

МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра биохимии

Самарскому государственному университету 30 лет

ХИМИЯ БЕЛКА

Спецпрактикум

Издательство “Самарский университет”
1999

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Самарского государственного университета*

Предлагаемый практикум предназначен для студентов, специализирующихся по биохимии. Он содержит описание различных методов исследования белков, краткое теоретическое введение, некоторый справочный материал и список литературы.

Составитель канд. биол. наук, доц. О.Н.Макурина
Отв. редактор канд. биол. наук, доц. Ю.П.Фролов

ВВЕДЕНИЕ

Белки, или протеины, - важнейший класс биологически активных веществ. Они играют ключевую роль в клетке, присутствуют в виде главных компонентов в любых формах живой материи, будь то микроорганизмы, животные или растения. Без белков невозможно представить себе жизнедеятельность, жизнь. Белки чрезвычайно разнообразны по структуре и выполняют многочисленные биологические функции.

В настоящее время трудно оценить общее число белков во всем царстве живой природы, но, учитывая огромное разнообразие организмов, следует признать факт существования по крайней мере многих миллиардов химически индивидуальных белков. Лишь в клетке *Escherichia coli* содержится более 3000 различных белков.

Молекулярная масса белков варьирует от 5000-10000 до 1 млн. и более. Сравнительно небольшие молекулы белковой природы (с молекулярной массой условно до 50000) называются пептидами. К пептидам относятся многие природные вещества с важными биологическими функциями, а также продукты расщепления белков.

Белки - высокомолекулярные природные полимеры, построенные из остатков аминокислот, соединенных амидной (пептидной) связью (-CO-NH-). Каждый белок характеризуется специфичной аминокислотной последовательностью. Белковая молекула может состоять из одной или нескольких полипептидных цепей, содержащих от 2-3 десятков до нескольких сотен аминокислотных остатков каждая. Практически все белки построены из 20 α -аминокислот.

По предложению К.У.Линдерстрема-Ланга, различают четыре уровня организации белковых молекул - *первичную, вторичную, третичную и четвертичную* структуры. Хотя эти категории в известной степени устарели, ими пока продолжают пользоваться [4]. Последовательность аминокислотных остатков, их качественный и количественный состав в полипептидной цепи называется *первичной* структурой. Термин "*вторичная структура*" подразумевает упорядоченное пространственное расположение отдельных участков полипептидной цепи без учета типа и конформации боковых радикалов аминокислот, т.е.

относится к типу укладки полипептидных цепей. Наиболее часто встречающиеся типы - *правая α -спираль*, *β -структура* и *β -изгиб*. Все эти типы вторичной структуры образуются за счет замыкания водородных связей между пептидными группами. Часть полипептидной цепи не имеет упорядоченного строения, такие участки называются *аморфными* или *бесструктурными* областями. α -Спиральные и β -структурные участки в белках могут взаимодействовать друг с другом и между собой, образуя ансамбли. Пространственное строение таких ансамблей вторичной структуры называют *сверхвторичной структурой* белковой молекулы. Встречающиеся в нативных белках сверхвторичные структуры - энергетически наиболее предпочтительны[5]. *Третичная* структура белка характеризует пространственное расположение упорядоченных и аморфных участков в полипептидной цепи в целом, которое достигается за счет взаимодействия боковых радикалов и зависит от их типа и конформации. Таким образом, третичная структура описывает пространственную укладку всей молекулы белка, если она образована одной полипептидной цепью. В поддержании третичной структуры глобулярных белков, ее закреплении принимают участие различные типы связей: ковалентные ($-S-S$ -связи), ионные, или солевые, водородные и гидрофобные. Термин "*четвертичная структура*" относится к белкам, в состав которых входит несколько полипептидных цепей (*субъединиц или протомеров*), не связанных между собой ковалентно. Такая структура отражает характер взаимного расположения этих субъединиц в пространстве. Белки, имеющие четвертичную структуру, называются *олигомерными*.

Изучение белков имеет богатую, славную традицию. Несмотря на уже достигнутые значительные результаты, закономерности организации этих биологических макромолекул остаются еще до конца не познанными. К числу одной из основных проблем исследования белков относится выяснение закономерностей формирования пространственной структуры, конформации полипептидных цепей. Благодаря способности приобретать различные конформации, белкам оказываются присущи различные функции.

Функция белка всегда индивидуальна, однако могут быть выделены некоторые общие принципы молекулярных механизмов действия белков, поскольку в них заложены такие фундаментальные этапы, как узнавание того или иного партнера; формирование единой структуры комплекса, в которой так или иначе проступают черты взаимодействующих молекул, действие высокоорганизованных ансамблей функциональных групп, организация микроокружения, глубоко влияющего на природу протекающих химических превращений, передача эффектов внутри молекулы или надмолекулярного комплекса и т.д.

В настоящее время в области химии и биохимии белка появились новые направления исследований, связанные с возможностями

реконструкции белков, исследованиями первичной структуры белков, изучением вновь выделенных из различных живых организмов полипептидов, разработкой новых и усовершенствованием имеющихся методов выделения и очистки белков и пептидов и т.д. [8].

Выделение и очистка белков во многом представляют собой самостоятельную область белковой химии. Достигнутые здесь успехи в значительной мере предопределили тот огромный прогресс в наших знаниях о химии живого, который наблюдается в последнее десятилетие. Чтобы овладеть этой наукой, мало знать теоретические основы используемых методов - необходимо также научиться искусно обращаться с белками.

В клетках присутствуют белки очень близкие по своим физико-химическим характеристикам. Поэтому для получения белка в чистом виде приходится использовать не один, а сочетание нескольких методов. Нужно учитывать также, что белки чрезвычайно лабильны, поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать некоторые предосторожности: работы вести при пониженных температурах, постоянно контролировать pH, очищать химические реактивы.

Среди лабораторных методов очистки, фракционирования и анализа структуры белков совокупность хроматографических методов занимает центральное место. Ни один другой метод не может сравниться с хроматографией по широте количественного диапазона. Вне конкуренции остается и разнообразие физико-химических параметров, по которым может осуществляться хроматографическое фракционирование: молекулярные размеры, вторичная или третичная структура биополимеров, растворимость, адсорбционные характеристики молекул, степень их гидрофобности, электрический заряд, биологическое сродство к другим молекулам и др.

Аналитический контроль за процессом разделения высокомолекулярных пептидов осуществляется с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофорез проводится в присутствии додецилсульфата натрия, который образует мицеллы с разделяемым веществом, нивелируя его электрический заряд, в результате чего разделение происходит исключительно по молекулярной массе. Метод имеет большую чувствительность и высокую разрешающую способность. Если электрофорез проводить без добавления додецилсульфата натрия, то белки или пептиды можно разделить по заряду. Электрофорез используют и для непосредственного разделения небольших количеств пептидов.

Методы выделения и исследования белков выбираются в зависимости от их специфических свойств. Эти методы, как правило, без соответствующей модификации не могут быть использованы для выделения и анализа других белков. Однако существует ряд достаточно универсальных методов, применение которых возможно для разнооб-

разных белков. Чтобы выделить белок и произвести исследование его свойств и функций, обычно используют последовательные этапы, основными из которых являются: разрушение тканей и клеток, содержащих белки; экстракция белков; фракционирование белков; количественное определение; гель-хроматография; электрофорез и др.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1. РАЗРУШЕНИЕ КЛЕТОК, ТКАНЕЙ, ОРГАНОВ, СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКИ

Методов разрушения много, важно выбрать наилучший, так как от этого зависит полнота выхода белка. Выбор метода во многом определяется разнообразием объектов исследования.

Животные ткани широко варьируют по своей прочности: наряду с легко разрушаемыми эритроцитами используется и жесткий коллагеносодержащий материал, встречающийся в кровеносных сосудах и других тканях, содержащих гладкие мышцы. Растительные клетки обычно труднее разрушаются, чем животные, из-за наличия у них целлюлозной оболочки. Среди бактерий есть и довольно хрупкие организмы, и более устойчивые, с толстой клеточной стенкой.

Животные ткани обычно разрушают механически, путем измельчения с помощью ножниц, а затем для более тонкого измельчения используют гомогенизаторы определенных типов. Так же или в ступках с кварцевым песком измельчают зеленые ткани растений. Семена и сухие ткани растений измельчают с помощью мельниц. Бактериальные клетки более устойчивы к механическому воздействию. Поэтому наиболее эффективным в этом случае является метод механической дезинтеграции клеток с помощью стеклобус ("баллотини") в дезинтеграторах различной конструкции. Для особо прочных клеток рекомендуется обработка их ультразвуком. В отдельных случаях довольно эффективным является метод, основанный на чередовании быстрого замораживания и оттаивания клеток. Для разрушения некоторых видов клеток используют сочетание методов, в том числе и обработку клеток лизирующими ферментами.

1.2. ЭКСТРАКЦИЯ БЕЛКОВ

Одной из важных особенностей этого этапа является быстрое использование сырья (исходного материала) для исследований. Обычно чем быстрее используется ткань, тем лучше, т.е. препарат получается более соответствующим нормальному физиологическому состоянию, так как, если ткань некоторое время была "мертва", начинаются естественные процессы разложения. Однако бывают случаи, когда абсолютная свежесть может быть помехой. Возможность получить свежий материал не всегда совпадает с возможностью использовать его. Как полученный материал, так и экстракт из него следует хранить замороженными [6].

Важной задачей настоящего этапа является выбор соответствующего растворителя. Обычно при решении этой задачи исходят из физико-химических свойств белка, который предстоит выделить. При

правильном выборе экстрагента уже на данном этапе можно осуществить частичное фракционирование. Для экстракции белков используются: дистиллированная вода (для экстракции водорастворимых белков), буферные системы с определенным значением рН, часто слабо солевые растворы, в которых подавляющая часть белков хорошо растворима (для экстракции периферических белков), для солубилизации интегральных белков используют детергенты различной концентрации и химической природы (додecilсульфат натрия, тритон, дезоксихолат натрия, ТВИН и др.). Иногда для экстракции используют спирто-солевые смеси, глицерин, бутиловый или этиловый спирт.

Практически экстракцию осуществляют путем длительного настаивания гомогената в соответствующем растворителе с периодическим или постоянным перемешиванием или встряхиванием. Часто экстракцию белков ведут одновременно с измельчением материала. По окончании экстракции суспензию центрифугируют, а надосадочную жидкость (экстракт или супернатант) используют для дальнейшей работы. Последовательные обработки суспензии соответствующими реагентами, чередующиеся с центрифугированием, позволяют из одной ткани получить различные пулы белков, начиная от водорастворимых и заканчивая интегральными белками. Каждый экстракт представляет собой очень сложный по составу раствор. Он содержит большое количество различных белков и ряд низкомолекулярных компонентов (соли, углеводы, аминокислоты и др.), хорошо растворимых в избранном растворителе.

Очень часто уже на этом этапе необходимо освободить смесь высокомолекулярных веществ от низкомолекулярных примесей. Для этого пользуются методом диализа - метода, в основе которого лежит использование полупроницаемых мембран, сквозь поры которых не проходят белковые и свободно диффундируют прочие молекулы.

1.3. ХАРАКТЕРНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ, НА КОТОРЫХ ОСНОВАНО ИХ РАЗДЕЛЕНИЕ

Существующие способы разделения белков основаны на их физико-химических особенностях. Во-первых, это *размер молекулы, ее геометрия*. На использовании этой особенности базируются методы гель-хроматографии и ультрафильтрации, а отчасти и электрофорез в гелях.

Во-вторых, характерное для данного белка *распределение заряженных групп на его поверхности*. Соотношение катионных и анионных групп в белке меняется в зависимости от рН, изоэлектрические точки белков - pI (значения рН, при котором положительные и отрицательные заряды белка полностью компенсированы и суммарный заряд равен нулю) существенно различаются у разных белков. Известны бел-

ки, являющиеся в физиологических условиях катионными, анионными или молекулами без заметного преобладания того или иного заряда. На различии заряда белков при разных рН основано их разделение методами электрофореза, изоэлектрического фокусирования, изоэлектрической и ионообменной хроматографии. Существенно, однако, не только соотношение заряженных групп, определяющее значение рI. Белки со сходными изоэлектрическими точками могут различаться распределением заряженных функциональных групп по поверхности глобулы. Последние размещаются более или менее равномерно либо, наоборот, образуют локальные сгущения, гроздя одинаково заряженных групп, что сказывается при ионообменной хроматографии белка.

В-третьих, белки различаются *числом и характером гидрофобных участков поверхности*, что используется при гидрофобной хроматографии.

Следует отметить, что ни один из рассмотренных выше признаков не может сам по себе обеспечить выделение индивидуального белка из сложной смеси - они недостаточно характерны, не гарантируют избирательности очистки. Значительно более перспективно в этом отношении *использование для выделения функциональных свойств белка*.

Схемы выделения белков, использующие только один какой-либо принцип, редки, обычно различные подходы к фракционированию сочетаются и дополняют друг друга.

1.4. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

В распоряжении биохимика имеется большое количество методов фракционирования, каждый из которых основан на том или ином свойстве белков. Как правило, первоначально проводят грубое фракционирование, в процессе которого освобождаются от целых групп "балластных" белков. Чаще всего "балластные" белки осаждают, сохраняя нужный белок в растворенном состоянии, иногда осаждают выделяемый белок, а "балластные" после центрифугирования отбрасывают.

Одним из используемых для фракционирования методов является метод изоэлектрического осаждения. Основан он на различиях в зарядах и изоэлектрических точках (ИЭТ) белков. В этом случае к экстракту небольшими порциями добавляют кислоту, чтобы сместить рН среды либо до значений, близких к ИЭТ выделяемого белка (тогда последний можно получить в осадке), либо (чаще) до рН, близком к ИЭТ "балластных" белков (в этом случае после центрифугирования удалится значительная часть "балластных" белков, а интересующий нас белок остается в растворе). Кислотную обработку проводят осторожно, не допуская резкого изменения рН среды.

В случае выделения термостабильного белка можно применять в качестве предварительной ступени очистки термическую обработку экстракта (фракционная денатурация нагреванием). Так как температура разрушения для каждого белка различна и достаточно четко ограничена, при нагревании экстракта в течение определенного времени до температуры немного ниже той, при которой исследуемый белок разрушается, можно вызвать коагуляцию большого количества “балластных” белков. В процессе термической обработки экстракт необходимо нагревать равномерно, не допуская резких перепадов температуры, четко контролируя время действия избранной температуры.

Для осаждения белков в ряде случаев применяют органические растворители. Метод осаждения белков смешивающимися с водой органическими растворителями применяется с тех самых пор, как начали заниматься очисткой белков. Особенно важную роль он играет при выделении белков в промышленных масштабах, в частности, при фракционировании белков плазмы. Добавление к водному экстракту, содержащему белки, таких растворителей, как этанол или ацетон, вызывает различные эффекты, которые вместе приводят к осаждению белка. Основным эффектом заключается в снижении активности воды. По мере возрастания концентрации органических растворителей снижается способность воды к сольватации заряженных молекул белка. Лишенные гидратной оболочки белки агрегируют и выпадают в осадок. Причем различные белки выпадают в осадок при разном насыщении органического растворителя. Основная причина агрегации белков заключается, вероятно, в электростатических и вандерваальсовых силах, сходных с силами, действующими при высаливании белков в отсутствии органического растворителя. Было установлено, что вблизи изоэлектрической точки белков осаждение происходит при более низкой концентрации органического растворителя. Это подтверждает предположение о том, что агрегация, происходящая в данном случае, сходна с агрегацией, наблюдающейся при изоэлектрическом осаждении белков. Другим параметром, влияющим на осаждение белка под действием органического растворителя, является размер молекулы. При прочих равных условиях чем больше молекула, тем ниже концентрация органического растворителя, вызывающая осаждение белка. Так как используемые чаще всего органические растворители (ацетон, этанол) обладают денатурирующим действием на многие белки, важными условиями их применения являются: во-первых, работа при очень низких температурах с использованием предварительно охлажденных растворов; во-вторых, строгое ограничение продолжительности воздействия.

1.4.1. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ

Наиболее широко используемый метод фракционирования белков - метод высаливания - осаждение белков с помощью нейтральных солей. На ранних этапах становления белковой химии единственным применяемым на практике способом разделения белков различных типов было осаждение части белковой смеси за счет изменения некоторых свойств растворителя. Далее осадки отфильтровывали и растворяли в исходном растворителе. Белковые осадки представляют собой достаточно крупные агрегаты белковых молекул, так что их можно отцентрифугировать при относительно низкой центробежной силе. В некоторых случаях агрегация идет дальше и осадок флоккулирует, тем не менее размеры агрегатов обычно остаются небольшими вследствие движений и столкновений частиц суспензии.

Первоначально белки классифицировали в зависимости от их растворимости, и, хотя сейчас эта классификация в основном уже забыта, соответствующие названия до сих пор используют, когда речь идет о сывороточном альбумине или иммуноглобулинах. Глобулинами называли белки, нерастворимые при низких концентрациях соли в растворе. Сывороточные глобулины можно осадить, просто разводя сыворотку водой, при этом альбумины остаются в растворе.

Распределение гидрофильных и гидрофобных остатков на поверхности белковой молекулы является признаком, определяющим растворимость белка в различных растворителях. Хотя гидрофобные группы стремятся сконцентрироваться внутри белковой молекулы, значительная их часть располагается на поверхности и контактирует с растворителем. Гидрофобным группам на поверхности молекул наряду с заряженными и другими полярными группами принадлежит важная роль в определении поведения белков. Основным компонентом растворителей всегда является вода, хотя есть основания предполагать, что, например, интегральные мембранные белки можно было бы выделять, используя неводные растворители. Для изменения растворимости белка можно манипулировать свойствами воды как растворителя, изменяя ионную силу, рН, количество добавляемых, смешивающихся с водой, органических растворителей и других инертных веществ или полимеров, а также комбинируя эти изменения с изменениями температуры. Чаще всего для селективного осаждения белков используют нейтральные соли.

Наиболее часто применяемой солью является сульфат аммония. Во-первых, потому, что он не оказывает денатурирующего действия на большинство даже самых лабильных белков; во-вторых, он характеризуется высокой степенью растворимости, практически не зависящей от температуры. Последнее имеет очень большое значение, так как фракционирование большинства белков осуществляется при понижен-

ных температурах. Для высаливания используют сульфат аммония высокого качества, предварительно перекристаллизованный. Используют также насыщенный раствор сульфата аммония, особенно на последних стадиях очистки. Это имеет то преимущество, что насыщенный раствор можно предварительно довести до нужного значения рН и тогда в процессе его добавления не нужно будет корректировать рН, как это приходится делать при работе с сухим сульфатом аммония. Насыщенный раствор готовят из перекристаллизованного сернокислового аммония. Если высаливание осуществляют с помощью кристаллической соли, то она предварительно тонко измельчается. Затем ее добавляют к экстракту небольшими порциями, каждый раз тщательно перемешивая до полного растворения. Важно не допустить местного перенасыщения раствора, так как это может привести к загрязнению выделяемой фракции.

Фракционное осаждение не обеспечивает достаточно полного разделения, необходимого в большинстве случаев, и поэтому приходится прибегать к другим методам очистки, в которых используются более тонкие различия - различия в суммарном заряде белков (наиболее распространенные методы - ионообменная хроматография и электрофорез), в молекулярном весе и размерах (центрифугирование и гель-фильтрация).

1.4.2. ПЕРЕКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ СУЛЬФАТА АММОНИЯ

При работе с белками используют сульфат аммония хорошего качества, лучше категории "хч" или "ч". Даже чистые препараты сульфата аммония содержат ионы тяжелых металлов, а также небольшое количество свободной кислоты. Поэтому перекристаллизацию сульфата аммония проводят, во-первых, в присутствии комплексообразователей (например ЭДТА), особенно если выделяемый белок характеризуется повышенной чувствительностью к ионам тяжелых металлов (например ферменты) и, во-вторых, с добавлением в конце перекристаллизации некоторого количества аммиака, чтобы в последующем несколько уменьшить закисление среды при растворении соли.

При перекристаллизации необходимо установить по таблице растворимость сульфата аммония, отвесить соответствующее количество соли и при медленном нагревании растворить в минимальном объеме воды, добавив 2 г ЭДТА и 10 мл аммиака на каждый литр растворителя. Полученный насыщенный раствор тотчас же профильтровать через воронку Бюхнера. Фильтрат помещают в холодильник на 10-12 часов для формирования кристаллов (+4°C).

Выпавшие кристаллы отделяют от маточного раствора путем повторного фильтрования под вакуумом, промывают небольшим количеством охлажденного растворителя и сушат на воздухе. Оставшийся маточный раствор содержит еще большое количество основного

вещества. Поэтому его упаривают приблизительно до половины, фильтруют под вакуумом и т.д., как делали в первый раз. Эти кристаллы значительно уступают по чистоте полученным в первый раз, поэтому их следует хранить отдельно.

1.5. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

Для этого метода было предложено несколько названий, в том числе и такие, как *гель-проникающая хроматография* и *молекулярно-ситовая хроматография*. Однако термин *гель-фильтрация* в настоящее время наиболее широко распространен и общепризнан. Вместе с тем следует отметить, что это название неудачно, так как используемый материал не обязательно должен представлять собой истинный гель, а происходящий процесс не является на самом деле фильтрацией. Основные принципы метода просты. Гель состоит из открытой поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) для удобства наполнения колонок [6].

Поры внутри гранул имеют такие размеры, что некоторые из них недоступны для крупных молекул, тогда как более мелкие молекулы могут проникать во все поры. Недоступность пор обусловлена тем, что они или слишком узки для молекул, или если даже достаточно широки, то не имеют каналов, выходящих на поверхность гранул.

В настоящее время принято считать оптимальными такие условия потока, при которых все доступные поры заполнены молекулами проходящего по колонке белка. Таким образом, здесь действуют равновесные, а не кинетические эффекты. Материалы различных типов имеют какую-то определенную долю пор, доступных для макромолекул данного размера с вероятностью от 0 до 100%. В настоящее время не представляется возможным изготовить материал с порами только одного размера, что позволило бы получить очень узкий диапазон фракционирования.

Неподвижная фаза при гель-фильтрации представлена жидкостью, находящейся внутри пористых, хорошо смачиваемых гранул, заполняющих хроматографическую колонку. Если на такую колонку подается растворенная в элюенте смесь молекул различных размеров, то крупные молекулы, неспособные проникнуть внутрь гранул, будут двигаться вдоль колонки вместе с подвижной фазой. Для них коэффициент распределения $K=0$. В то же время наиболее мелкие молекулы, размеры которых заведомо меньше диаметра пор в гранулах, будут равномерно распределяться между подвижной и неподвижной фазами. Для них будет осуществляться хроматографический процесс с присутствием ему замедлением миграции хроматографической зоны. Значение K при этом близко к единице. Для молекул промежуточной величины

благодаря статистическому распределению размеров пор окажется доступной только часть объема неподвижной фазы. Для них $0 < K < 1$, поэтому зона или зоны таких молекул будут мигрировать вдоль колонки быстрее, чем мелкие молекулы, но медленнее, чем крупные. В результате произойдет фракционирование исходной смеси молекул на зоны в зависимости от их размеров. Зоны выходят из колонки в порядке убывания этих размеров.

Смесь молекул различных размеров в ходе гель-фильтрации разделяется на ряд дискретных групп, различающихся между собой по степени доступности для них объема внутри гранул. Соответствующие хроматографические зоны мигрируют с различными скоростями и выходят из колонки в виде разделившихся “пиков”.

Для гель-фильтрации применяют различные материалы, например сефадекс (поперечно-сшитый декстран), который используется уже более 20 лет. Он будет использоваться и дальше, особенно при работе в промышленных масштабах, когда необходимо учитывать быстроту, стоимость и удобство выполнения операций. Поперечно-сшитые полиакриламидные гранулы (биогели) также находят широкое применение и имеют сходные с сефадексом интервалы фракционирования. Для очень больших молекул белков, вплоть до агрегатов, приближающихся по размерам к вирусам, наиболее предпочтительны агарозные гели. Основная проблема, связанная с использованием сефадекса и полиакриламида, заключается в мягкости их гранул. Даже очень слабое давление, в том числе осмотическое давление, возникающее в колонке во время хроматографического разделения, вызывает деформацию гранул, приводит к неравномерной упаковке материала и в конечном счете служит причиной плохих характеристик потока. Всех этих недостатков, в основном, лишены декстраны, содержащие дополнительные поперечные шивки, образованные акриламидом. Этот материал, называемый сефакрилом, дает более жесткие гранулы, с которыми можно оперировать при повышенном давлении и, следовательно, при более высокой скорости потока. Ультрагели представляют собой агарозные гели с вкрапленными в них цепями акриламидного полимера, что придает им большую жесткость и меньшую пористость по сравнению с чистой агарозой. Они пригодны для разделения большинства белков. Список имеющихся в продаже и часто используемых материалов для гель-фильтрации приведен в таблице 1.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Фирма и название геля	Код геля	Тип геля	Используемый интервал фракционирования
Bio-Rad Биогели	P-60	Полиакриламид	3000-60000
	P-100	»	5000-100000
	P-150	»	15000-150000
	P-200	»	30000-200000
	P-300	»	60000-400000
	A-0,5	Агароза	$1000-0,5 \cdot 10^6$
	A-1,5	»	$2000-1,5 \cdot 10^6$
A-5,0	»	$4000-5 \cdot 10^6$	
LKB Ультрагели	AcA22	Агароза/полиакриламид	$60000-1 \cdot 10^6$
	AcA34	»	20000-400000
	AcA44	»	12000-1300000
	AcA54	»	6000-70000
Pharmacia Сефадексы	G-50	Декстран	1500-30000
	G-75	»	3000-70000
	G-100	»	4000-150000
	G-150	»	5000-300000
	G-200	»	5000-600000
Pharmacia Сефарозы	6B	Агароза	$10000-4 \cdot 10^6$
	4B	»	$60000-20 \cdot 10^6$
	CL-6B	Поперечно-сшитая агароза	$10000-4 \cdot 10^6$
	CL-4B	»	$60000-20 \cdot 10^6$
Pharmacia Сефакрилы	S-200	Декстран/ бисакриламид	5000-300000
	S-300	»	10000-800000
	S-400	»	$20000-2 \cdot 10^6$
	S-500	»	Мультиферментные комплексы с мол. массой больше 10^6

Очень часто в гель-хроматографии используют сефадексы. Под этим торговым названием выпускается восемь типов матриц на основе декстрана - от наиболее мелкопористого сефадекса G-10 до самого крупнопористого G-200. Чем крупнее поры, тем больше воды связывается в гранулах при их набухании. Номер в маркировке сефадекса характеризует его пористость - он означает количество воды в милли-

литрах, которое связывают 10 г сухого геля (“water regain”). По размерам сферические гранулы сефадексов делятся в большинстве случаев на две категории: обычные (без дополнительных обозначений) материалы (интервал диаметров 40-120 мкм) и мелкозернистые (10-40 мкм). Последним присвоено обозначение “Superfine”, которое фигурирует в названии типа сефадекса. Два наиболее распространенных типа сефадексов (G-25 и G-50), помимо категории “Superfine”, имеют еще три диапазона размеров: “Fine” (20-80 мкм), “Medium” (50-150 мкм) и “Coarse” (100-300 мкм). Зато мелкопористые типы (G-10 и G-15) выпускаются только в виде гранул обычного размера (40-120 мкм). В аналитических вариантах колоночной гель-хроматографии обычно используют категории “Fine” и “Superfine”. “Medium” следует предпочесть для препаративных опытов, в “Coarse” - для фракционирования в свободном объеме. Для гель-фильтрации в тонком слое используют только сефадексы категории “Superfine”.

1.5.1. ПОДГОТОВКА МАТРИЦЫ

Для гель-фильтрации при высоком давлении используются уже готовые фирменные колонки. Большинство матриц для гель-фильтрации при низком давлении поставляется в виде водных суспензий. Их подготовка сводится к замене буфера и удалению консервирующих добавок декантацией. Сефадексы и биогели серии Р поставляются в сухом виде, так что им нужно дать хорошо набухнуть в воде или буфере. Рассчитанное с учетом объема упакованной набухшей матрицы количество порошка высыпают тонкой струей в стакан с жидкостью (ее следует взять с запасом), перемешивая стеклянной палочкой. *Нельзя приливать жидкость к порошку* - это может привести к образованию комков. Перемешивать надо осторожно, чтобы не разрушать гранул. Пользоваться для этого магнитной мешалкой не следует. При комнатной температуре для полного набухания сефадексов G-10 - G-50 требуется 3 часа, G-75 рекомендуется оставить для набухания на сутки, а более крупные номера - на 3 суток. Эту процедуру можно существенно ускорить, если проводить ее на кипящей водяной бане: для названных групп сефадексов она займет тогда соответственно 1, 3 и 5 часов. Одновременно произойдет и деаэрация жидкости. Однако биогели серии Р долгое время держать в горячей воде не следует. Завершение процесса набухания геля до его внесения в колонку - необходимое условие ее нормальной работы. В противном случае гель продолжает набухать в колонке, гранулы деформируются и скорость течения элюента сильно падает.

Сухие гели истираются при транспортировке, поэтому от мелких частиц надо освобождаться повторной декантацией (“отмучиванием”). Одновременно гель переводят в нужный для элюции бу-

фер. Если набухание геля проходило при комнатной температуре, то его суспензию после отмучивания необходимо деаэрировать, как обычно, в колбе Бунзена. Не следует ее при этом интенсивно перемешивать во избежание дальнейшего истирания. Элюирующий буфер также деаэрируют.

Заполненную гелем колонку, хранившуюся на холоде, не следует перед использованием держать при комнатной температуре. Это может привести к образованию микропузырьков воздуха в материале колонки за счет выхода ранее растворенного в жидкости газа. Если охлажденную колонку надо использовать при комнатной температуре, ее следует сразу же промыть деаэрированным при комнатной температуре буфером.

1.5.2. ОБЩИЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ

Важное значение имеют размеры колонки, в том числе ее общий объем, а также соотношение длины и диаметра. В идеальных условиях последний параметр не должен был бы играть существенной роли. Действительно, толстая и короткая колонка имеет то преимущество, что она позволяет достичь больших скоростей потока и уменьшить его турбулентность, что приводит к меньшему размыванию пиков. С другой стороны, разрешение у такой колонки может быть ниже, поскольку число гранул, а следовательно, и число элементарных актов гелефильтрации, совершающихся по мере того, как белки входят в частицы геля и выходят из них, в расчете на каждую молекулу, будет меньше. Но главный недостаток короткой и толстой колонки заключается в том, что в ней трудно добиться равномерного нанесения образца и равномерного потока буфера.

В длинной и тонкой колонке белковые зоны менее подвержены искажениям в горизонтальной плоскости. Во всяком случае такие искажения здесь не столь важны, так как образец занимает большее расстояние по высоте колонки. В повседневной практике гельхроматографию проводят в колонках, длина которых в 20-40 раз превышает их диаметр. Неравномерное нанесение образца, искажение хроматографического слоя и другие причины, приводящие к неравномерности потока, в таких колонках оказываются менее существенными, чем в коротких и толстых колонках того же объема.

1.5.3. НАБИВКА КОЛОНКИ

Колонку закрепляют в вертикальном положении. Заполняют “мертвое пространство” и нижнюю часть колонки элюантом. Вырезанный из фильтровальной бумаги фильтр, соответствующий по диаметру внутреннему диаметру колонки, опускают на перфорированный стеклянный диск, впаенный в колонку. Открывают кран снизу колон-

ки для движения элюанта. Колонку необходимо заполнять по возможности в один прием, чтобы предотвратить разделение гранул по размерам в процессе оседания. С этой целью используют суспензию, объем которой не более чем в два раза превышает объем осевшего материала. Заполнение колонки следует производить как можно быстрее без использования давления. Хороший способ создать более высокую скорость потока - это присоединить снизу к колонке длинную, но не слишком узкую трубку, с тем, чтобы увеличить общую высоту столба жидкости. Тогда падение давления в самой колонке окажется выше.

Во время заполнения колонки надо проверить, нет ли одностороннего ее нагревания близко расположенным источником тепла, солнцем или же охлаждения сквозняком. Тотчас после наполнения колонки к ней присоединяют резервуар с соответствующим буфером и для стабилизации колонки пропускают один-два объема жидкости.

Для проверки качества набивки колонки соответствующими матрицами, через колонку пропускают раствор окрашенного и заведомо высокомолекулярного вещества. Часто для этой цели используют голубой декстран ("Blue Dextran 2000") фирмы "Pharmacia" (можно также использовать тушь). Его молекулярная масса (около $2 \cdot 10^6$) превышает предел исключения для большинства матриц 0,2%-й раствор голубого декстрана, объем которого составляет 1-2% от объема колонки, вносят в рабочем буфере и элюируют с выбранной для опыта скоростью, наблюдая форму хроматографической зоны на всем пути ее следования по колонке. Искривление, перекося или негладкие границы окрашенной зоны указывают на несовершенство набивки колонки. В очень тонких колонках искривление - почти неизбежное следствие торможения течения жидкости у стенок. Перекося зоны может быть обусловлен односторонним нагревом или охлаждением колонки во время заполнения, а также не строго вертикальным ее расположением. Неровные границы указывают на наличие крупных неоднородностей в набивке колонки, скорее всего - загрязнений и пузырьков газа. Эти неоднородности и каналы нередко можно наблюдать на просвет, освещая колонку сзади лампой.

Следует пользоваться свежеприготовленным раствором голубого декстрана. При хранении молекулы голубого красителя постепенно отщепляются от декстрана и могут сорбироваться на материале матрицы. Одновременно с оценкой качества набивки пропускание через колонку голубого декстрана позволяет определить свободный объем колонки.

1.5.4. ПАНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦА НА КОЛОНКУ

Тщательность выполнения этой операции при гель-фильтрации играет особо важную роль. Исходный препарат в большинстве случаев

вносят на хроматографическую колонку растворенным в том же буфере, каким уравновешена сама колонка.

В открытую колонку препарат вносят вручную из пипетки. Начинают с того, что спускают жидкость из колонки так, чтобы открылся (но не начал обсыхать!) слой сорбента. Затем сливную трубку зажимают. Раствор препарата осторожно, чтобы не взмутить сорбент, заливают по стенке колонки, начиная от расстояния в 1 мм над поверхностью сорбента и постепенно вместе с уровнем раствора препарата продвигая кончик пипетки вверх по стенке. После того как весь объем препарата внесен в колонку, сливную трубку освобождают от зажима и дают слою препарата войти в сорбент до того момента, когда его поверхность снова обнажится. Так же, как описано, вносят объем элюента, равный объему препарата, а затем спускают его в сорбент. Такую промывку стенок колонки целесообразно повторить еще раз. После этого заливают (так же) некий объем элюента (на высоту 1-2 см) и вставляют верхнюю пробку с капельницей.

Гравитационная неустойчивость, возникающая в ходе нанесения образца, особенно велика, когда используются очень плотные растворы, такие как растворенные осадки, полученные при фракционировании сульфатом аммония. Это особенно трудная проблема в случае применения мягких гелей типа сефадекса G-200.

Ниже суммированы практические рекомендации. Размеры колонки должны в 30-100 раз превышать объем образца. Исходная концентрация белка в идеале должна составлять 10-20 мг·мл⁻¹, самое большее - 30 мг·мл⁻¹. Таким образом, 100 мг белка следует растворить в объеме не меньшем, чем 3,5 мл, лучше 5-6 мл, и использовать колонку объемом 200-250 см³. Длина колонки должна в 20-40 раз превышать ее диаметр, т.е. для указанного количества белка подходящими будут колонки диаметром 2,5 и длиной 50 см или соответственно 1,8 и 100 см.

1.5.5. РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЛОНКИ

В ходе длительной эксплуатации, даже при условии выполнения этих мер предосторожности, верхний слой столба матрицы в колонке может постепенно загрязниться. Его можно удалить так: взмутить верхние 1-2 см столба матрицы и отсосать суспензию. Затем следует дополнить колонку буфером или жидкой суспензией геля, взмутить еще небольшой слой матрицы и уравновесить колонку прокачкой буфера, как при первоначальном заполнении. Если загрязнена значительная часть матрицы, колонку лучше набить заново.

Обычно осуществление регенерации не требует других мер, кроме промывки буфером (2-3 объема колонки). Если есть опасение, что некоторое количество материала сорбировалось на матрице и не отмывается буфером, то через колонку можно пропустить порцию 1M

раствора NaCl, 8м мочевины, детергента или, наконец, 0,5н. NaOH для тех матриц, которые, как сефадексы или биогели Р, не боятся такой обработки. Об удалении загрязнения верхнего слоя колонки было сказано выше. При тщательном уходе колонки для гель-фильтрации могут служить в течение нескольких месяцев, даже года. Разумеется, в промежутках между опытами колонку следует уравновесить буфером с растворенным в нем консервантом, например 0,02%-м раствором азиды натрия. Колонки сефадекса можно сохранять в 2М растворе NaCl. Для этого его надо обильно промыть на фильтре сначала водой, потом 50%-м и 96%-м этанолом и высушить. Каждую промывку надо проводить в течение достаточно длительного времени, каждый раз давая постоять, чтобы растворители проникли вглубь глобул матриц. Промытую таким образом матрицу сушат при температуре 60° в термостате.

1.5.6. ВЫБОР МАТРИЦЫ

В зависимости от конкретных задач, стоящих перед исследователем, и свойств разделяемых молекул белков, в первую очередь от их масс, выбираются матрицы определенного типа. Для обессоливания раствора макромолекул естественно использовать жесткие, достаточно мелкопористые матрицы с крупными гранулами (последнее - для увеличения скорости течения), например сефадекс G-25 или биогель Р-6. Для обессоливания более мелких молекул можно воспользоваться сефадексами G-10 и G-15 или биогелями Р-2 и Р-4. Названные матрицы удобны и для смены буфера, в котором первоначально находится препарат, на тот, которым уравновешена колонка и производится элюция, или для освобождения биополимеров от радиоактивных низкомолекулярных предшественников. Близка к описанному и задача рассортировки смеси на две группы веществ - высокомолекулярных и низкомолекулярных (например, отделение белков от пептидов или нуклеиновых кислот от белков). В данном случае следует выбрать матрицу с пределом исключения, лежащим между теми значениями молекулярной массы, которые в данной задаче следует считать высокими и низкими.

Для аналитического фракционирования следует использовать гранулы наименьших возможных размеров (категорий "Fine" и "Superfine") для сефадексов, 200-400 МЕШ для биогелей серии Р. Для препаративного фракционирования можно выбрать средние и грубые сефадексы. Зная молекулярную массу выделяемого белка, можно выбрать нужную матрицу, руководствуясь рекомендациями фирмы. Если молекулярный вес не известен, нужно посмотреть, как будет вести себя исследуемый белок на различных сефадексах.

1.5.7. ВЫБОР ЭЛЮЕНТА

Выбор элюента определяется, в первую очередь, условиями растворимости и сохранности материала препарата. Эти соображения могут диктовать рН и ионную силу буфера, наличие в нем мочевины и детергентов. Однако надо иметь в виду и возможное воздействие выбора элюента на ход самого хроматографического процесса. Во-первых, такое воздействие может проявляться в изменениях конформации или плотности упаковки макромолекул, диссоциации белков на субъединицы, диссоциации кофакторов от ферментов и др. Во-вторых, следует проверить устойчивость материала матрицы к выбранному значению рН и диссоциирующим добавкам. Наконец, не следует упускать из виду возможности влияния элюента на взаимодействие разделяемых веществ с материалом матрицы, т.е. принимать меры для защиты от сорбции (а иногда - для усиления). Если впоследствии предполагается лиофилизировать препарат, то имеет смысл воспользоваться легко летучим буфером, например ацетатом или бикарбонатом аммония.

1.6. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Электрофорез занимает по-прежнему одно из центральных мест среди методов исследования белков. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в стеклянную трубку или между стеклянными пластинами, начать пропускать электрический ток, то сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по краям рабочего слоя, отнесенной к его длине (V/cm). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. *В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом - сущность процесса электрофореза.* Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью.

В настоящее время почти исключительно используются полиакриламидные гели (ПААГ) и гели агарозы. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул

путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

В ходе электрофореза зоны растворенных макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые макромолекулы, но не взаимодействуют с ним. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца поля ПААГ, электрофорез прекращают.

1.6.1. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО РАЗМЕРУ И ЗАРЯДУ

В этом случае в электродных резервуарах и для полимеризации ПААГ используют один и тот же буфер, поэтому такую систему иногда называют непрерывной, или простой. Строго говоря, непрерывность нарушается тем, что буфер, в котором вносят белковый препарат, с целью концентрирования исходной зоны разбавляют в 5-10 раз водой.

Подбор оптимальных условий электрофореза сводится к выбору следующих параметров: пористости геля и степени его сшивки; природы, концентрации и рН буфера; диссоциирующих добавок (если это необходимо); максимально допустимой мощности, напряжения и силы тока, а также продолжительности разделения; объема и концентрации исходного препарата; процедуры предварительной обработки препарата.

1.6.2. РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО РАЗМЕРУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Электрофорез белков в простой системе удобно использовать для их разделения, но не для характеристики. Электрофоретическая подвижность каждого белка в простой системе зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации, и, наконец, от жесткости упаковки полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно изменяться в зависимости от условий электрофореза. Для установления строгой количественной корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белка надо исключить влияние всех остальных.

Электрофорез в ПААГ с использованием ДДС-Na (додецилсульфат натрия) позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра - их молекулярной массы. Для этого белки в исходном растворе препарата обрабатывают не менее

чем трехкратным избытком ДДС-На. За счет гидрофобных взаимодействий детергент примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг ДДС-На на 1 мг белка. Огромный избыток полностью диссоциированных остатков сульфокислоты, приносимых с детергентом, в большинстве случаев делает незначительной роль собственного заряда белка. Постоянство соотношения детергент/белок делает практически одинаковым отношение отрицательного заряда к массе для любого белка, даже для гистонов с их заметным собственным положительным зарядом.

По окончании электрофореза, измерив пути миграции красителя и каждого из маркеров (белков), можно рассчитать значения электрофоретической подвижности и, зная молекулярные массы маркеров, построить экспериментальную зависимость $\lg M$ (молекулярной массы) от электрофоретической подвижности для данного опыта. Если пористость геля выбрана удачно, такая зависимость получается линейной. Определив электрофоретическую подвижность для исследуемого белка, из графика можно найти для него величину $\lg M$ и подсчитать молекулярную массу.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНОГЕНА ИЗ МОЛОКА

Казеиноген обладает свойствами кислоты и в молоке находится в виде анионов, растворенных в воде (кальцинат казеиногена). Недиссоциированные молекулы казеиногена малорастворимы в воде. Изoeлектрическая точка казеиногена находится при pH 4,7 молоко свертывается в результате выпадения в осадок казеиногена. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, т.к. молекулы казеиногена перезаряжаются и вновь переходят в раствор, что мешает осаждению [3].

Оборудование и реактивы. Молоко. Уксусная кислота, концентрированная. Конические колбы на 50 или 100 мл. Воронки. Пробирки. Стеклянные палочки. Мерный цилиндр на 50 или 100 мл. Фильтры.

Ход работы. К 20 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды. Добавляют 10-12 капель концентрированной уксусной кислоты. Осторожно перемешивают. Выпадает осадок казеиногена. Выпавший осадок казеиногена отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой два раза.

2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ МУЦИНА ИЗ СЛЮНЫ

Муцин представляет собой гликопротеид. Простетическая группа муцина представлена нейтральным мукополисахаридом [3].

Оборудование и реактивы. Слюна. Уксусная кислота, концентрированная. Конические колбы на 50 мл. Воронки. Пробирки. Стеклянные палочки. Мерный цилиндр на 50 мл. Пипетки. Фильтры.

Ход работы. В колбу собирают 10 мл слюны и небольшими порциями приливают концентрированную уксусную кислоту (1,5-2,0 мл). Выпадает осадок муцина. Осторожно сливают жидкость из колбы, а сгусток переносят на фильтровальную бумагу.

2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ МИОЗИНА ИЗ МЫШЦ

Выделение миозина должно проводиться как можно быстрее при температуре не выше 4°C в предварительно охлажденной посуде и с растворами, приготовленными на деионизированной или бидистиллированной воде. Необходимо вводить во все растворы ЭДТА и желательно протекторы тиоловых групп (2-меркаптоэтанол, цистеин) в концентрации 1-10 мМ [1].

Отделение миозина от примесей основывается главным образом на способности миозина осаждаться из растворов KCl ($I=0,3-0,6$) при понижении его концентрации ниже физиологической ($I=0,03-0,10$). Так, одним-двумя переосаждениями миозина можно практически полно-

стью освободить его препараты от саркоплазматических белков и белков крови.

Предлагаемая пропись выделения миозина является модифицированным методом Перри [1]. Срезанные мышцы кролика (можно использовать скелетные мышцы других животных) сразу помещают в молотый лед. Охлажденные и очищенные от жировой и соединительной ткани, мышцы пропускают 2 раза через предварительно охлажденную мясорубку с диаметром отверстий не более 2 мм (для предотвращения контакта мышцы с металлом мясорубку рекомендуется покрыть слоем силикона). Чем больше степень измельчения ткани, тем выше выход миозина. Мышечный фарш взвешивают и заливают 3-кратным объемом раствора 0,3 М КС1, 0,1 М КН₂РO₄, 0,05 М К₂НРO₄, 10 мМ Na₄P₂O₇, 0,001 М MgCl₂, рН 6,5. Экстракцию проводят 15-20 мин с перемешиванием стеклянной палочкой и заканчивают центрифугированием при 1000-5000 г в течение 10-15 мин.

Надосадочную жидкость быстро фильтруют через промытую экстрагирующим раствором бумажную мязгу или вату. Миозин осаждают, вливая фильтрат в 14 объемов 5 мМ ЭДТА, рН 6,6-6,8 и осторожно перемешивают получаемую смесь. Суспензию оставляют на холоде. Через 2-3 часа надосадочную жидкость декантируют и оставшуюся густую суспензию центрифугируют. Продолжительность (1-30 мин) и скорость (1000-5000 г) центрифугирования должны быть достаточны для того, чтобы в надосадочной жидкости не было хлопьев, однако не следует сильно уплотнять осадок, так как это затруднит его последующее растворение. Обычно этим требованиям удовлетворяет центрифугирование при 2000 г в течение 20 мин. Осадок переносят в мерный цилиндр, охлажденный льдом, и растворяют добавлением 3 М КС1, 5 мМ ЭДТА, рН 7,0 до конечной концентрации 0,5 М КС1. В результате получают раствор неочищенного миозина.

К этому раствору приливают 5 мМ ЭДТА, рН 6,8, понижая концентрацию КС1 до 0,3 М. Актомиозин осаждают центрифугированием при 20000 г в течение двух часов. К надосадочной жидкости, содержащей миозин, приливают 5 мМ ЭДТА, рН 6,8, понижая концентрацию КС1 до 0,04 М. Сбор и растворение осадка миозина, осаждение актомиозина, а затем миозина снова повторяют. Раствор миозина в 0,5 М КС1, 5 мМ ЭДТА, рН 7,0 осветляют центрифугированием при 20000 г в течение двух часов.

Выделяя миозин (по описанному выше методу) из скелетных мышц рыб, следует актомиозин осажждать центрифугированием в 0,23-0,28 М КС1. Кроме того, перед экстракцией миозина рекомендуется промыть мышцу раствором с низкой ионной силой (0,05), содержащим ЭДТА.

2.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНА ИЗ СЕМЯН ФАСОЛИ

Фитогемагглютинин представляет собой биологически активный белок растительного происхождения. Он вызывает агглютинацию эритроцитов человека и животных, а также бласттрансформацию и митозы периферических лимфоцитов.

Процедура выделения включает экстракцию кислотой, фракционирование сульфатом аммония, диализ и фракционирование ацетоном[7].

Реактивы: концентрированная соляная кислота; 0,1 М раствор HCl; 0,15 М раствор NaCl; насыщенный раствор сульфата аммония (рН 1,0) (1 л раствора содержит 508 г сульфата аммония и 85 мл концентрированной соляной кислоты; ацетон; 1 М раствор NaOH.

2.4.1. ЭКСТРАКЦИЯ И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СУЛЬФАТОМ АММОНИЯ

Семена фасоли измельчают на шаровой мельнице или электрической кофемолке. Полученную муку (200 г) экстрагируют 1 л 0,1 М раствора HCl. Экстракцию проводят при постоянном перемешивании в течение 24 часов при 4°C. Добавлением концентрированной соляной кислоты поддерживают рН экстракта, равным 1,0. Измеряют объем экстракта (около 1200 мл) и прибавляют к нему при постоянном перемешивании равный объем насыщенного раствора сульфата аммония (рН 1,0). Суспензию оставляют на 24 часа при 4°C. Грубые хлопья за это время оседают на дно, надосадочную суспензию собирают сифонированием и центрифугируют при 54000g в течение 60 минут при 4°C. Осадок отбрасывают, прозрачную надосадочную жидкость собирают, измеряют ее объем (около 1400 мл) и смешивают с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония (рН 1,0). Полученную суспензию выдерживают в течение 24-48 часов при -10°C и затем центрифугируют при 35000g в течение 30 минут при -5°C. Надосадочную жидкость отбрасывают, осадок суспендируют в двойном объеме дистиллированной воды.

Полученную суспензию диализуют против дистиллированной воды при 4°C до тех пор, пока в диализате не установится рН 3,9. Для ускорения диализа его проводят против проточной дистиллированной воды. К концу диализа объем суспензии возрастает на 60-70%. Суспензию центрифугируют при 40000g в течение 40 минут при 4°C.

2.4.2. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ АЦЕТОНОМ

В очищенном центрифугированном диализате определяют концентрацию белка по поглощению раствора при 280 нм, принимая, что у суммарного белка диализата $E_{280}=10,0$. Обычно концентрация белка составляет 30-32 мг/мл. Перед тем как приступить к фракционированию ацетоном, диализат разбавляют с помощью 0,15 М раствора NaCl до концентрации белка 5 мг/мл, после чего добавлением 1М раствора NaOH доводят pH до 5,8.

К полученному разведенному диализату по каплям при постоянном перемешивании при 4°C добавляют охлажденный до 4°C ацетон из расчета 1,4 мл ацетона на 5 мл разведенного диализата. Образовавшуюся в результате добавления ацетона суспензию разливают в центрифужные пробирки, плотно закрывают крышками и спустя 2 часа центрифугируют при 20000g в течение 20 мин. К прозрачной надосадочной жидкости прибавляют охлажденный до 4°C ацетон из расчета 1,8 мл ацетона на 5 мл исходного разведенного диализата и через 30 мин полученную суспензию центрифугируют при 20000g в течение 20 мин при 4°C. Осадок растворяют в 0,15М растворе NaCl, затем диализуют против дистиллированной воды и высушивают (желательно лиофилизацией). Выход составляет 300-400 мг фитогемагглютинина из 100 г фасоли. Можно оставить выделенный белок в растворенном состоянии, но в таком виде он сравнительно быстро инактивируется. Фитогемагглютинин не растворяется в воде, однако хорошо растворим в солевых растворах с ионной силой 0,1.

2.5. ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

2.5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ИЗ ЖИВОТНЫХ ТКАНЕЙ

Все многообразие белков, встречающихся в животных тканях, можно разделить на водорастворимые (экстрагируемые водой, растворами солей, буферными растворами, разбавленными кислотами и щелочами) и мембранные (солюбилизированные детергентами).

Оборудование и реактивы. Печень крысы или мышей. Лед. Гомогенизатор. Чашка Петри. Весы. Центрифуга. Пробирки. Колбы на 100-200 мл. Стеклянные стаканчики. Фильтровальная бумага.

Ход работы. 2-3 г печени помещают в чашку Петри, стоящую на льду, и отмывают от крови в дистиллированной воде. Кроме того, ткань освобождают от оболочек, соединительной ткани, жира. После обработки ткань подсушивают с помощью фильтровальной бумаги и взвешивают.

Первоначально ткань измельчают ножницами, а затем гомогенизируют с 15-20-кратным объемом (по отношению к весу ткани) охлажденной дистиллированной воды (+4°C) в гомогенизаторе с тефлоновым или стеклянным пестиком. Гомогенизацию проводят до образования гомогенной суспензии.

Гомогенат центрифугируют в течение 60 мин на центрифуге РС-6 при 18000 об/мин (такой режим центрифугирования предлагается с целью максимального осаждения внутриклеточных органелл и мембранных фрагментов). Надосадочную жидкость (супернатант) осторожно сливают в стеклянную колбу и хранят на холоду. Осадок суспендируют в 10-кратном объеме (по отношению к весу взятой ткани) дистиллированной воды и замораживают. После размораживания суспензию дополнительно растирают в гомогенизаторе со стеклянным пестиком и центрифугируют при тех же режимах. Подобную процедуру можно повторить еще раз. Таким образом возможно максимально экстрагировать водорастворимые белки. Все супернатанты объединяют и в полученном экстракте определяют количество содержащегося там белка, проводят фракционирование смеси белков с помощью гель-хроматографии, разделение белковой смеси электрофорезом в ПААГ, определение наличия SH-групп и S-S-связей в белках.

2.5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

Описанным ниже методом можно выделять водорастворимые белки из любых тканей растений. Определенную навеску тканей тщательно растирают в фарфоровой ступке с добавлением 10 мл 0,01 М раствора трис-глицинового буфера (рН 8,3). Буфер готовится непосредственно перед работой.

Полученный таким образом гомогенат помещают в холодильник на 40 мин для экстракции белков. После экстракции гомогенат центрифугируют при 75000 g • мин. Осадок отбрасывают, а в супернатанте определяют содержание водорастворимых белков.

2.6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА

Существует достаточно большое количество разнообразных методов определения содержания белков в растворе. Некоторые из этих методов в настоящее время применяются достаточно редко (определение азота по Кьельдало, рефрактометрия). К наиболее широко применяемым методам относятся: 1) биуретовая реакция с использованием щелочного раствора соли меди; 2) метод Лоури с применением реактива Лоури-Фолина-Чокальтео; 3) измерение оптической плотности в ультрафиолетовой области спектра при 280 нм (полоса

поглощения ароматических групп) или при 205-220 нм (полоса поглощения пептидных групп); 4) связывание красителей.

Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки, но важно отметить, что ни один метод, за исключением взвешивания сухого белка, не дает однозначных и точных результатов в пределах нескольких процентов, если только он не калиброван по белковому раствору того же состава. Практически это означает, что истинно точное измерение можно провести лишь для чистых белков, после того как метод будет стандартизован. Для этого определяют сухой вес этих чистых белков и строят соответствующую калибровочную кривую. Однако если белок содержит небелковые простетические группы (углеводы, нуклеиновые кислоты), то определение сухого веса дает значение для всей молекулы, а не для ее белковой составляющей.

2.6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА МИКРОБИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

В основе метода лежит образование фиолетового комплексного соединения Cu^{2+} и пептида при обработке белка щелочным раствором CuSO_4 . Для развития окраски необходимо наличие, по крайней мере, двух пептидных связей. Чувствительность метода 0,1-2 мг белка в пробе [9].

Реактивы: стандартный раствор альбумина 2 мг/мл; раствор NaOH , 6%-й; реактив Бенедикта: 17,3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия растворяют в 50 мл воды при подогревании (не доводя до кипения). Затем к раствору при перемешивании добавляют 1,73 г сульфата меди, предварительно растворенного в 10 мл воды. Смесь доводят до 100 мл.

Ход работы. Исследуемый раствор белка, содержащий 0,1-2 мг белка, доводят водой до объема 2 мл. Затем добавляют 2 мл 6%-го раствора едкого натра и 0,2 мл реактива Бенедикта. Через 15 мин. измеряют экстинкцию при длине волны 330 нм на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре. В качестве контроля используют раствор, содержащий 2 мл воды, 2 мл раствора щелочи и 0,2 мл реактива Бенедикта.

Для построения калибровочной кривой используют, как правило, стандартный раствор альбумина. Для каждой концентрации белка готовят не менее трех повторов. В таблице 2 приведен порядок заполнения проб и количество белка в каждой пробе.

Заполнение проб при построении калибровочной кривой микробиуретовым методом

Количество белка в пробе, мг	Стандартный раствор белка, мл	Вода, мл	6%-ый раствор NaOH, мл	Реактив Бенедикта, мл
0,1	0,1	1,9	2	0,2
0,4	0,4	1,6	2	0,2
0,7	0,7	1,3	2	0,2
1,0	1,0	1,0	2	0,2
1,5	1,5	0,5	2	0,2
2,0	2,0	–	2	0,2

2.6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО МЕТОДУ ЛОУРИ

Настоящий метод сочетает биуретовую реакцию и реакцию на тирозин и триптофан. Чувствительность метода 10-100 мкг белка в пробе.

Реактивы: стандартный раствор альбумина, 0,25 мг/мл; 0,5%-й раствор карбоната натрия в 0,1М растворе едкого натра (реактив №1); 0,5%-й раствор сернокислой меди в 1%-м растворе цитрата натрия (реактив №2) (непосредственно перед употреблением 1 мл реактива №2 смешивают с 50 мл реактива №1 - реактив №3); реактив Фолина-Чокальтео: 50 г вольфрамата натрия (двухводного) и 12,5 г молибдата натрия (двухводного) растворяют в 350 мл воды. К полученной смеси добавляют при перемешивании 25 мл 85%-го раствора фосфорной кислоты и 50 мл концентрированной соляной кислоты. Полученный раствор кипятят в колбе на 1 л с обратным холодильником в течение 10 часов. Затем добавляют 75 г сернокислого лития, 25 мл воды, 3 капли брома и кипятят без холодильника 15 мин. для удаления избытка брома. Охлажденный раствор доводят водой до 500 мл и фильтруют. Полученный реактив титруют 0,1н раствором натриевой щелочи и разбавляют водой до конечной концентрации кислоты 1н.

Ход работы. Исследуемый раствор, содержащий 10-100 мкг белка, доводят водой до 0,4 мл, смешивают с 2 мл реактива №3 и спустя 10 мин. добавляют 0,2 мл реактива Фолина-Чокальтео. Через 40 мин. пробы колориметрируют при длине волны 750 нм.

Для построения калибровочной кривой используют стандартный раствор альбумина. Порядок заполнения проб приведен в таблице 3.

Заполнение проб для построения калибровочной кривой методом Лоури

Количество белка в пробе, мкг	Стандартный раствор белка, мл	Вода, мл	Реактив №3, мл	Реактив Фолина-Чокальтео, мл
10	0,04	0,36	2	0,2
20	0,08	0,32	2	0,2
40	0,16	0,24	2	0,2
60	0,24	0,16	2	0,2
80	0,32	0,08	2	0,2
100	0,40	—	2	0,2

Присутствие в пробе глицина, 0,1М фосфатного буфера, хлористого калия и β-меркаптоэтанола затрудняет проведение анализа. При определении белка в экстрактах тритона X-100 после добавления реактива Фолина-Чокальтео образуется зеленоватый осадок, который следует удалять центрифугированием при 8000 об/мин 15 минут.

2.6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ АМИДО-ЧЕРНОГО

Настоящий метод используют для определения водорастворимых белков растительных тканей.

Реактивы: осаждающий реагент (37,65 г лимонной кислоты, 1,136 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,6 г амидо-черного 10В растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1 л).

Ход работы. К 4 мл гомогената растительных тканей приливают 0,5 мл осаждающего реагента. Суспензию центрифугируют при 17500 г·мин. После центрифугирования определяют оптическую плотность супернатанта на КФК-3 при длине волны 615 нм. Содержание водорастворимых белков определяют с помощью калибровочной кривой, построенной по человеческому сывороточному альбумину. При построении калибровочной кривой для определения водорастворимых белков растительных тканей целесообразно сначала выделить пул этих белков (осаждением с помощью трихлоруксусной кислоты), высушить и только затем строить кривую по выделенным белкам.

2.6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ХЛОРОПЛАСТОВ ПО МЕТОДУ ЛОУРИ В МОДИФИКАЦИИ ХАРТИ

Особенностью данного метода является возможность определения содержания белка в суспензии хлоропластов без получения бесцветного раствора белка с помощью щелочи.

Реактивы. Раствор А (2 г K_2Na -виннокислого и 100 г Na_2CO_3 растворяют в 500 мл 1н раствора $NaOH$ и доводят дистиллированной водой до 1000 мл); раствор В (2 г K_2Na -виннокислого и 1 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ растворяют в 90 мл дистиллированной воды и добавляют 10 мл 1н раствора $NaOH$); раствор С (концентрированный реактив Фолина-Чокальтео разводят водой до 0,15-0,18н. Этот раствор готовят каждый раз непосредственно перед работой). Растворы А и В хранятся в полиэтиленовых емкостях в течение месяца при комнатной температуре.

Ход работы. К 1 мл белка (находящемуся в пробирке с притертой пробкой) или водной суспензии хлоропластов добавляют 0,9 мл раствора А. Пробирки помещают на 10 мин в водяную баню при $+50^\circ C$, затем пробирки вынимают и охлаждают до комнатной температуры ($21-25^\circ C$) и при встряхивании добавляют 0,1 мл раствора В. После этого смесь выдерживают при комнатной температуре 10 мин. Затем к содержимому пробирок добавляют 3 мл раствора С и смесь энергично кратковременно (1-2 сек) встряхивают. Пробирки снова выдерживают при $+50^\circ C$ в течение 10 мин и затем охлаждают до комнатной температуры. Контрольную пробу готовят таким же образом, но вместо раствора белка используют 1 мл дистиллированной воды. Измерение оптической плотности раствора проводят на СФ-26 при 650 нм. Концентрацию белка определяют по калибровочному графику, построенному с использованием бычьего альбумина.

2.7. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ МЕТОДОМ ГЕЛЬ—ФИЛЬТРАЦИИ

Жидкостная хроматография методом геля-фильтрации является эффективным методом разделения и очистки белков. Скорость движения белков в колонке определяется молекулярным весом, формой и химическим строением молекул. Элюирование компонентов белковой смеси происходит в порядке уменьшения их молекулярного веса.

Как уже отмечалось ранее, в качестве молекулярных сит при геле-хроматографии широко используют сефадексы. Сефадексы - это сильно гидрофильные гели, состоящие из поперечносшитых полисахаридных цепочек декстрана. Сефадексы устойчивы к щелочам и слабым кислотам, но неустойчивы к сильным кислотам и сильным окислителям. При длительном хранении геля в набухшем состоянии

в сефадексе необходимо вводить антисептик - 0,02% азид натрия или 0,001% мертиолат.

Марки сефадекса различаются между собой по степени пористости гранул геля, что определяет их свойства (таблица 1).

Объем столбика геля в колонке складывается из трех величин: объема между набухшими гранулами геля V_h , объема растворителя внутри набухшего геля V_b и объема сухого сефадекса V_c , т.е.

$$V_{\text{общий}} = V_h + V_b + V_c .$$

$V_{\text{общий}}$ можно рассчитать, зная высоту столбика сефадекса в колонке и внутренний диаметр колонки. V_h и V_b рассчитываются по формулам :

$$V_h = V_{\text{общий}} \cdot \frac{\alpha(1+M)}{d} ;$$
$$V_b = \alpha M = (V_{\text{общий}} - V_h) \frac{M \cdot d}{1+M} ,$$

где α - сухой вес, M - степень набухания сефадекса, d - плотность набухшего геля.

Объем элюата, собранного с момента внесения образца на колонку, до момента выхода белка с колонки называют объемом выхода - V_d . Объем выхода не зависит от скорости элюирования, концентрации вещества, температуры и прямо пропорционален логарифму молекулярного веса. Это служит предпосылкой для определения молекулярного веса белков путем измерения объема выхода.

Эффективность разделения белков определяется также размерами колонки и скоростью элюирования. Отношение диаметра колонки к ее длине обычно составляет 1:10, 1:20. Объем наносимого образца не может быть больше 1-2% объема геля, а концентрация белка не более 4%.

Внешний вид установки для гель-хроматографии приведен на рисунке 1.

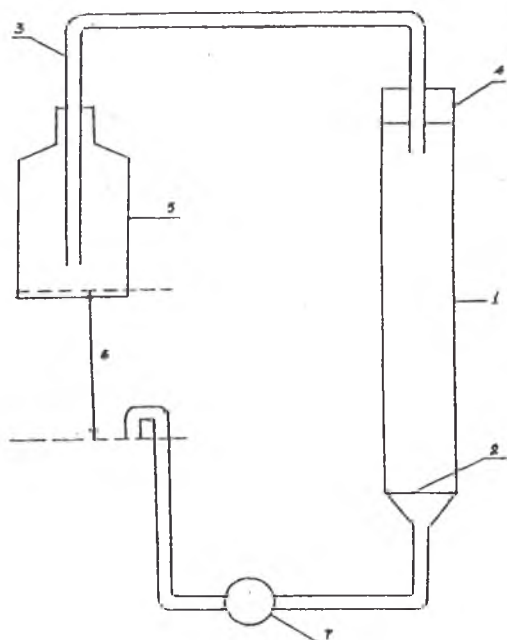


Рис. 1. Схема установки для гель-хроматографии: 1 - стеклянная колонка; 2 - стеклянный фильтр; 3- полиэтиленовые шланги; 4 - резиновая пробка; 5 - емкость с буферным раствором; 6 - эффективное гидростатическое давление; 7 - кран

Реактивы: сефадекс Г -150 (зернение 40 -120 м м); 0,05М трис - НСІ буфер рН 8,0, содержащий 0,5 М NaCl.

Ход работы. 16 г сухого сефадекса помещают в химический стакан и заливают буфером на 72 часа. Мелкие частицы удаляют декантацией до просветления жидкости над осадком (3-4 раза).

В работе используют колонку с внутренним диаметром 1,5 см. Перед заполнением колонки на стеклянный фильтр помещают кружок из фильтровальной бумаги и заполняют буфером на 1/3 длины. При этом следует обратить внимание на отсутствие пузырей воздуха под стеклянным фильтром. Наличие пузырей воздуха препятствует эффективному разделению белков. Затем в трубку заливают суспензию геля. Когда сформируется слой сефадекса высотой в 3 - 4 см, кран (7) открывают и по мере вытекания растворителя в колонку добавляют гель. Заполнение колонки прекращают,

когда высота сформировавшегося столбика геля достигает 45 см. На поверхности геля помещают кружочек фильтровальной бумаги.

Перед нанесением образца слой буфера из колонки спускают почти полностью. На поверхность геля пипеткой наносят 3 мл экстракта белка. Кран открывают и дают возможность раствору белка полностью впитаться. Затем на поверхность геля настилают буферный раствор толщиной несколько сантиметров и закрывают пробкой.

Эффективное гидростатическое давление составляет 15-20 см. Скорость элюирования 10-15 мл/час. Фракции собирают на автоматическом коллекторе объемом 2,5-3 мл. Белок, содержащийся в вытекающей жидкости, определяют по методу Лоури или микробиуретовым методом.

Для определения объема выхода V_d строят график зависимости содержания белка в элюатах от объема элюата (рисунок 2).

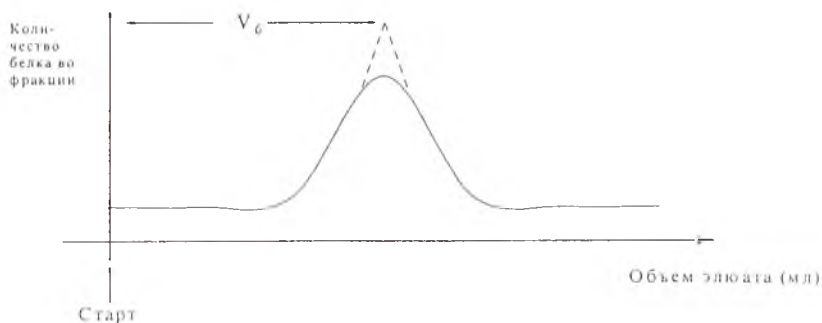


Рис. 2. Схема расчета объема выхода V_d на основании кривой элюирования

Молекулярный вес элюированных белков можно оценить по формуле:

$$\lg MB = 6,040 - 0,803 (V_d/V_n).$$

2.8. ОБЕССОЛИВАНИЕ БЕЛКА НА СЕФАДЕКСЕ G-25

Эффект “молекулярного сита” широко используют для быстрого отделения веществ с низким молекулярным весом от высокомолекулярных соединений, молекулы которых не способны проникнуть в глобулы сефадекса [9].

Для обессоливания используются обычно сефадексы с низкими номерами и грубо измельченные. Большинство исследуемых белков проходит через колонку, заполненную сефадексом (G-25, G-50), не проникая внутрь гранул. Эффективность разделения не зависит от концентрации белка. Колонки, используемые для подобных целей могут быть небольшие: диаметр - 1,5-2,0 см, высота - 10-15 см.

Освобождение от низкомолекулярных веществ с помощью сефадекса происходит гораздо быстрее и с меньшими потерями, чем при диализе.

Ход работы. Колонку заполняют набухшим в дистиллированной воде сефадексом. После формирования и стабилизации колонки определяют ее внешний и внутренний объемы. Затем на колонку наносят 1 мл солевого раствора белка и начинают собирать элюат порциями по 3 мл. В каждой определяют содержание белка и соли. На основе полученных данных строят график калибрования колонки и график элюции при обессоливании.

Для белков объем выхода должен быть немногим больше наружного объема колонки, а ионы соли элюируются приблизительно в объеме, равном сумме наружного и внутреннего объемов колонки.

2.9. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ

Если концентрация белков в растворе небольшая, а для последующих исследований требуется значительное их количество, то для этих целей используют сефадексы марок G-25 грубый, G-50 грубый, а также G-75, G-100 и G-200, если молекулярный вес белков достаточно высок.

Ход работы. К 1 мл раствора, содержащего 1-10 мг белка, добавляют сухой сефадекс до получения густой суспензии. Перемешивают. Сухой сефадекс набухает, впитывает воду. Высокомолекулярные вещества остаются вне гранул. Суспензию центрифугируют 5 мин при 5000g. Измеряют объем фильтрата и концентрацию белка. Обработку сефадексом можно повторить, если нужная степень концентрирования не была достигнута. Поскольку низкомолекулярные компоненты распределяются равномерно между внутренним и наружным объемами, изменения ионной силы, pH, ионного состава белкового раствора при концентрировании не происходит. Потери белка обычно не происходит.

2.10. АНАЛИЗ БЕЛКОВ ЭЛЕКТРОФОРЕЗОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) используется для анализа белков в их смесях. Поддерживающей средой при

электрофорезе служит сополимер акриламидных и метилен-бис-акриламидных мономеров. Разделение белковых молекул происходит при движении под действием внешнего электрического поля и определяется величиной заряда, молекулярным весом и размерами[2].

2.10.1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

1. Электрофорез водорастворимых белков в 7,5% ПААГ рН 8,7 применяется для разделения белков с молекулярным весом 10000-1000000 дальтон.

Реактивы (на 100 мл раствора): А - трис 4,48 г, рН 8,7; Б - акриламид 30 г, метилен-бис-акриламид 0,8 г; В - тетраметил-этилендиамин 1 мл; Г - аммоний надсерноокислый 0,3 г; Д - трис 0,726, рН 6,7; Е - акриламид 10 г, метилен-бис-акриламид 2,5 г; Ж - сахараза 43 г; 3-рибофлавин 4 мг; бромтимоловый синий 0,001 г; амидочерный 10Б в 7%-й уксусной кислоте 1 г; сахараза 55 г; трихлоруксусная кислота 10 г. Электродный буфер рН 8,3 (на 1000 мл): трис 6 г, глицин 28,8 г. 1000 мл 7%-й уксусной кислоты.

Приготовленные растворы хранить в темных склянках при +4°C. Растворы персульфата аммония и сахаразы хранить не более недели.

Ход работы. Разделяющий ПААГ готовят смешиванием растворов А-Б-Н₂О-В-Г в объемных отношениях 2:2:2:1:1. Из раствора разделяющего геля удаляют воздух. В стеклянные трубки внутренним диаметром 5 мм и длиной 100 мм вносят по 2 мл разделяющего геля. На его поверхность наслаивают 0,2-0,3 мл раствора А, разбавленного в 10 раз. Время полимеризации геля 20-25 минут, о чем можно судить по образованию границы раздела между гелем и наслоенным раствором. С поверхности геля удаляют наслоенный раствор с помощью тонких полосок фильтровальной бумаги. Аналогичную процедуру проводят и в случае использования не трубочек, а пластинок. Но в этом случае количество вносимого между стеклянными пластинами концентрирующего геля будет определяться шириной зазора между пластинами.

Концентрирующий гель готовят смешиванием растворов Д-Е-В-Ж-З в отношении 1:4:1:7:2. В каждую трубку вносят по 0,2 мл раствора геля и сверху наслаивают 0,1-0,2 мл раствора Д, разбавленного в 10 раз. Фотополимеризация завершается через 20-30 минут при использовании ультрафиолетовой лампы, о чем можно судить по помутнению геля и появлению границы раздела. Количество вносимого геля между стеклянными пластинами будет, как и в первом случае, определяться шириной зазора между пластинами. Если электрофорез будет проводиться в пластине ПААГ, то формируют в концентрирующем геле ячейки, помещая между стеклянными пластинами "гребенку". После завершения полимеризации "гребенку" осторожно вынимают. Насло-

енный раствор удаляют и в каждую трубку (или ячейку) вносят по 0,01-0,03 мл бромтимолового синего.

1 мл исследуемого раствора белка смешивают с 0,1 мл 55%-го раствора сахарозы. В каждую трубку (или ячейку) вносят полученную смесь, содержащую не более 150-200 мкг белка.

Если электрофорез проводят в трубках, то их устанавливают в верхний буферный резервуар. Нижний буферный резервуар заполняют 1 л разбавленного в 10 раз электродного буфера. Трубки опускают таким образом, чтобы они были погружены не более, чем на 5 мм в раствор буфера. Поверх раствора белка в трубках наслаивают раствор разбавленного в 10 раз электродного буфера так, чтобы над краями наблюдался выпуклый мениск. Верхний резервуар заполняют 1 л разбавленного в 10 раз электродного буфера. Электроды подключают к источнику питания: верхний (-), нижний (+).

Электрофорез проводят при токе 2 мА/трубку первые 30 минут, затем повышают до 5 мА/трубку. Опыт прекращают (т.е. прекращают подачу тока), когда окрашенная полоса маркера отстоит от конца геля на 5 мм.

После завершения электрофореза гели обрезают по линии маркерной полосы и фиксируют в трихлоруксусной кислоте 2 часа. Белки окрашивают раствором амидочерного 30 минут. Избыток красителя отмывают 7% уксусной кислотой.

Относительную электрофоретическую подвижность (R_m) обнаруженных белковых полос рассчитывают по формуле:

$$R_m = \frac{\text{Расстояние, пройденное зоной белка}}{\text{Расстояние, пройденное зоной маркерного красителя}}$$

2. Электрофорез водорастворимых белков в 7,5% ПААГ pH 4,3 применяется для разделения основных белков с молекулярным весом более 20000 дальтон.

Реактивы (на 100 мл раствора): А - 1н КОН 48 мл, ледяная уксусная кислота 17,2 мл, тетраметил-этилен-диамин 4 мл; Б - акриламид 30 г, метилен-бис-акриламид 0,8 г; В - персульфат аммония 0,28 г; Г - 1н КОН 48 мл, ледяная уксусная кислота 2,87 мл, тетраметил-этилен-диамин 0,46 мл; Д - акриламид 10 г, метилен-бис-акриламид 2,5 г; Е - рибофлавин 4 мг; Ж - сахароза 40 г; трихлоруксусная кислота 10 г; метиловый зеленый 0,1 г; сахароза 55 г; амидочерный 10Б в 7%-й уксусной кислоте 1 г. Электродный буфер pH 4,3 на 1000 мл раствора содержит: аланин 31,2 г, ледяная уксусная кислота 8 мл. Перед употреблением исходный раствор разводят в 10 раз. 7%-й раствор уксусной кислоты 1000 мл.

Ход работы. Разделяющий гель готовят смешиванием растворов А-Б-Н₂О-В в соотношении 1:2:1:4. Концентрирующий гель готовят смешиванием растворов Г-Д-Е-Ж в соотношении 1:2:1:4. В качестве маркера используют метиловый зеленый. Верхний электрод подключают к (+), нижний к (-).

Ход приготовления гелей и проведение электрофореза аналогичны описанным выше (электрофорез водорастворимых белков рН 8,7).

2.11. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-ГРУПП И -S-S-СВЯЗЕЙ В БЕЛКАХ ПРИ ПОМОЩИ 5,5'-ДИТИОБИС(2-НИТРОБЕНЗОЙНОЙ) КИСЛОТЫ

2.11.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ

Взаимодействие 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты (ДТНБК) со свободными SH-группами белков протекает при рН 8,0. В процессе этой реакции происходит освобождение тионитрофенильного аниона (ТНФА). Количество образовавшегося ТНФА прямо пропорционально количеству свободных SH-групп белков, прореагировавших с ДТНБК. Коэффициент молярной экстинкции ТНФА при 412 нм равен 11400.

Реактивы: реактив Элмана (39,6 мг ДТНБК в 10 мл 0,01М фосфатного буфера, рН 7,0); 0,2М калий-натрий-фосфатный буфер (рН 8,0).

Ход определения SH-групп в белках. В пробу (конечный объем 10 мл) вносят 3 мл белкового раствора, 2 мл 0,2М фосфатного буфера (рН 8) и 5 мл воды (проба А). Количество вносимого в пробы белка зависит от содержания в нем SH-групп. Так, при работе с очищенным препаратом моноаминоксидазы печени крысы, содержащим около 8М SH-групп/10⁵ г белка, в пробу А вносили 1-0,5 мг белка.

Из пробы А отбирают 3 мл и добавляют к ним микропипеткой 0,02 мл реактива Элмана. Пробу быстро перемешивают, при этом развивается желтая окраска. Через 2 минуты оптическую плотность проб измеряют на спектрофотометре при 412 нм. Таким образом можно определить быстрореагирующие SH-группы белка. Если в исследуемом белке имеются медленно реагирующие SH-группы, то окраска может развиваться в течение более продолжительного времени. Измерения оптической плотности производят через каждые 5 минут до тех пор, пока ее значение не будет постоянным. Измерение величины оптической плотности опытной пробы производят против контрольной пробы, в которую вместо реактива Элмана добавлено 0,02 мл воды.

Содержание тиоловых групп находят по формуле:

$$C_0 = \frac{A}{\epsilon} \cdot D,$$

где C_0 - искомая концентрация SH-групп (моль/л); A - прирост оптической плотности опытной пробы за время, достаточное для завершения реакции; ϵ - коэффициент молярной экстинкции ТНФА ($\epsilon=11400$); D - фактор разведения.

Так, например, если прирост оптической плотности после инкубации пробы с реактивом Элмана составил 0,087, то

$$C_0 = \frac{0.087}{11400} \cdot \frac{10}{3} \cdot \frac{3.02}{3}$$

$$C_0 = 2.54 \cdot 10^{-5} \text{ M.}$$

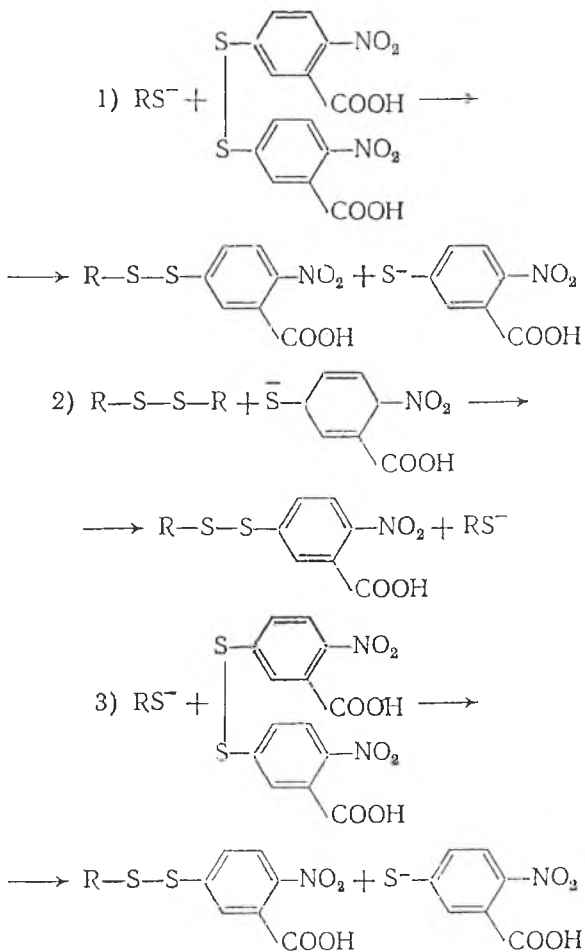
Далее проводят расчет содержания SH-групп на моль белка или, если относительная молекулярная масса белка неизвестна, на 10^5 г белка. Если в нашем случае в 1 л исследуемого раствора содержалось 0,31 г белка, то соответственно содержание SH-групп в 10^5 г белка будет равно

$$\frac{2.54 \cdot 10^{-5} \text{ M} \cdot 10^5 \text{ г}}{0.31 \text{ г}} = 8.2 \text{ M SH-групп/}10^5 \text{ г белка.}$$

При работе с нерастворимыми белками (например, суспензиями митохондрий или микросом) предварительно необходимо соллобилизировать белок. Для этого суспензию белка разводят так, чтобы в 1 мл содержалось приблизительно 2 мг белка и добавляют 25% раствор неионного детергента ОП-10 до 1% концентрации в пробе. Пробу перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 час. Присутствие в пробах более высоких концентраций детергента ОП-10 (2% и более) или 1% тритона X-100 снижает число титруемых реактивом Элмана SH-групп. Метод Элмана не рекомендуется применять: 1) при титровании замаскированных SH-групп, так как при продолжительной инкубации белка с реактивом Элмана может произойти аутоокисление последнего. В этом случае рекомендуется при составлении пробы A вводить мочевины в конечной концентрации 8 M. Для этого 4.8 г перекристаллизованной мочевины растворяют в 2 мл 0,2 M трибуфера (рН 8,0), вносят 3 мл исследуемого белкового раствора и объем пробы доводят водой до 10 мл. Далее определение проводят, как описано выше; 2) при работе с окрашенными белками, особенно с гемопротендами; 3) в тех случаях, когда для стабилизации или активации ферментов используют тиоловые соединения (например, 2-меркаптоэтанол), титрование SH-групп возможно только после удаления тиоловых соединений.

2.11.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИСУЛЬФИДНЫХ ГРУПП В БЕЛКАХ

Если в белках, кроме SH-групп, присутствуют и -S-S-группы, то ДТНБК может взаимодействовать и с последними. В этом случае реакция протекает по следующей схеме [7]:



ная проба содержит только реактив Элмана, 2-меркаптоэтанол, буфер и воду. Содержание -S-S-групп в растворе белка определяют по формуле:

$$\text{Концентрация -S-S-групп} = \frac{\text{(Концентрация ТНФА) при pH 10,5 - (Контроль)}}{2}$$

ЛИТЕРАТУРА

1. Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков // Под ред. Г.Р.Иваницкого. Л.:Наука, 1978. С.61-63.
2. Исследование белков животных тканей. Спецпрактикум по биохимии/Сост.В.И.Древаль. Куйбышев, 1978. 42с.
3. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М.:Медицина, 1983. С.37-41.
4. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815с.
5. Основы биохимии//Под ред. А.А.Анисимова. М.:Высшая школа, 1986. 551с.
6. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.:Мир, 1985. 358с.
7. Современные методы в биохимии//Под ред. В.Н.Ореховича. М.:Медицина, 1977. С.223-231, 254-257.
8. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.:Высшая школа, 1996. 335с.
9. Ступникова С.К., Токарева Т.В., Миронова И.К. Выделение и исследование белков. Саратов. Изд-во Саратов. гос.ун-та.1982. С.22-23.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	7
1.1. Разрушение клеток, тканей, органов, содержащих белки	7
1.2. Экстракция белков.....	7
1.3. Характерные свойства белков, на которых основано их разделение.....	8
1.4. Фракционирование белков	9
1.4.1. Фракционирование белков сульфатом аммония	11
1.4.2. Перекристаллизация сульфата аммония	12
1.5. Гель-фильтрация.....	13
1.5.1. Подготовка матрицы.....	16
1.5.2. Общие методические вопросы.....	17
1.5.3. Набивка колонки.....	17
1.5.4. Нанесение образца на колонку.....	18
1.5.5. Регенерация колонки.....	19
1.5.6. Выбор матрицы.....	20
1.5.7. Выбор элюента.....	21
1.6. Электрофорез белков.....	21
1.6.1. Разделение белков по размеру и заряду.....	22
1.6.2. Разделение белков по размеру с использованием до- децилсульфата натрия.....	22
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	24
2.1. Выделение казеиногена из молока.....	24
2.2. Выделение муцина из слюны.....	24
2.3. Выделение миозина из мышц.....	24
2.4. Выделение фитогемагглотинина из семян фасоли.....	26
2.4.1. Экстракция и фракционирование белков сульфатом аммония.....	26
2.4.2. Фракционирование белков ацетоном.....	27
2.5. Выделение водорастворимых белков.....	27
2.5.1. Выделение водорастворимых белков из животных тканей	27
2.5.2. Выделение водорастворимых белков из раститель- ных тканей.....	28
2.6. Количественное определение белка.....	28
2.6.1. Определение белка микробиуретовым методом.....	29
2.6.2. Определение белка по методу Лоури.....	30
2.6.3. Определение белка с помощью амидо-черного.....	31
2.6.4. Определение белка хлоропластов по методу Лоури в модификации Харти.....	32

2.7. Фракционирование водорастворимых белков методом гель-фильтрации.....	32
2.8. Обессоливание белков на сефадексе G-25.....	35
2.9. Концентрирование растворов белков.....	36
2.10. Анализ белков электрофорезом в полиакриламидном ге- ле.....	36
2.10.1. Электрофорез водорастворимых белков.....	37
2.11. Колориметрический метод определения SH -групп и SS- связей в белках при помощи 5,5' -дителиобис(2-нитробензойной) кислоты.....	39
2.11.1. Определение сульфгидрильных групп в белках.....	39
2.11.2. Определение дисульфидных групп в белках.....	41
Литература.....	44
Оглавление.....	45

Редактор Е.А.Краснова
Компьютерная верстка, макет Н.П.Баринова

ЛР № 020316 от 04.12.96. Подписано в печать 01.04.99. Формат
60x84/16. Бумага офсетная. Усл.печ.л. 2,79, уч.-изд.л. 3,0.

Тираж 80 экз., Заказ № 159

Издательство "Самарский университет", 443011, г. Самара,
ул. Акад. Павлова, 1.

УОП СамГУ, ПЛД № 67-43 от 19.02.98.