере, рН 5,0) на 7 минуте промывки.
- Промывка буфером Б с заданным градиентом соли (1 М КСl) от 0 до 100 % со скоростью 1,5 мл/мин в течение 40 мин.
- Промывка чистым буфером Б со скоростью 1,5 мл/мин в течение 10 мин.

Во время хроматографии собирайте фракции, по 1,5 мл каждая.

В каждой фракции измерьте активность ксиланазы.

1.5. Хроматография на колонке High S – сильном катионообменнике:

- Промывка буфером А (0,01 М ацетатный буфер, рН 5,0) со скоростью 1,5 мл/мин в течение 25 мин.
- Ввод образца (концентрированные белки в 0,01 М ацетатном буфере, рН 5,0) на 15 минуте промывки.
- Промывка буфером Б с заданным градиентом соли (2 М КСl) от 0 до 50 % со скоростью 1,5 мл/мин в течение 40 мин.
- Промывка чистым буфером Б со скоростью 1,5 мл/мин в течение 15 мин.
- Промывка чистым буфером А со скоростью 1,5 мл/мин в течение 15 мин.

Во время хроматографии собирайте фракции, по 1,5 мл каждая.

В каждой фракции измерьте активность ксиланазы.

2. Измерение ксиланазной активности.

- 2.1. После каждой хроматографии и на всех этапах очистки белка проводите измерение ксиланазной активности и ПААГ -

электрофорез полученных образцов для проверки степени их очистки и наличия фермента.

3. Подведение итогов. По полученным данным проведите анализ и сравнение полученных хроматограмм и графиков распределения активности фермента – ксиланазы по фракциям, на основании чего сделайте вывод о наиболее подходящем сорбенте для хроматографической очистки данного белка.

Определение ксиланазной активности

Исследование проводите в трех повторностях. Разбавленный образец в количестве 0,06 мл поместите в пробирку. Пробирку поместите на 5 минут в 50 °С на водяную баню. Добавьте 0,6 мл субстрата и перемешайте. Через 20 минут прервите инкубацию добавлением 0,3 мл раствора динитросалициловой кислоты (DNSA).

Субстрат для исследования активности ксиланаз приготовьте следующим образом, 750 мг ксилана (Sigma X0502) растворите в 40 мл 0,05 М ацетатного буфера на кипящей водяной бане. После охлаждения до комнатной температуры рН раствора доведите 25% HCl до 5,0. Объем раствора доведите до 50 мл 0,05 М ацетатного буфера.

Для построения калибровочного графика стандарты глюкозы и ксилозы поместите в 0,06 мл ацетатного буфера в пробирку. К образцам сразу, без инкубации, добавьте DNSA.

Полученные растворы инкубируйте в кипящей водяной бане точно 10 минут, затем охладите в ледяной бане 5 минут, добавьте 3 мл воды и перемешайте. Абсорбцию измерьте при 540 нм, используя двухлучевой спектрофотометр Shimadzu UV 1800. Одна единица активности энзима (IU) соответствует количеству фермента, вызывающего выход одного мкМ восстанавливающих сахаров в минуту при гидролизе соответствующего субстрата. Выход восстанавливающих сахаров определите по калибровочным графикам, построенным по глюкозе и ксилозе, соответственно. Для расчета применяют следующую формулу:

$$IU = (PB1 - PB0) \times D / 20 \times N,$$

где IU- активность фермента в международных единицах;

PB1 и PB0 - редуцирующие вещества после и до ферментализации, соответственно;

D - разбавление фермента перед внесением в реакционную смесь;

N- дозировка препарата, мл;

20 - время ферментализации, мин.

Удельную активность рассчитайте как отношение ксиланазной активности к общей концентрации белка в смеси.

Общую активность фермента рассчитайте по формуле:

$$IU_{\text{общ}} = IU \times V,$$

где $IU_{\text{общ}}$ – общая активность; V – объём раствора.

Литература

1. Алимова, Ф.К. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф. К. Алимова, Д. И. Тазетдинова, Р. И. Тухбатова. – Казань, 2007. – 229 с. – ББК 30.16.
2. Остреман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остреман – Москва, 1985 – УДК 543.545.4: 547.96.
3. Шаповалова, Е.Н. Хроматографические методы анализа: Методическое пособие для специального курса / Е.Н Шаповалова, А.В.Пирогов. – МГУ, 2007. – 203с.
4. Andrew J.S. Jones. Analysis of polypeptides and proteins / Andrew J.S. Jones // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1993. - №10. – p. 29-90.
5. Giorgio Carta. Protein Chromatography: Process Development and Scale Up / Giorgio Carta, Alois Jungbauer. - Wiley VCH. 2010. – 346p.
6. G.Sofer. Handbook of Process Chromatography / G.Sofer, L.Hagel // Academic Press. 1997.
7. General Electric Company. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods. 2007.
8. General Electric Company. Purifying Challenging Proteins Principles and Methods. 2007.
9. General Electric Company. Gel filtration Principles and Methods. 2007.
10. General Electric Company. Affinity Chromatography Principles and Methods. 2007.
11. General Electric Company. Protein Purification. 1994
12. J-C. Janson. Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications / J-C. Janson, L. Rydén// Wiley VCH 2nd ed., 1998.
13. R.K. Scopes. Protein Purification, Principles and Practice / R.K. Scopes // *Advanced Texts in Chemistry Ed.* Springer Verlag New York Inc. 1994.
14. Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Scientific Pierce Protein Purification Technical Handbook. 2008.

Оглавление

Введение	1
1. Основные положения хроматографии	2
2. Принципы и стандартные условия проведения хроматографической очистки белков	7
2.1 Ионообменная хроматография	5
2.2 Хроматография гидрофобных взаимодействий	12
2.3 Гель-фильтрация	18
2.4 Аффинная хроматография	23
Практическая работа №1 «Разделение смеси белков на хроматографической системе Bio-Rad BioLogic LP»	29
Практическая работа №2 «Очистка ксиланазы гриба <i>Trichoderma reesei</i> M18»	38
Литература	47

Напечатано с готового оригинал-макета

Ответственный за выпуск ***А.Г. Залялова***
Техническое обеспечение ***Д.З. Ахметова***

Подписано в печать 28.01.2013. Формат 60x84 1/16.
Усл. печ. л. 3. Договор №7 от 28.01.2013. Тираж 300.