

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет  
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Розробка ефективного способу осадження білків з водних  
розчинів**

Допущена до захисту  
«\_\_»\_\_\_\_\_ 2024 р.

Кваліфікаційна робота  
студента кафедри  
Берези Олексія Івановича

Завідувач кафедри

Оцінка «\_\_\_\_\_»  
Голова ЕК \_\_\_\_\_  
«\_\_»\_\_\_\_\_ 2024 р.

Науковий керівник:  
д.б.н., проф. Божков А.І.

## АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Розробка ефективного способу осадження білків з водних розчинів».

Робота включає: 58 сторінок, використаних джерел – 56

Мета роботи: провести літературний аналіз методів селективного осадження білків з водних розчинів та підбір найефективнішого способу на прикладі яєчного білка.

Для досягнення мети було проведено літературний аналіз властивостей білків. Проаналізовано способи осадження білків з водних розчинів, визначені умови виділення білкового екстракту та проведено аналіз отриманого екстракту. Отримані результати порівнювали з отриманими раніше експериментальними даними інших дослідників.

Порівняльна характеристика різних методів може бути використана для підбору більш оптимального способу селективного осадження білків з водних розчинів за шуканими характеристиками.

**Ключові слова:** *осадження білка, стабільність білка, очищення білка, висолювання, співосадження*

## SUMMARY

Qualification work on the topic: “Development of an effective method for the precipitation of proteins from aqueous solutions”.

The work includes: 58 pages, references - 56

Purpose: to conduct a literature analysis of methods of selective precipitation of proteins from aqueous solutions and to select the most effective method.

To achieve this goal, a literature analysis of the properties of proteins was carried out. The methods of protein precipitation from aqueous solutions were analyzed, the conditions for the isolation of protein extract were determined, and the resulting extract was analyzed. The results obtained were compared with the experimental data obtained earlier by other researchers.

The comparative characterization of different methods can be used to select a more optimal method for the selective precipitation of proteins from aqueous solutions according to the desired characteristics.

**Keywords:** *protein precipitation, protein stability, protein purification, salting, co-precipitation*

## ЗМІСТ

|  |    |
|--|----|
| ВСТУП.....   | 6  |
| Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....                 | 8  |
| 1.1 Роль білків в живих організмах .....                           | 8  |
| 1.1.1 Структурні та функціональні властивості білків яєчного білка | 11 |
| 1.2 Фізичні та хімічні властивості білків .....                    | 15 |
| 1.2.1 Фізичні властивості білків.....                              | 15 |
| 1.2.2 Хімічні властивості білків .....                             | 22 |
| 1.3 Підготовка білків розведених в водному розчині .....           | 24 |
| 1.3.1 Переведення білків у розчин.....                             | 24 |
| 1.3.2 Стабілізація білків у розчині.....                           | 25 |
| 1.3.3 Очищення розчину від зайвих компонентів.....                 | 25 |
| 1.3.4 Концентрація білків в водних розчинах.....                   | 27 |
| 1.3.5 Осадження і видалення нуклеїнових кислот .....               | 28 |
| 1.4 Методи отримання білків з водних розчинів.....                 | 29 |
| 1.4.1 Класифікація основних типів селективного осадження білків.   | 30 |
| 1.4.2 Осадження з додаванням солей .....                           | 34 |
| 1.4.3 Ізоелектричне осадження.....                                 | 35 |
| 1.4.4 Фракціонування розчинником .....                             | 36 |
| 1.4.5 Денатурація температурою .....                               | 37 |
| 1.4.6 Іонообмінна хроматографія.....                               | 38 |
| 1.4.7 Афінна хроматографія .....                                   | 39 |
| 1.4.8 Діаліз.....  | 40 |
| 1.4.9. Ультрафільтрація.....                                       | 42 |
| 1.4.10. Хроматографія виключення за розміром .....                 | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.11. Електрофорез без денатурації .....                   | 43 |
| 1.4.12. Електрофорез з денатурацією .....                    | 44 |
| Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....                           | 46 |
| 2.1 Об'єкт дослідження.....                                  | 46 |
| 2.2 Отримання розчину яєчного білка.....                     | 46 |
| 2.3 Осадження білків шляхом додавання солей .....            | 47 |
| 2.4 Осадження шляхом хроматографії .....                     | 48 |
| Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....                    | 51 |
| 3.1. Оцінка методу осадження білків додаванням солей.....    | 51 |
| 3.2 Оцінка методу осадження білків шляхом хроматографії..... | 52 |
| ВИСНОВКИ.....  | 53 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                              | 54 |

## ВСТУП

Природні білкові структури мають специфічну і чітко визначену просторову організацію при фізіологічних значеннях температури і рН, а також ряд характерних фізико-хімічних і біологічних властивостей [1].

Селективне осадження білків - це сукупність методів отримання чистих препаратів специфічних білків зі складних сумішей, таких як клітинні екстракти [2]. Різні білки можна розділити завдяки відмінностям в їх властивостях, різниці молекулярної маси, розміру молекул, специфічності зв'язування з певними речовинами, розчинності і іонному заряду, які змінюються залежно від температури, рН, іонної сили та кофакторів розчину та середовища. Осадження і подальше очищення білків необхідне для проведення аналізу їхніх властивостей і функцій, а також для промислового, медичного та лабораторного використання [3].

Білок курячого яйця містить сотні білків і широко використовується в харчовій, біологічній та фармацевтичній промисловості [4]. Тому у цій роботі розглянемо, обговоримо і проаналізуємо методи виведення та осадження білків на прикладі яєчного білка, про які повідомлялося за останнє десятиліття, щоб забезпечити основу для подальших досліджень білків яєчного білка в майбутньому.

Метою роботи було провести літературний аналіз методів селективного осадження білків з водних розчинів, порівняльняти найпоширеніші та розібрати ефективніший спосіб на основі наявних методологій.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні задачі:

1. Провести літературний аналіз щодо властивостей білків.

2. Розглянути фактори, які вплинуть на процес осадження.
3. Проаналізувати на прикладі доступних робіт, способи отримання білкових екстрактів.
4. Проаналізувати методи, які використовують для селективного осадження та змоделювати теоретичний експеримент з використанням найпоширеніших методів.

## Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Роль білків в живих організмах

Білки (білки, поліпептиди) — це високомолекулярні органічні речовини, в основі яких лежать, з'єднані пептидними зв'язками альфа-амінокислоти [5]. Амінокислотний склад білків зумовлюється генетичним кодом, де в при синтезі використовується в основному 20 стандартних амінокислот [6]. Велика різноманітність властивостей білкових молекул визначається безліччю варіацій поєднань амінокислот. Також, амінокислотні залишки в білку в більшості випадків піддаються посттрансляційним модифікаціям, які можуть неодноразово статися на будь-якому етапі життєвого циклу білка. В комбінації з іншими білками та/або з іншими органічними речовинами, на кшталт вуглеводів та ліпідів, може утворювати комплекси з новими функціями [7].

Разом з іншими біологічними макромолекулами: полісахаридами, ліпідами та нуклеїновими кислотами, білки забезпечують життєдіяльність клітини, являються невід'ємними компонентами всіх живих організмів та виконують безліч функцій в залежності від типу та властивостей білків [8].

Основні типи білків можна класифікувати за функціями в організмі:

Структурні білки забезпечують форму клітинам і багатьом органам та беруть участь у зміні цієї форми для амортизації, являються основними складовими цитоскелету [9]. Більшість структурних білків є ниткоподібними: наприклад, мономери актину і тубуліну є глобулярними розчинними білками, але після полімеризації вони утворюють довгі нитки, які формують цитоскелет і дозволяють клітині підтримувати свою форму [10]. Колаген та еластин є основними складовими міжклітинного матеріалу сполучної тканини (наприклад, хрящів), тоді як інший структурний білок, кератин, формує волосся, нігті, пташине пір'я та раковини молюсків.

Існує кілька типів захисних функцій білків, а саме: фізична, хімічна та імунна складова захисту.

Фізичний захист організму забезпечується завдяки колагену, білку, який лежить в основі міжклітинного матеріалу сполучних тканин, включаючи кістки, хрящі, сухожилля і глибокі шари шкіри (дерму); і кератину, який лежить в основі рогової оболонки, волосся, пір'я, рогів та інших епідермальних утворень. Ці білки зазвичай класифікують як такі, що виконують структурну функцію.

Хімічний захист, що відбувається шляхом зв'язування токсинів з білковими молекулами, що пришвидшує процес детоксикації. Ферменти печінки відіграють особливо важливу роль у детоксикації людини, розщеплюючи отрути або переводячи їх у розчинну форму, що сприяє їх швидкому виведенню з організму[11].

Імунний захист забезпечується білками в крові та інших біологічних рідинах, які беруть участь у захисній реакції організму на пошкодження та поширення патогенів [12]. Білки системи комплементу та антитіла (імуноглобуліни) належать до другої групи білків; вони нейтралізують бактерії, віруси або чужорідні білки. Антитіла, які є частиною адаптивної імунної системи, приєднуються до чужорідних для організму речовин, антигенів, і таким чином нейтралізують їх, спрямовуючи на знищення. Антитіла можуть виділятися у внутрішньоклітинний простір або фіксуватися на мембранах [13].

Транспортна функція білків забезпечується фізичними властивостями середовища в якому розчинні білки. Вони беруть участь у транспорті малих молекул, при тому, що мають високу спорідненість до субстрату при високих концентраціях і легко вивільняють транспортовані молекули при низьких концентраціях субстрату [14].

Деякі мембранні білки беруть участь у транспорті малих молекул через клітинну мембрану, змінюючи її проникність. Ліпідний компонент мембрани є водостійким (гідрофобним), перешкоджаючи дифузії полярних або заряджених (іонних) молекул. Мембранні білки-переносники зазвичай поділяються на білки-канали та білки-переносники. Канальні білки містять

внутрішні пори, заповнені водою, які дозволяють іонам (через іонні канали) або молекулам води (через білки аквапорини) рухатися через мембрану. Багато іонних каналів спеціалізовані для перенесення лише одного іона, наприклад, калієві та натрієві канали часто розрізняють ці схожі іони і пропускають лише один з них [15]. Білки-переносники, як і ферменти, зв'язують кожен молекулу або іон, що транспортується, і, на відміну від каналів, здатні здійснювати активний транспорт, використовуючи енергію АТФ [16].

Запасна (резервна) функція: так звані резервні білки, які зберігаються як джерело енергії та матеріалів у насінні рослин та яйцеклітинах тварин [17]. Попередники біологічно активних речовин (БАР), що регулюють обмінні процеси в організмах, представлені рядом інших білків і використовуються в організмі як джерело амінокислот.

Рецепторна функція: рецептори, білкового походження, можуть бути розташовані в цитоплазмі або вбудовані в мембрани клітин [18]. Частина молекули рецептора сприймає сигнал, зазвичай хімічний, але в деяких випадках також світло, механічні впливи (наприклад, розтягнення) та інші подразники. Коли сигнал впливає на певну частину молекули, білок рецептора, його конфігурація змінюється. Це змінює конформацію іншої частини молекули, передаючи сигнал іншим компонентам клітини. Існує кілька механізмів передачі сигналу. Одні рецептори каталізують певну хімічну реакцію, інші слугують іонними каналами, які відкриваються або закриваються при отриманні сигналу, а треті зв'язують певні внутрішньоклітинні проміжні продукти. У випадку мембранних рецепторів частина молекули, яка зв'язується з сигнальною молекулою, розташована на поверхні клітини, тоді як ділянка, що передає сигнал, знаходиться всередині клітини.

Моторна (рухова) функція, що забезпечується цілим класом моторних білків, які виконують скорочення м'язів, включаючи локомоцію (міозин), рух клітин всередині організму (рух амебоїдних лейкоцитів), рух

війок і джгутиків, а також активний і спрямований внутрішньоклітинний транспорт (кінезин, динеїн). Дінеїни та кінезини транспортують молекули вздовж мікротрубочок, використовуючи гідроліз АТФ як джерело енергії. Дінеїни відповідальні за рух війок і джгутиків еукаріотів, а також, переносять молекули та органоїди з периферійних частин клітини до центросоми, де кінезини транспортують у зворотному напрямку [19]. Цитоплазматичні варіанти міозину можуть брати участь у транспорті молекул та органоїдів через мікрофіламенти.

Сигнальна функція, або здатність білків діяти як сигнальні засоби, передаючи сигнали між клітинами, тканинами, органами та організмами. Сигнальна функція часто поєднується з регуляторною функцією, оскільки багато внутрішньоклітинних регуляторних білків також передають специфічні сигнали [20]. Виконується білками-гормонами, цитокінами, факторами росту тощо.

Більшість тваринних гормонів є білками або пептидами. Вони переносяться кров'ю, і момент зв'язування гормону з рецептором є сигналом, який запускає клітинну відповідь. Гормони регулюють концентрацію крові та клітин, ріст, розмноження та інші процеси [21].

Також, за допомогою сигнальних білків, які переносяться міжклітинною рідиною завдяки цитокінам та факторам росту, виконується міжклітинна взаємодія, визначається виживання клітин, стимуляція або пригнічення росту, диференціація, функціональна активність і апоптоз, а також координується робота імунної, ендокринної та нервової систем.

### **1.1.1 Структурні та функціональні властивості білків яєчного білка**

Білки яєчного білка мають високу функціональну активність [22]. Передумовою для використання функціональної активності білків є їх виділення та очищення. Розуміння структурних відмінностей між різними білками є основою для виділення білків і вибору відповідних методів.

Функціональні властивості основних білків яєчного білка коротко описані нижче, а їх основні характеристики (загальний відсоток білка, молекулярна маса (MW) та ізоелектрична точка (pI)) наведені в таблиці (табл 1) [23].

**Таблиця 1**

Відсоток загального білка, молекулярна маса (MW) і ізоелектрична точка (pI) основних яєчних білків.

| Білок            | Відсоток загального білка | MW                     | pI      |
|------------------|---------------------------|------------------------|---------|
| Овальбумін       | 54                        | 45                     | 4.5     |
| Овотрансферин    | 12-13                     | 77                     | 6.0     |
| Овомукоїд        | 11                        | 28                     | 4.1     |
| Лізоцим          | 3.4-3.5                   | 14.3                   | 10.7    |
| Овомуцин         | 1.5-3.5                   | $0.22-270 \times 10^3$ | 4.5-5.0 |
| Овомакроглобулін | 0.5                       | $7.6-9.0 \times 10^2$  | 4.5-4.7 |
| Авідин           | 0.05                      | 68.3                   | 10.0    |

Овальбумін - найпоширеніший білок в яєчному білку і становить приблизно 54% від загальної кількості білків. Овальбумін має молекулярну масу 45 000 Да і складається з одного ланцюга з 385 амінокислот зі 105 титруємими залишками [24]. Являється сумішшю трьох компонентів (A1, A2 і A3, співвідношення яких становить 85:12:3) з дещо відмінними електричними властивостями.

Овотрансферин, також відомий як кональбумін, є залізовв'язуючим глікопротеїном, який містить 0,8% манози і не містить галактози та кремнієвої кислоти. Овотрансферин становить приблизно 12-13% яєчного білка і складається з 686 амінокислот [25]. Кожна молекула має два лігандні центри в міжмолекулярному просторі кожної сфери. Ці два лігандні центри можуть зв'язувати іони металів, таких як залізо, мідь або цинк. Комплекс заліза та овотрансферину є стійким до гідролізу та термічної денатурації.

Коли овотрансферин зв'язується з  $Fe^{3+}$ , він має червонуватий колір з максимумом поглинання близько 465 нм; коли зв'язується з  $Cu^{2+}$ , він має

жовтий колір з максимумом поглинання при 440 нм; а коли утворює комплекс з  $Zn^{2+}$ , температура термічної денатурації підвищується і стійкість до протеолітичних ферментів і різних денатураційних обробок покращується.[26].

Овомукоїд - це глікопротеїн, що містить алюмінат кремнію, близько 4,5% манози і близько 1,5% галактози, має дев'ять дисульфідних зв'язків і не має вільних сульфгідрильних груп [27]. Дисульфідні зв'язки відіграють важливу роль у фізіологічній активності. Структура овомукоїда складається з трьох доменів, I, II і III, з яких домен II інгібує трипсин. Інгібуюча активність втрачається при розриві дисульфідних зв'язків і відновлюється при повторному окисленні. Овомукоїд є дуже термічно стабільним, також трипсинова інгібіторна активність відносно стабільна при нагріванні нижче рН 7.

Лізоцим - типовий білок лужної природи, широко доступний в природі і його основними джерелами є слина, сльози, слиз, грудне молоко та яєчний білок, серед яких лізоцим з яєчного білку був найбільш вивченим через його легку доступність, низьку вартість та високий вміст речовини [28]. Має невелику молекулярну масу (14,3 кДа), що складається з 129 амінокислотних залишків та ізoeлектричну точку 10,7, яка чітко відрізняється від яєчного білку і вважається важливою відправною точкою при виборі методу виділення лізоцимів[29]. Загалом, методи осадження та катіонний обмін в ізoeлектричній точці є ефективними для відокремлення лізоцимів від інших матеріалів. Також має високу термостабільність і кислотостійкість. Структура дисульфідних зв'язків частково відповідає за підтримання термостабільності лізоциму [30]. У природі лізоцим існує переважно як мономер; зміни рН, концентрації та/або температури можуть призвести до фазових змін, що призводить до оборотного утворення димерів. Димерна форма лізоциму має терапевтичні, протівірусні та протизапальні властивості.

Овомуцин - це глікопротеїн, що складається з альфа-субодиниці (220 кДа, 10-15% вуглеводів) і бета-субодиниці (400 кДа, 50-65% вуглеводів), з'єднаних дисульфідними зв'язками, більш ніж на 30% глікозилізований, має високу молекулярну масу і високу в'язкість. Ці властивості, а також зв'язування з лізоцимами і глобулінами, надають овомуцинам чудову піноутворюючу здатність і стабільність піни. Порівняно з бичачим сироватковим альбуміном, має набагато вищу піноутворюючу здатність і часто додається до білків як стабілізатор піни для виробництва продуктів з бажаною піноутворюючою здатністю [31]. Дослідження також показали, що овомуцини мають антибактеріальні, противірусні, протиракові та макрофагостимулюючі властивості.

Овомакроглобулін - це другий за молекулярною масою яєчний глікопротеїн після овальбуміну. Овомакроглобулін складається з чотирьох субодиниць з однаковою молекулярною масою (приблизно 175 кДа за даними SDS-PAGE), дві з яких з'єднані дисульфідними зв'язками [32]. Дослідження показали, що овомакроглобулін має різноманітну біологічну активність, включаючи антибактеріальну, протизапальну, лікування кератитів та інгібування згортання крові [33]. Також низький вміст глобуліну в яйцях (0,5%), є загальноживаним інгібітором протеази [34].

Авідин - це найпростіший глікопротеїн, що містить незначну кількість (0,05%) білка. Авідин - тетрамерний білок, що складається з чотирьох субодиниць ідентичного складу та амінокислотної послідовності (15,6 кДа, 128 амінокислот на субодиницю), кожна з яких зв'язує біотин з високою афінністю та специфічністю [35]. У той час як авідин необоротно денатурується при 70°C, комплекс авідин-біотин стабільний при 100°C. Для руйнування комплексу авідин-біотин необхідне нагрівання при 120°C протягом 15 хвилин. Висока спорідненість авідину до біотину широко використовується в молекулярній біології, молекулярному розпізнаванні та маркуванні, імуноферментному аналізі (ІФА), гістохімії та цитохімії [36,37].

## **1.2 Фізичні та хімічні властивості білків**

Зазвичай білки - це поліпептиди, тобто лінійні полімери, що можуть мати більш складну форму – фібрилярну або глобулярну. Пептидами називаються невеликі білкові молекули, які мають лінійну форму. Послідовність амінокислот, типи їх поєднання, форма та властивості певного білка визначається відповідним геном і закодовані в генетичному коді, при тому, що в залежності від факторів середовища, можуть проявлятися модифікації. Генетичний код більшості організмів описує синтез 20 «незамінних» амінокислот, їхня комбінація може утворювати широкий спектр білків з різноманітними властивостями. Амінокислоти в білках часто зазнають посттрансляційних модифікацій, під впливом різних біотичних та абіотичних факторів, які можуть пойти як до дозрівання білка в функціональну одиницю, так і під час функціональної зрілості в клітині. Для виконання певних функцій білки можуть працювати разом, часто об'єднуючись у великі, стабільні комплекси [38].

### **1.2.1 Фізичні властивості білків**

#### **1. Колір і смак**

Білки безбарвні і зазвичай не мають смаку. Вони однорідні та кристалічні.

#### **2. Форма та розмір**

За формою білки варіюються від простих кристалоїдних сферичних структур до довгих фібрилярних структур.

Розрізняють два різних типи форми, що були визнані:

- a) Глобулярні білки - вони мають сферичну форму і зустрічаються переважно в рослинах, особливо в насінні та клітинах листя. Це пучки, утворені шляхом згортання та зминання білкових ланцюгів, наприклад, пепсин, едестин, інсулін, рибонуклеаза тощо.

б) Фібрилярні білки - мають ниткоподібну або еліпсоїдну форму і зазвичай зустрічаються в м'язах тварин. Більшість досліджень щодо структури білків були проведені з використанням цих білків, наприклад, фібриногену, міозину тощо.

### 3. Молекулярна маса

Білки, як правило, мають велику молекулярну масу в межах від  $5 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$ . Можна відзначити, що значення молекулярної маси багатьох білків близькі або кратні 35 000 і 70 000.

### 4. Колоїдна природа

Через свої гігантські розміри білки мають багато колоїдних властивостей, наприклад, швидкість їхньої дифузії надзвичайно низька, і вони можуть спричиняти значне розсіювання світла в розчині, що призводить до видимого помутніння (ефект Тіндалла) [39].

### 5. Оптична активність

Всі білкові розчини повертають площину поляризованого світла вліво, тобто є левітаторами.

### 6. Денатурація

Денатурація - це зміна властивостей білка. Іншими словами, це втрата біологічної активності. У багатьох випадках процес денатурації супроводжується коагуляцією - процесом, в якому денатуровані білкові молекули мають тенденцію до утворення великих агрегатів і випадання в осад з розчину [40].

Вторинна і третинна структура білків визначається слабкими зв'язками [41]. Коли вони розриваються, ці структури зникають. Такий білок називається денатурованим, а молекула стає неупорядкованою і схожою на «статичну кульку». Якщо денатурат не надто сильний, молекула може не повністю втратити свою структуру. Зазвичай денатурація незворотна, але в деяких випадках вона може бути оборотною, тобто видалення денатуратора може призвести до «ренатурації» білка. Денатурація зазвичай супроводжується осадженням білка, а молекули

набувають здатності утворювати агрегати, нерозчинні в розчині. Денатурація зазвичай призводить до втрати білками своїх біологічних властивостей, наприклад, ферментативної активності [42].

Основними денатураторами є:

- a) Підвищена температура, яка розриває водневі та гідрофобні зв'язки;
- b) Кислоти та луги, які збільшують заряд і дестабілізують загальну структуру, особливо впливаючи на електростатичні зв'язки,
- c) Органічні розчинники мають значний вплив на гідрофобні зв'язки. Однак при низьких температурах вони не можуть мати денатуруючий ефект;
- d) Сечовина і гуанідин утворюють велику кількість водневих зв'язків з білком, порушуючи його структуру. Однак, якщо ці агенти видалити, білкова молекула зазвичай відновлюється.

Денатурація не розриває ковалентних зв'язків, але радикали, раніше захищені глибоко всередині молекули, можуть стати доступними для розчинників і різних реагентів.

Наприклад, білки можуть утворювати колоїдні розчини у воді завдяки заряду (спричиненому зарядженими амінокислотними залишками) і зв'язуванню води з полярними гідрофільними амінокислотними залишками. Білки осаджуються шляхом видалення води і нейтралізації заряду (етанол, формальдегід, солі важких металів, розчини кислот, лугів, солей, трихлороцтової і сульфосаліцилової кислот, нагрівання). Солі, такі як сульфат амонію, розривають іонні зв'язки, які легко відновлюються, спирт і ацетон видаляють воду, що призводить до випадання осаду, але коли ці фактори усуваються, білки відновлюють свою розчинність. Сильні фактори призводять до незворотного випадання в осад - денатурації, внаслідок чого порушується просторова структура (третинна і вторинна) і життєво важливі (природні) функції білків. Ланцюг денатурованих білків розвертається, виявляючи приховані групи, які легко відокремлюються.

## 7. Амфотерна природа

Як і амінокислоти, білки є амфотерними, тобто діють як кислоти та основи. Вони мігрують в електричному полі, і напрямок міграції залежить від чистого заряду, який має молекула. На величину заряду впливає значення рН. Кожен білок має фіксоване значення ізоелектричної точки ( $pI$ ), при якому він буде рухатися в електричному полі.

Групи  $NH_2$  і  $COOH$ , за винятком тих, що належать до кінцевих амінокислот, не роблять внеску в загальний заряд білка, оскільки вони входять до складу пептидних зв'язків і втрачають свій заряд у процесі синтезу. Заряд білка визначається дистальними групами полярних амінокислот, як кислих (Glu, Asp, Tyr), так і основних (Lys, Arg, Gys).

Залежно від амінокислотного складу білки можуть бути кислими (численні амінокислотні залишки глутаміну та аспарагіну), основними (численні залишки лізину, аргініну та гістидину) або нерозчинними (численні гідрофобні амінокислотні залишки) [43]. У лужному середовищі білок поводить себе як поліаніон, його загальний заряд негативний, і коли розчинений у лужному буфері білок поміщають в електричне поле, він мігрує до анода. І навпаки, в кислому середовищі білок поводить себе як катіон, його заряд позитивний і в електричному полі він мігрує до катіона.

При певному середньому значенні рН сума зарядів дорівнює нулю; як і у випадку з амінокислотами, це значення рН називається ізоелектричною точкою. Ізоелектрична точка білків змінюється від  $pI=1$  (пепсин) до  $pI=10$  (гістон). Для більшості білків  $pI$  знаходиться у вужчому діапазоні, між 4 і 7.

Ця властивість була використана Тіселіусом, який у 1937 році запропонував електрофорез - новий метод аналізу білкових сумішей.

На дно U-подібної пробірки наливають буфер, тобто розчин білка з певним значенням рН, два кінці пробірки заповнюють тим же буфером і вставляють електроди [44]. Коли електрофорез проводиться в лужному розчині, всі білки заряджаються негативно і починають мігрувати до

анода. Швидкість міграції білків (електрофоретична рухливість) залежить від рН білків і величини загального заряду при даному рН буфера. Тому різні білки будуть мігрувати з різною швидкістю і відокремлюватися один від одного. Межі між білками можна відстежувати за допомогою оптичної системи, яка виявляє зміни показника заломлення [45].

Метод електрофорезу в рідких середовищах виявився дуже складним, тому Тісселіус запропонував ідею твердого носія (спочатку паперу). Пізніше були використані інші типи носіїв, такі як крохмальні гелі, поліакриламідні гелі та ацетат целюлози, що в принципі дозволило краще відокремлювати білки від паперу. Ця техніка називається зонним електрофорезом.

#### 8. Здатність зв'язувати іони

Білки можуть утворювати солі як з катіонами, так і з аніонами, залежно від їхнього заряду.

#### 9. Розчинність

Більшість білків розчинні у воді та водних розчинах. Розчинність залежить від структури білкової молекули та іонного складу середовища, особливо від іонної сили та рН. Розчинність найнижча в ізоелектричній точці і зростає зі збільшенням кислотності або лужності. Це пояснюється тим, що коли білкові молекули існують у вигляді катіонів або аніонів, сили відштовхування між іонами великі, оскільки всі молекули мають надлишкові заряди одного знаку. Таким чином, вони будуть більш розчинними, ніж в ізоелектричному стані.

#### 10. Іонна сила

Іонна сила ( $\mu$ ) іонізованого розчину солі дорівнює половині суми концентрації кожного іона, помноженої на квадрат його валентності (тобто заряду):

$$\mu = \frac{1}{2} \sum cZ^2$$

де,  $c$  – концентрація кожного з іонів;

$Z$  – електричний заряд іона (електровалентність).

При низькій іонній силі іони (особливо однозарядні іони) нейтралізують заряджені групи білків, чим сприяють розчинності білків. Наприклад, деякі білки не розчиняються у воді, але розчиняються в розведених розчинах хлориду натрію. При високій іонній силі іони мають протилежний ефект - сприяють осадженню білків. Це виглядає так, ніби білки та іони конкурують один з одним за молекули води. Це і є явище засолення. Взаємозв'язок між розчинністю білків та іонною силою показано в наступному рівнянні:

$$\lg S = \beta - K'\mu$$

де,  $S$  – розчинність білка;

$\mu$  – іонна сила середовища;

$\beta$  – константа, залежна від природи білка і середовища;

$K'$  – константа висолювання.

У напівлогарифмічній області крива розчинності являє собою пряму лінію, специфічну для кожного білка.

Залежність між розчинністю і рН зазвичай представлена U-подібною кривою з мінімумом в ізоелектричній точці. При рН сили відштовхування між білковими молекулами нижчі, що підвищує ймовірність утворення агрегатів і преципітатів.

## 11. Антигенні властивості

Коли білок, виділений з тканин однієї тварини, потрапляє в кров іншої, в певних клітинах останньої синтезуються певні білки, які потрапляють в кров і вступають в контакт з антигеном (тобто введеним препаратом), пригнічуючи його можливу токсичну дію. Ці білки, які з'являються в організмі тварини у відповідь на чужорідну речовину, називаються антитілами.

Вони допомагають нам зрозуміти, чому хвороби, викликані певними бактеріями або вірусами, не виникають двічі в однієї людини, а також механізми вакцинації та сироваткової терапії. Вони також пояснюють

відторгнення пересаджених тканин. Коли антигени і відповідні їм антитіла змішуються в певному співвідношенні, ми можемо спостерігати утворення преципітату. Це явище (преципітація) лежить в основі найбільш широко використовуваного білкового аналізу, який базується на взаємодії між антигенами і антитілами [46].

Імунологічні реакції давно виявили, що білки, які вважаються ідентичними у всіх видів тварин, насправді мають міжвидові відмінності у своїй структурі. Розшифровка основної структури кожного білка підтверджує, що міжвидові відмінності існують. Однак, якщо антитіло, утворене у відповідь на ін'єкцію чужорідного білка А, додати до подібного за структурою білка А', можна спостерігати осад, хоча спорідненість антитіла до білка А' набагато слабша, ніж до білка А. Це відомо як перехресна реакція. Вона відбувається, коли А і А' є подібними білками дуже близьких видів (людини і мавп, а також споріднених бактерій).

Підсумовуючи, можна сказати, що реакція антитіло-антиген між сироваткою і білком *in vitro* відбувається, коли виконуються наступні умови:

- a) тварині, від якої була отримана сироватка, вводять той самий або дуже схожий білок;
- b) введений білок є чужорідним для тварини.

Частина білка, яка безпосередньо бере участь в утворенні комплексів з антитілами, називається антигенною детермінантою. Антигенні детермінанти реагують зі специфічними ділянками антитіл (не менше двох однакових ділянок на молекулу), і їх взаємодія заснована на принципі комплементарності конформації двох взаємодіючих молекул. Обов'язковою умовою взаємодії є те, що структура обох білків повинна бути непорушною: якщо хоча б один з двох білків денатурований, реакція антиген-антитіло не відбудеться. Асоціація антигену з антитілом є слабкою і здійснюється за рахунок нековалентних зв'язків.

### 1.2.2 Хімічні властивості білків

Всі білки можна розділити на дві великі категорії на основі хімічної структури їх складових частин: Прості білки, тобто білки, що складаються лише з амінокислотних залишків, і складні білки, тобто білки, що складаються з простого білка і пов'язаних з ним небілкових сполук.

Нижче наведено перелік реакцій, які можуть відбуватися з білками в водних розчинах:

#### 1. Гідроліз

Білки гідролізуються різними гідролітичними агентами:

a) Кислотні агенти: При гідролізі білків концентрованою соляною кислотою (6-12N) при 100-110°C протягом 6-20 годин утворюються амінокислоти у вигляді їх гідрохлоридів.

b) Лужні агенти: Білки також можна гідролізувати 2N NaOH.

#### 2. Реакції за участю групи COOH:

a) Реакція з лугами (утворення солей)

b) Реакція зі спиртами (етерифікація)

c) Реакція з амінами

#### 3. Реакції за участю групи NH<sub>2</sub>

a) Реакція з мінеральними кислотами (утворення солей): Коли вільні амінокислоти або білки обробляються мінеральними кислотами, такими як HCl, утворюються кислі солі.

b) Реакція з формальдегідом: гідрокси-метильні похідні утворюються з формальдегідом.

c) Реакція з бензальдегідом: утворюються основи Шиффа

d) Реакція з азотною кислотою (реакція Ван-Слайка): Амінокислоти реагують з HNO<sub>2</sub> з виділенням газу N<sub>2</sub> і утворенням відповідних α-гідроксикислот.

e) Реакція з ацилюючими агентами (ацилювання)

f) Реакція з FDNB або реактивом Сенгера

g) Реакція з данзилхлоридом

4. Реакції за участю груп COOH та NH<sub>2</sub>
  - a) Реакція з трикетогідрином дигідратом (нінгідринова реакція)
  - b) Реакція з фенілізоціанатом: З фенілізоціанатом утворюється гідантоєва кислота, яка, в свою чергу, може бути перетворена в гідантоїн.
  - c) Реакція з фенілізотіоціанатом або реактивом Едмана
  - d) Реакція з фосгеном: З фосгеном утворюється N-карбоний ангідрид
  - e) Реакція з сірковуглецем: 2-тіо-5-тіосолідон утворюється з сірковуглецем
5. Реакції за участю R-групи або бічного ланцюга
  - a) Біуретова проба
  - b) Ксантопротеїновий тест
  - c) Проба Міллона
  - d) Фоліновий тест
  - e) Проба Сакагуті
  - f) Проба Паулі
  - g) Проба Г. Ерліха
6. Реакції за участю SH-групи
  - a) Нітропруссидна проба: Червоне забарвлення з'являється з нітропруссидом натрію в розведеному NH<sub>4</sub>OH. Тест специфічний для цистеїну.
  - b) Тест Саллівана: Цистеїн забарвлюється в червоний колір у присутності 1,2-нафтохінон-4-сульфонату і гідросульфїту натрію.

### **1.3 Підготовка білків розведених в водному розчині**

Селективне осадження білків із сирих зразків, таких як рослинні, тваринні або людські матеріали, вимагає очищення сирих зразків, якщо вони містять тверді частинки, які не можуть бути центрифуговані або відфільтровані звичайними засобами.

#### **1.3.1 Переведення білків у розчин**

Після того, як джерело білка вибрано, першим кроком очищення є поміщення його в розчин, що не є обов'язковим при виділенні білків з біологічних рідин, таких як плазма. Існує кілька способів руйнування клітинної мембрани для вивільнення цитозолу, і вибір залежить від механічних властивостей і місця розташування джерела білка.

Найпростішим і найбезпечнішим способом переміщення цитозольних білків у розчин є осмотичний лізис [47], який полягає в тому, що клітини поміщають у середовище з низьким тиском, де під дією осмотичного тиску вони розширюються і згортаються. Цей метод можна використовувати для тваринних клітин, які не мають клітинних стінок, але він рідко буває ефективним для рослинних, бактеріальних і грибкових клітин. Клітинні стінки бактерій зазвичай руйнуються лізоцимом, а також можуть бути зруйновані за допомогою ультразвукової обробки (сокації). У розчинах для лізису зазвичай використовують миючі засоби (Тритон X-100, Тергітол НП-40 тощо) або органічні розчинники (ацетон, толуол), якщо вони не спричиняють бажаної денатурації білків.

Зразки клітин і тканин також можна гомогенізувати за допомогою циклів заморожування/відтавання, піску або скляних кульок, високошвидкісних блендерів, гомогенізаторів (що складаються зі скляних або тефлонових поршнів, які механічно або вручну вставляються в гільзи) і французьких пресів для культури клітин (які руйнують клітини, продавлюючи їх через маленькі отвори під високим тиском).

### **1.3.2 Стабілізація білків у розчині**

Білки, вилучені з природного середовища, можуть руйнуватися під впливом різних факторів. Зокрема, білки денатуруються під впливом зміни рН, тому розчини, що використовуються для лізису і подальших етапів очищення, повинні мати буферну систему, яка може підтримувати рівень водню на рівні, що забезпечує стабільність необхідних молекул.

Більшість білків повільно денатурують при температурі вище 25°C. З цієї причини всі процедури зазвичай проводять у холодному середовищі, при температурі від 0 до 4°C (на льоду). Деякі білки залишаються стабільними поза живими клітинами лише при температурі нижче -100°C. З іншого боку, існують також білки, чутливі до холоду, і їх не можна охолоджувати до низьких температур.

Під час лізису клітин вивільняються протеази – це високоспецифічні ферменти, які гідролізують білки [48]. Протеази можуть продукувати деградацію або незворотню денатурацію потрібного білка. Клітинні екстракти зберігають при рН, який інактивує ці ферменти, але часто використовують хімічні інгібітори протеаз, такі як PMSF. Одним з джерел деградації та перешкоджання осадженню білків являються мікроорганізми та гриби, тому для тривалого зберігання рекомендовано додавати до розчинів білків невеликі кількості токсичних сполук (наприклад, азид натрію), що підібрані так, щоб не викликати безпосередньо денатурації білка.

Більшість білків втрачають стабільність на межі розділу рідина-повітря, де при низьких концентраціях поверхнева адсорбція викликає значну втрату матеріалу в вигляді молекул. Через це необхідно зменшити можливість адсорбування білку на поверхнях, шляхом ізоляції.

### **1.3.3 Очищення розчину від зайвих компонентів.**

Іноді суспензії можна очистити фільтруванням через 2-4-міліметровий шар допоміжного матеріалу на фільтрувальному папері.

Існує кілька видів фільтруючих матеріалів для твердих і желатинових зразків, наприклад, целюлозні волокна, діатомові мінерали (кізельгур або діатомові землі), силікати, спеціалізовані глинисті абсорбенти, кальцієві мінерали, бентоніт або земля Фуллера. З ними слід провести експеримент, наприклад, додаючи 0,05-0,2 г матеріалу до 1-2 мл зразка, щоб з'ясувати, який фільтруючий засіб адсорбує желатинові або тверді частинки без надмірної адсорбції білка. Шар або подушечку наповнювача для використання з основним зразком готують, додаючи кілька грамів на фільтрувальний папір і рівномірно розподіляючи його, змочуючи водою при помірному відсмоктуванні на лійці Бюхнера.

Часто спосіб звільнення білків у розчині від частинок і осаду шляхом центрифугування або простої фільтрації можна швидко розробити, змінивши рН або вміст солі (або і того, і іншого). Рівень рН можна змінювати в бік збільшення або зменшення на одну-три одиниці; крім того, можна додавати сіль, щоб полегшити центрифугування або фільтрування частинок і колоїдного матеріалу. Аналіз на біологічну активність слід проводити ще на стадії уточнення, щоб переконатися, що зміни рН і додавання солі не зруйнували активність або функції білків, які необхідно виділити. Якщо консервативні методи очищення (наповнювачі та зміна рН/солі) не спрацьовують, можна застосувати більш агресивні методи, які використовують досить потужні агломератори частинок і колоїдів, такі як синтетичні поліелектроліти або метало-іонні агломератори, такі як іони алюмінію. Їх потрібно додавати в досить обмежених кількостях (від мікрограмів до декількох міліграмів на мілілітр зразка), обережно і повільно, щоб коагулювати небажані частинки без осадження шуканих білків на цій стадії попереднього очищення.

Перевага іонів металів як коагулянтів частинок або допоміжних засобів для фільтрації полягає в тому, що будь-який надлишок іонів металів можна легко видалити за допомогою звичайних катіоно-обмінних смол у формі  $K^+$ ,  $Na^+$  або  $NH_4^+$ .

Небажані частинки, такі як цілі клітини, клітинні мембрани і димок, також можна видалити шляхом центрифугування в деяких зразках. Однак для дуже великих об'ємів (і якщо центрифугування не є успішним) часто корисною є фільтрація з використанням фільтруючих сполук. Ультрафільтрація на мембранах під тиском з великою MWCO (>30000) може бути застосована, якщо такі мембрани пропускають шукані білки і затримують частинки туману.

#### **1.3.4 Концентрація білків в водних розчинах**

Дуже розбавлені зразки, недоступні для звичайних осаджувачів білків, можуть потребувати концентрування перед додаванням осаджувачів. Ліофілізація (сублімаційне сушіння) іноді є успішним методом концентрування певних білків, які здатні витримувати видалення практично всієї води. Однак більшість білків, включаючи білки каскаду згортання крові та багато білків плазми і цитозолу крові, не витримують ліофілізації. Тому для концентрування шуканих білків краще використовувати мембранну ультрафільтрацію під тиском з мембраною з відповідним MWCO, обережно зберігаючи їх у розчині [49].

Часто краще не переконцентрувати - тобто не намагатися видалити майже всю воду, а довести концентрацію шуканих білків до 1-2% вагової концентрації - перед осадженням. Небажані матеріали, такі як залишки клітин, полісахариди, глікопротеїни та ліпопротеїни, можуть випасти в осад раніше, змішатися з потрібними білками або іншим чином ускладнити роботу з ними при надмірній концентрації. У деяких випадках, можливо, найкращим вибором буде розведення зразків буфером, який також може змістити рН, а потім виконання етапу концентрування. Загальний початковий діапазон бажаної концентрації білка (без помутнінь) становить від 0,01% до 2%.

### 1.3.5 Осадження і видалення нуклеїнових кислот

Ще одним фактором, що може вплинути на підготовку сировини є те, що клітинні цитозолі, особливо бактерій і дріжджів, можуть бути обтяжені нуклеїновими кислотами (РНК і ДНК). Нуклеїнові кислоти можуть заважати виділенню білків і сприяти утворенню каламуті та колоїдного характеру. Видалення нуклеїнових кислот корисно проводити на ранніх стадіях сирової обробки. Методи видалення нуклеїнових кислот також допомагають видаляти різні види частинок, якщо вони мають аніонний характер, наприклад, багато клітинних і субклітинних мембран. Існує два основних методи видалення нуклеїнових кислот - осадження за допомогою поліамінів і використання позитивно заряджених аніонообмінних смол. Нуклеїнові кислоти - це поліаніони, заряджені негативно і досить щільно обтяжені фосфатними групами.

Природні «протаміни», які є білками, але дуже катіонними білками, ретельно копреципітують більшість нуклеїнових кислот і рибосом. Однак за межами кінцевої точки додавання більшої кількості протамінових білків, ніж необхідно для видалення нуклеїнових кислот, надлишок протамінів може залишатися в зразках, забруднюючи білки, що цікавлять, і, можливо, перешкоджаючи їхньому виділенню. Тому може знадобитися визначити кінцеву точку припинення додавання протаміну за допомогою відповідного спектроскопічного методу для визначення вмісту нуклеїнових кислот.

Синтетичний поліетиленімін (PEI; Sigma) і синтетичні поліамінобутанові сполуки (спермін; Sigma) також осаджують нуклеїнові кислоти і є корисними для великих зразків (об'єми від мілілітрів до літрів). Додавання від 20 до 80 мкл 5 % PEI до 1 мл сировини, що містить 4 % (сухої ваги) нуклеїнових кислот, призводить до майже повного видалення нуклеїнових кислот. Цю процедуру слід проводити при рН 7.5-8, де аміногрупи поліетиленіміну є повністю катіонними, а нуклеїнові кислоти - повністю аніонними.

Якщо білок, що цікавить, преципітується як з PEI, так і з нуклеїновими кислотами, як у випадку з деякими ферментами, для розчинення таких ферментів з агломерату PEI необхідна зміна рН і екстракція сіллю (наприклад, NaCl).

#### **1.4 Методи отримання білків з водних розчинів**

Селективне осадження білків може використовуватися як об'ємний метод для вилучення більшості білків з сирого лізату, як селективний метод для фракціонування підмножини білків з білкового розчину або як дуже специфічний метод для вилучення одного білка, що цікавить, з етапу очищення.

Розробка методу селективного осадження певного білка вимагає визначення відповідного осаджувального агента та оптимізації процедури осадження з його використанням. Часто більш ніж один реагент може успішно осаджувати певний білок, тому вибір реагенту полягає у визначенні того, який забезпечує осадження потрібного білка в найоптимальнішому стані. Деякі реагенти спричиняють денатурацію або негативно впливають на біологічну активність, а деякі утворюють комплекси, які міцно зв'язують білок. Третім не вистачає здатності до селективного впливу на потрібний білок.

Одним з факторів, який необхідно враховувати під час процедури розділення, є можливість зміни початкової тривимірної структури білкових молекул. Попередні знання про вплив умов навколишнього середовища на структуру та взаємодії білків є надзвичайно корисними при виборі найбільш підходящого методу розділення. По-перше, тому що це допомагає визначити найбільш сприятливі умови для виділення певного білка з суміші білків (наприклад, рН, іонна сила, розчинник, температура тощо), а по-друге, тому що може бути важливо вибрати умови, які не будуть негативно впливати на молекулярну структуру білків.

Вибір методу осадження залежить від того, наскільки легко або складно повернути осад назад, щоб відновити білок (білки) і відкинути надлишок осаджувача. Для більшості застосувань осаджених білків - наприклад, у харчуванні, терапії або просто для аналізу - білки повинні бути звільнені від осаджувачів. Досить потужні агенти, такі як синтетичні поліелектроліти, можуть бути важко або повільно (або і те, і інше) вилучені з потрібних білків і звільнені від них. Отже, осадження синтетичними поліелектролітами найкраще використовувати для попереднього осадження небажаних білків (тобто там, де ці осади підлягають відкиданню). Білки, що залишилися в надосадової рідині, можна потім захопити за допомогою менш агресивного, але більш контрольованого осаджувача.

#### **1.4.1 Класифікація основних типів селективного осадження білків**

Існує безліч методів осадження білків з водних розчинах, що базуються на різних явищах та особливостях, які можна об'єднати в 4 основні групи:

1. Методи, засновані на різних характеристиках розчинності білків і компонентів розчину;
2. Методи розділення на основі різних адсорбційних характеристик;
3. Методи поділу на основі різниці в розмірах;
4. Методи розподілу за допомогою електрофорезу.

Методи першого блоку базуються на властивостях білків і тому, що їх можна розділити, використовуючи відмінності в їхній розчинності у водних розчинах. Розчинність білкової молекули визначається її амінокислотною послідовністю, оскільки вона визначає її розмір, форму, гідрофобність і електричний заряд. Білки можна селективно осаджувати або розчиняти, змінюючи рН, іонну силу, діелектричну проникність або

температуру розчину. Ці методи розділення найпростіше використовувати при роботі з великими об'ємами зразків, оскільки вони відносно швидкі, недорогі і не зазнають особливого впливу інших компонентів харчових продуктів. Їх часто використовують як перший крок у будь-якій процедурі розділення, оскільки більшість забруднюючих матеріалів можна легко видалити.

В основі методів другого блоку лежить адсорбційна хроматографія, що передбачає розділення сполук шляхом селективної адсорбції-десорбції на твердій матриці в колонці, через яку проходить суміш. Поділ базується на різній спорідненості різних білків до твердої матриці. Афінна хроматографія та іонообмінна хроматографія - два основних типи адсорбційної хроматографії, які зазвичай використовуються для розділення білків. Розділення можна проводити за допомогою відкритих колонок або рідинної хроматографії під високим тиском.

Третій блок методів використовує фізичні характеристики білків, а саме те, що їх можна розділити за їхнім розміром. Молекулярна маса білків зазвичай становить від 10 000 до 1 000 000 000 дальтонів. На практиці поділ залежить від радіуса Стокса білка, а не безпосередньо від його молекулярної маси. Радіус Стокса - це середній радіус білка в розчині, який залежить від його тривимірної молекулярної структури. Для білків з однаковою молекулярною масою радіус Стокса збільшується в такому порядку: твердий глобулярний білок < гнучка випадкова спіраль < стрижнеподібний білок.

Останній блок методів використовується зазвичай для проведення якісного аналізу компонентів розчину і базується на використанні електрофорезу, робота якого ґрунтується на різниці в міграції заряджених молекул у розчині під дією електричного поля. Його можна використовувати для розділення білків на основі їхнього розміру, форми або заряду, на основі їх просування в поліакридному гелі.

Електродний апарат складається з високовольного джерела живлення, електродів, буфера і підставки для буфера, наприклад, фільтрувального паперу, смужок ацетату целюлози, поліакриламідного гелю або капілярної трубки. Відкриті капілярні трубки використовуються для багатьох типів зразків, а інші носії зазвичай застосовуються для біологічних зразків, таких як білкові суміші або фрагменти ДНК. Після завершення розділення носій забарвлюється для візуалізації розділених компонентів.

Нижче (табл. 2) наведено класифікацію основних методів селективного осадження:

**Таблиця 2**

Класифікація методів селективного осадження білків.

|  |   |
|--|---|
| Методи, засновані на різних характеристиках розчинності білків і компонентів розчину | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Осадження з додаванням солей.</li> <li>2. Ізоелектричне осадження.</li> <li>3. Фракціонування розчинником.</li> <li>4. Денатурація температурою.</li> </ol> |
| Методи розподілу на основі різних адсорбційних характеристик                         | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Іонообмінна хроматографія</li> <li>2. Афінна хроматографія</li> </ol>   |
| Методи поділу на основі різниці в розмірах   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Діаліз</li> <li>2. Ультрафільтрація</li> <li>3. Хроматографія виключення за розміром</li> </ol>   |
| Методи розподілу за допомогою електрофорезу  | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Електрофорез без денатурації</li> <li>2. Електрофорез з денатурацією</li> </ol>   |

На практиці більшість агентів і методів осадження білків дають різноманітні продукти залежно від умов, таких як рН, іони металів, присутніх у розчині, та/або наявність розчинників [50]. Багато «осадів» насправді є коосадами, в яких молекули осаджувача залишаються зв'язаними з білками. Скільки осаджувача або лігандів зв'язується і, таким чином, утворює копреципітат, зазвичай залишається незрозумілим доти, доки копреципітат не буде проаналізовано. Осадження і співосадження є найбільш важливими на попередніх стадіях виділення білків - для сирих, розбавлених розчинів у великих об'ємах, до декількох літрів. Однак осадження іноді корисне і на наступних стадіях, оскільки воно зменшує об'єм - наприклад, за допомогою цього методу можна видалити надлишок розчинника і буферів з хроматографічних елюатів.

Іноді ефективною стратегією є попереднє осадження небажаних білків на перших стадіях очищення, а потім захоплення шуканого білка на другій стадії осадження, що відбувається пізніше.

Деякі методи осадження є старими, а деякі були розроблені нещодавно. Деякі зі старих методів, такі як осадження сульфатом амонію (якому вже понад 130 років), все ще корисні і сьогодні. Сульфат амонію забезпечує захист чутливих білків і може бути масштабований за розумною вартістю. Деякі осаджувальні та коагулюючі агенти утворюють осади, які є легко оборотними. Оборотні агенти можуть бути видалені пізніше - наприклад, осад сульфату амонію може бути видалений діалізом, попередньою фільтрацією або заміною смоли для видалення сульфату. Інші агенти, незважаючи на їхню високу осаджувальну здатність, можуть бути важко видалені повністю або можуть каталізувати пошкодження топопротеїнів (наприклад, окислення сульфгідрилу). Таким чином, осаджувачі необхідно оцінювати з урахуванням наступних етапів, які можуть бути використані для компенсації недоліків, які мають деякі сильні осаджувачі. Іноді оптимальним осаджувачем є слабший, а не дуже сильний

агент, якщо слабший агент легше дисоціювати, захопити або діалізувати, щоб вивільнити потрібний білок.

#### **1.4.2 Осадження з додаванням солей**

Коли концентрація солі перевищує критичне значення, білки випадають з водного розчину, що називається висолюванням. Зазвичай використовують сульфат амонію  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  через його високу розчинність у воді, але можна застосовувати й інші нейтральні солі, такі як  $\text{NaCl}$  і  $\text{KCl}$ . Як правило, для максимізації ефективності розділення використовують двоступеневу процедуру. На першому етапі додають сіль у концентрації, необхідній для осадження досліджуваного білка. Потім розчин центрифугують, щоб видалити білки, які менш розчинні, ніж білок, що нас цікавить. Потім концентрацію солі збільшують до концентрації, що трохи перевищує концентрацію, необхідну для осадження білка. Це призводить до того, що білок, який нас цікавить, випадає в осад (який можна відокремити за допомогою центрифугування), але більш розчинні білки залишаються в розчині. Основна проблема цього методу полягає в тому, що високі концентрації солі забруднюють розчин, і сіль необхідно видалити, перш ніж білки можна буде повторно розчинити за допомогою діалізу або ультрафільтрації [51].

Сульфат амонію є найкращою сіллю для початкової розробки методу розподілу для осадження шуканих білків. Можна вибрати й інші солі, і часто вони дають успішні результати. Однак через космотропні властивості сульфатів та їхню здатність вилучати білкові молекули, сульфат амонію є найкращим і найбільш вивченим.

Висадження сульфату може бути як термодинамічно обмежене, так і лімітоване швидкістю. Якщо осадження білків не відбувається швидко після додавання розрахованої кількості сульфатної солі, краще почекати деякий період, можливо, кілька годин, щоб дати час для утворення осаду. Це стає необхідним для розбавлених розчинів білків, концентрація яких не

перевищує ~1%. Для деяких ферментів ссавців поріг осадження і розчинності білків - тобто, видиме утворення осаду в порівнянні з білками, що залишаються розчиненими («видима рівновага») - знаходиться на рівні ~2 до 5 мг/мл білка в 2-3 М сульфаті амонію, при нейтральному рН.

Важливими також можуть бути рН і температура. Якщо ізоелектричний рН білка, що цікавить, відомий, оптимальні умови можна знайти, змінюючи рН в одиницях від ~0.5 до 1 рН, використовуючи його як центральну точку. Багато білків, пептидних антибіотиків та лікарських засобів найкраще соляться у вигляді коосадів зі зв'язаним  $\text{SO}_4^{2-}$  як протиіоном. Тому оптимальний рН для висалювання може бути кислим по відношенню до ізоелектричної точки.

Етапи роботи:

1. Регуляція рН зразка сирого протеїну.
2. Додавання аліквоту  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  зі 100% насиченого вихідного розчину або різних концентрацій кристалічної солі.
3. Утворення великого видимого осаду: 2,5-4 години, залежно від температури.
4. Осад відокремлюється та діалізується для видалення надлишку солі.

### **1.4.3 Ізоелектричне осадження**

Ізоелектрична точка (рІ) білка - це значення рН, при якому чистий заряд білка дорівнює нулю. Білки мають тенденцію до агрегації та осадження в ізоелектричній точці, оскільки немає електростатичного відштовхування, яке б їх розділяло. Оскільки білки мають різні амінокислотні послідовності (тобто відносну кількість аніонних і катіонних груп), вони мають різні ізоелектричні точки, тому їх можна розділити, регулюючи рН розчину.

Найчастіше білки є найменш розчинними і найбільш осаджуваними, коли вони знаходяться в ізоіонному стані. В ізоіонному, безсольовому стані білкові молекули перебувають у найбільш компактній, найменш

гідратованій формі - явище, яке тісно пов'язане зі станом білків у їхній ізоелектричній точці. Різниця між ізоіонними та ізоелектричними властивостями детально описана Танфордом. Деіонізація за допомогою колонки або діалізу, має на меті зробити білки ізоіонними, щоб осадити їх. Розчинність багатьох білків визначається двома важливими параметрами: рН розчину по відношенню до ізоіонної точки кожного білка (pI) і низькою концентрацією солі (від нуля до 0,1-0,2 М солі). Ряд білків, наприклад,  $\beta$ -лактоглобулін, сильно залежать від цих параметрів. Відповідно, якщо ці параметри добре контролювати і ретельно регулювати, поведінка розчинності/осаджуваності білка стане практичною основою для масштабованого, селективного виділення потрібного білка.

#### **1.4.4 Фракціонування розчинником**

Розчинність білка залежить від діелектричної проникності навколишнього розчину, яка змінює величину електростатичної взаємодії між зарядженими групами. Зі зменшенням діелектричної проникності розчину електростатична взаємодія між зарядженими групами зростає. В результаті розчинність білків у розчині зменшується, оскільки вони стають менш іонізованими, а отже, електростатичне відштовхування між ними недостатнє для запобігання їх агрегації. Діелектричну проникність водних розчинів можна зменшити додаванням водорозчинних органічних розчинників, таких як етанол або ацетон. Кількість органічного розчинника, необхідна для індукції преципітації, залежить від білка, і білки можуть бути розділені відповідним чином. Оптимальна кількість органічного розчинника, необхідна для осадження білка, становить від 5 до 60 %. Фракціонування розчинником зазвичай проводять при 0°C або нижче, щоб уникнути денатурації білка, спричиненої підвищенням температури в результаті змішування органічних розчинників з водою.

Осадження білків дуже холодним етанолом або ацетоном - метод, розроблений понад 100 років тому. Ці співрозчинники все ще часто

використовуються. Етанол витіснив ацетон для осадження білків, коли Е. Д. Кона та його колеги з Гарвардського університету застосували метод фракціонування Кона для масової підготовки білків плазми, таких як альбумін, фібриноген, протромбін і гамма-глобулін. Процедура Кона була вдосконалена і все ще використовується і сьогодні.

Однією з переваг етанолу перед ацетоном є ризик фільтрації. Етанол менш леткий, ніж ацетон, і утворює менше легкозаймистих парів за аналогічних умов. Обидва розчинники слід використовувати у вентильованих приміщеннях при роботі з об'ємами більше 0,1 літра.

Співрозчинники  $C_5$  і  $C_6$ , такі як спирти, наприклад, пентанол, також корисні в деяких ситуаціях. Однак співрозчинники  $C_5$  і  $C_6$  нерозчинні у воді, що обмежує їх використання. Співрозчинник т-бутанол, що використовується тут, повністю розчинний у воді, але утворює другу фазу в присутності високих концентрацій сульфату амонію. При цьому білок випадає в осад, утворюючи третю фазу між нижньою (водною) і верхньою (органічною) фазами. Фази насичені одна одною; поведінка трифазного розділення залежить від молекулярного заряду білка (осад зазвичай є сульфатом білка). Тому рН водної фази є важливим параметром у регулюванні осадження білка, його розподілу та екстракції небажаних сполук. Якщо білки екстрагують детергентами з вихідного джерела, трифазне розділення і споріднені методи (наприклад, метод екстракції н-бутанолом Мортонна зазвичай ефективні для видалення детергентів, ліпідів і барвників з білків.

#### **1.4.5 Денатурація температурою**

Багато білків денатуруються і випадають в осад при нагріванні вище певної температури або при доведенні розчину до дуже кислого або основного значення рН. Білки, стабільні при високих температурах або екстремальних значеннях рН, найлегше відокремлювати за допомогою

цього методу, оскільки забруднюючі білки можуть осаджуватися, тоді як білок, що нас цікавить, залишається в розчині.

#### **1.4.6 Іонообмінна хроматографія**

Іонообмінна хроматографія передбачає оборотну адсорбцію і десорбцію іонів з розчину на заряджену тверду матрицю або полімерну сітку. Цей метод є найпоширенішою хроматографічною технікою для розділення білків. Позитивно заряджена матриця називається аніонообмінником, оскільки вона адсорбує негативно заряджені іони (аніони). Негативно заряджена матриця називається катіонообмінником, оскільки вона зв'язує позитивно заряджені іони (катіони). Буферні умови (рН та іонна сила) підбираються таким чином, щоб якомога більше білків, що цікавлять дослідника, зв'язалися з іонообмінною колонкою. Забруднюючі білки зв'язуються менше і тому швидше проходять через іонообмінну колонку. Потім досліджуваний білок елюється іншим буфером (наприклад, з іншим рН або іонною силою), щоб полегшити його десорбцію з колонки.

На доповнення до адаптації білків до їх ізоіонного рН, загальний метод з використанням деіонізації смол в змішаному шарі, здатний видалити всі солі з білків. Солі, навіть у невеликих концентраціях (<0,05 М у багатьох випадках), часто мають значний вплив на розчинність білків і, отже, на осаджуваність. Неорганічні солі мають властивість «засолювати» багато білків, тим самим підвищуючи їх розчинність. Відповідно, чіткий контроль і ретельне видалення солей є важливою частиною загальної методики іонообмінного осадження.

Dintzis - це деіонізаційна колона з нижнім, основним змішаним шаром глобул іонообмінної смоли у відповідних формах ОН і Н<sup>+</sup>. Змішаний шар видаляє дві категорії іонів солі: (1) електроліт підтримки, тобто вільну сіль у розчині, і (2) іони солі, які є протиіонами, що фактично зв'язані з білком, якщо білок не є ізоіонним. Якщо рН вихідного розчину

нижче ізоіонної точки, білок є катіоном з протиіонами аніонів, зазвичай  $\text{Cl}^-$ . Якщо рН вище ізоіонної точки, білок є чистим макроаніоном з катіонними протиіонами, зазвичай  $\text{K}^+$  або  $\text{Na}^+$ . У змішаному шарі катіонні та аніонні іони солі обмінюються на  $\text{H}^+$  та  $\text{OH}^-$  відповідно, після чого вони просто утворюють воду. Молекули білка без рухомих протиіонів кількісно витісняються до єдиного рН, при якому вони можуть існувати без рухомих протиіонів або зв'язаних з білком іонів, тобто до ізоіонного рН. Таким чином, в колонці знаходиться ізоіонний білок при ізоіонному рН, тобто у звичайній воді. Процеси чистого солеобміну і захоплення іонів подібні до звичайного опріснення за допомогою смоляних іонообмінників, за винятком того, що вихідний потік буферизується ізоіонним білком і підлаштовується до його рН.

#### **1.4.7 Афінна хроматографія**

В афінній хроматографії використовується статична фаза, що складається з ліганду, ковалентно зв'язаного з твердим носієм. Ліганд - це молекула, яка має дуже специфічну і унікальну оборотну спорідненість до певного білка. Зразок, що аналізується, пропускається через колонку, і білок, що цікавить, зв'язується з лігандом, в той час як забруднюючі білки пропускаються безпосередньо через колонку. Потім досліджуваний білок елююється за допомогою буферного розчину, який сприяє його вимиванню з колонки.

Ліганди, що укладають матрицю, об'єднують білкові молекули в щільні комплекси, які агрегують і копреципітують білок. Асоціація ліганд/ліганд утворює матрицю-хазяїна; білкові молекули, захоплені в матриці, є гостями. Іноді ці ліганди кокрystalізують білки та пептиди. Органічні хвости лігандів містять досить жорсткі копланарні групи, які укладаються і зв'язуються одна з одною  $\pi$ -обертанням, подібно до укладання ароматичних основ у подвійних спіралях нуклеїнових кислот. Матрична асоціація «хвіст до хвоста» посилюється короткими алкановими

групами на периферії хвостів - метильними, етильними і т-бутильними замісниками. Алкільні замісники надають гідрофобності та сприяють витісненню води, що сприяє асоціюванню від хвоста до хвоста.

Як і у випадку з лігандами, що легко заплутуються, більш жорсткі матричні ліганди досягають максимальної ефективності копреципітації, коли  $\nu$ -ліганди зв'язуються з молекулою білка у співвідношенні  $\nu$  до  $Z_{H^+}$ , близькому до 1:1, тобто  $\nu = \sim Z_{H^+}$ , де  $Z_{H^+}$  - чистий катіонний заряд білка, отриманий в результаті  $H^+$ -титрування бічних ланцюгів. Отже, копреципітація залежить від рН і від того, як рН впливає на заряд білка,  $Z_{H^+}$ . Ліганди укладання та заплутування в їхніх найбільш корисних загальних концентраціях від  $10^{-4}$  до  $10^{-5}$ М часто захищають білки, а також преципітують їх. Такі ліганди ущільнюють конформацію білка, іноді дуже сильно [52]. Захист часто починається в розчині ще до осадження. Здатність захищати білки від декількох видів деградації є перевагою співосадження лігандів, що укладають матрицю.

Цей метод є найефективнішим засобом виділення одного білка з суміші білків, але він також є найдорожчим через необхідність мати колонки зі специфічними лігандами, прикріпленими до них. Як іонообмінна, так і афінна хроматографія широко використовуються для розділення білків і амінокислот в лабораторії. Вони рідше використовуються для комерційного розділення, оскільки не підходять для швидкого розділення великих об'ємів і є відносно дорогими.

#### 1.4.8 Діаліз

Одним із старих способів знесолення або майже знесолення білків (тобто ізоіонного) є діаліз - розділення молекул у розчині за допомогою напівпроникної мембрани, яка пропускає молекули, менші за певний розмір, але перешкоджає проходженню великих молекул. Розчин білка поміщають у діалізну трубку, герметично закривають, а потім повільно перемішують у великій кількості води або буфера. Низькомолекулярні

розчинники будуть протікати через діалізний мішок, але високомолекулярні білкові молекули залишаться в мішку [53]. Діаліз є відносно повільним методом, який триває до 12 годин. Тому він найчастіше використовується в лабораторії. Діаліз часто використовують для видалення солей з білкових розчинів і для заміни буферів.

Діаліз може досягти трьох цілей за допомогою додаткових етапів. По-перше, за допомогою діалізу можна видалити небажані низькомолекулярні речовини, такі як цукор, амінокислоти і компоненти ферментаційних бульйонів або клітинних екстрактів. По-друге, діаліз дозволяє плавно регулювати рН зразків білків до потрібного рівня. Нарешті, діаліз дозволяє підігнати зразки білків до відомої початкової концентрації солі - концентрації буферного розчину для діалізу. Діаліз можна проводити в діалізних мішках (пробірках з ацетату целюлози) або в напірному мембранному концентраторі, де номінальна молекулярна маса мембрани нижча за молекулярну масу шуканого білка.

Однак при звичайному діалізі часто виникають дві проблеми: (1) коли присутня значна кількість білка, осмотичні ефекти призводять до набрякання діалізних мішків, оскільки сіль дифундує назовні; і (2) часто досить неясно, де знаходиться ізоіонна точка, навіть якщо є можливість деіонізувати діалізом проти буфера. Метод деіонізації смоли, який іноді називають методом Дінціса, автоматично підлаштовує білок точно до його ізоіонного рН без попереднього знання про це. Білки, які відразу ж випадають в осад при деіонізації, створюють проблеми при використанні колонкового методу. Осади закупорюють колонку і створюють проблему відокремлення осадженого білка від смоляних кульок.  $\beta$ -лактоглобулін та ряд інших білків поведуться подібним чином; їх розчинність дуже чутлива до низьких сольових умов, близьких до ізоіонного рН. Білки, що підлягають деіонізації та осадженню в ізоіонній формі, поміщають у діалізну трубку з молекулярно-масовим фільтром, який утримує білок, що

цікавить, а смолу для змішаного шару розміщують зовні у вигляді суспензії з 40-60 г смоли для змішаного шару (50-80 мл вологої смоли).

Білок у діалізній трубці відновлюється шляхом центрифугування вмісту мішка. Цей загальний метод займає кілька годин. Вимивання і дифузія сповільнюються зі зменшенням концентрації білка в діалізованому мішку, тому цей метод є повільнішим, ніж метод проточної колонки.

#### **1.4.9. Ультрафільтрація**

Ультрафільтрація (УФ) - це метод, який зазвичай застосовують для мембранного розділення структур діаметром до 100 нм під дією тиску. Крім того, за допомогою ультрафільтраційних мембран можливе знесолення, концентрування та буферний обмін розбавлених розчинів і суспензій сполук/наноструктур. Для УФ-процедур зазвичай використовують кілька матеріалів, включаючи штучні та природні полімери, такі як полівініліденфторид (PVDF), політетрафторетилен (PTFE), нейлон і целюлозу.

Розчин білка поміщають у комірку з напівпроникною мембраною і створюють тиск. Малі молекули проходять через мембрану, а великі молекули залишаються в розчині. Таким чином, принцип розділення в цьому методі схожий на діаліз, але розділення відбувається швидше завдяки тиску, що застосовується. Можна використовувати напівпроникні мембрани з точкою відсікання від 500 000 до 300 000. Частина розчину, яка утримується клітинами (великі молекули), називається ретентатом, тоді як частина, яка проходить через мембрану (малі молекули), стає частиною ультрафільтрату. Ультрафільтрація може бути використана для концентрування білкових розчинів, видалення солей, заміни буферів або фракціонування білків відповідно до їх розміру. Устаткування для ультрафільтрації доступне як в лабораторних, так і в комерційних масштабах.

#### **1.4.10. Хроматографія виключення за розміром**

Цей метод, також відомий як гель-фільтрація, також розділяє білки за розміром. Розчин білка заливають у колонку, заповнену пористими гранулами, виготовленими зі зшитого полімерного матеріалу (наприклад, декстрану або агарози). Молекули, розмір яких перевищує пори в кульках, виключаються і швидко рухаються через колонку, в той час як рух молекул, що потрапляють в пори, затримується. Таким чином, молекули витісняються з колонки в порядку зменшення їх розміру. Для розділення білків з різною молекулярною масою доступні насадки з різним середнім розміром пор. Виробники цих насадок надають інформацію про діапазон молекулярних мас, які найкраще підходять для розділення. Молекулярні маси невідомих білків можна визначити, порівнюючи об'єми елювання  $V_0$  з об'ємами елювання білків з відомою молекулярною масою: Графік залежності об'єму елюції від логарифму (молекулярної маси) повинен давати пряму лінію.

Проблема цього методу полягає в тому, що молекулярна маса не пов'язана безпосередньо з радіусом Стокса для білків різної форми.

#### **1.4.11. Електрофорез без денатурації**

Електрофорез використовується для розділення складних білкових сумішей, оцінки гомогенності зразків і визначення складу їхніх субодиниць. Він також може бути використаний для очищення білків для подальшого використання. У методі електрофорезу в поліакриламідному гелі білки оцінюються з урахуванням їхнього руху через пори в поліакриламідному гелі за допомогою електричного поля. Одновимірний гель-електрофорез надає інформацію про молекулярний розмір, масу і чистоту білків.

У неденатуруючому електрофорезі буферний розчин нативних білків наливають на пористий гель (зазвичай поліакриламід, крохмаль або агарозу) і подають на гель напругу. Білки рухаються крізь гель у напрямку,

який залежить від знаку їх заряду, і зі швидкістю, яка залежить від величини заряду, а також від сили тертя, що перешкоджає їхньому руху.

Білки можуть бути позитивно або негативно заряджені в розчині, залежно від їхньої ізоелектричної точки (pI) та рН розчину. Якщо рН вищий за pI, білок заряджений негативно; якщо рН нижчий за pI, білок заряджений позитивно. Величина заряду і прикладена напруга визначають, на яку відстань мігрує білок за певний час. Чим вища напруга або чим більший заряд на білку, тим далі він рухається. Тертя молекули є мірою її опору руху через гель і визначається, в першу чергу, співвідношенням між ефективним розміром молекули і розміром пор в гелі. Чим менший розмір молекули або чим більші пори в гелі, тим менший опір і, отже, тим швидше молекула рухається крізь гель. Гелі з різною пористістю можна придбати у постачальників хімічних речовин або виготовити в лабораторії. Менші розміри пор можна отримати, використовуючи більш високі концентрації зшиваючих реагентів для формування гелю. Гель можна помістити між двома паралельними пластинами або в циліндричну пробірку. У неденатуруючому електрофорезі нативні білки розділяються відповідно до їх комбінації заряду, розміру і форми.

#### **1.4.12. Електрофорез з денатурацією**

У денатуруючому електрофорезі білки розділяються в першу чергу за їх молекулярною масою. Перед аналізом білки денатурують, змішуючи їх з меркаптоетанолом, який руйнує дисульфідні зв'язки, і додецилсульфатом натрію (SDS) - аніонною поверхнево-активною речовиною, яка гідрофобно зв'язується з білковими молекулами і змушує їх розгортатися через відштовхування між негативно зарядженими головними групами поверхнево-активної речовини [54]. Кожна молекула білка зв'язує приблизно однакову кількість SDS на одиницю довжини. Отже, заряд на одиницю довжини і молекулярна конформація приблизно однакові для всіх білків. Під час руху білків крізь сітку гелю вони в першу

чергу розділяються на основі їх молекулярної маси, оскільки їх рух залежить від розміру білкової молекули по відношенню до розміру пор у гелі: менші білки рухаються крізь матрицю швидше, ніж більші за розміром молекули [55]. Цей тип електрофорезу зазвичай називають електрофорезом у додецилсульфатно-поліакриламідному гелі натрію, або SDS-PAGE. Щоб визначити, наскільки далеко перемістилися білки, до розчину білка додають барвник для відстеження, наприклад, бромфеноловий синій. Цей барвник являє собою невелику заряджену молекулу, яка мігрує попереду білків. Після завершення електрофорезу білки стають видимими шляхом обробки гелю білковим барвником, таким як Coomassie Brilliant Blue або срібним барвником. Розраховується відносна рухливість кожної білкової смуги:

$$R_m = l_p / l_d$$

де,  $R_m$  - відносна рухливість білкової смуги;

$l_p$  - відстань, на яку рухається білок;

$l_d$  - відстань переміщення барвника

Електрофорез часто використовують для визначення білкового складу харчових продуктів. Білок екстрагується з їжі в розчин, який потім відокремлюється за допомогою електрофорезу. SDS-PAGE використовується для визначення молекулярної маси білка шляхом вимірювання  $R_m$ , а потім порівняння її з калібрувальною кривою, отриманою з використанням білків з відомою молекулярною масою: графік залежності молекулярної маси від відносної рухливості зазвичай є лінійним. Денатуруючий електрофорез більш корисний для визначення молекулярної маси, ніж неденатуруючий, оскільки опір руху не залежить від форми або початкового заряду білкових молекул.

## **Розділ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ**

Яєчний білок - це прозора рідина в яйці. Він утворюється з жовтком у цитоплазмі одноклітинної яйцеклітини перед заплідненням. Яєчний білок складається переважно на 90% з води, в якій розчинено близько 10% білка (включаючи альбумін, муцин і глобулін). На відміну від яєчного жовтка, який містить велику кількість ліпідів (жирів), яєчний білок практично не містить жирів і містить менше 1% вуглеводів. Яєчний білок містить 56% білка, що міститься в яйці, серед яких приблизно з 15% водорозчинного білка, з яких більше половини - овальбумін. Яєчний білок широко використовується в їжу (наприклад, безе, муси) і в різних інших сферах (наприклад, у виробництві вакцин, таких як вакцина проти грипу).

В роботі наводили приклади теоретичних експериментів з отримання водного розчину яєчного білку та обраних методів селективного осадження білків.

### **2.1 Об'єкт дослідження**

В роботі наведено теоретичний експеримент з використанням препарату на основі 1% розчину яєчного білка свійських курей (*Gallus gallus domesticus*)

Для порівняльної характеристики було наведено два найпоширеніших методи: осадження шляхом висолювання та колонковим методом (шляхом ізоіонного осадження)

### **2.2 Отримання розчину яєчного білка**

Яєчний білок (240 мл) розводили 1 об'ємом дистильованої води (ДВ), гомогенізували ручним міксером, доводили до рН 4,5-5,0 за допомогою 3N HCl і центрифугували при 3400×g протягом 30 хв при 4°C.

Надосадову рідину збирали і обробляли комбінацією сульфату амонію та лимонної кислоти, де використовували сульфат амонію 5% і лимонну кислоту від 2,5%.

Зразки зберігали протягом ночі при 4°C і центрифугували при 3400 × g протягом 20 хвилин при 4°C.

Для знесолення використовували різні комбінації сульфату амонію та кислот, щоб осадити білки з розчину.

Після нічного зберігання в холодильнику зразки центрифугували при 3400×g протягом 20 хвилин при 4°C.

### **2.3 Осадження білків шляхом додавання солей**

Після аналізу доступної літератури та даявних досліджень в сфері селективного розподілу білків, було вирішено змоделювати теоретичний експеримент на основі методу осадження білків за допомогою солей.

Хід роботи:

1. Зразки білків діалізували у рН-буфері або суміші рН-буфера і сульфату амонію нижче концентрації сульфату, необхідної для осадження [%F]

2. Визначаємо оптимальну концентрацію білка, для даного досліджу найоптимальнішим є 1% розчин

3. Додаємо покроково концентрати 2,5% лимонної кислоти, добре перемішуємо розчин білка при додаванні кислот або лугів. Температуру витримуємо в рамках 4°C.

4. Додаємо сульфат амонію до оптимальної концентрації. Інкубуємо до утворення осаду.

Загалом, сіль можна додавати у вигляді насиченого розчину, але додавання солі у твердій формі має перевагу, оскільки зменшує збільшення об'єму. Існує мало ознак того, що додавання твердого сульфату амонію може пошкодити солубілізований білок.

5. Осад збираємо найпростішим методом декантації (змиванням надосадової рідини). Сульфат амонію осаджуємо низькошвидкісним центрифугуванням (10-100 x g).

6. Осад знову розчинюємо у буфері для електрофорезу

7. Надлишок солі видаляємо простим діалізом у целюлозній трубці. Проводимо біоаналіз на білок.

Якщо зразок буде значно розведений для біоаналізу, може не знадобитися попереднє діалізування повторно розчиненого сульфату амонію.

## 2.4 Осадження шляхом хроматографії

Деіонізаційна колона з нижнім, основним змішаним шаром аніоніт-катіонітових гранул у відповідних ОН- і Н<sup>+</sup>-формах.

1. Визначили необхідну обмінну ємність. Ємність, необхідна для деіонізації та захоплення солей, залежить від кількості протиіонів, яка, в свою чергу, залежить від рН розчину білка, концентрації та загального об'єму переливання електроліту, що підтримується [56]

2. Помістили катіоніт у пластикову склянку, залили надлишком 0,5 М NaOH і витримали протягом 20 хвилин для перетворення смоли у форму Na<sup>+</sup>.

3. Перенесли у велику лійку Бюхнера з фільтрувальним папером, промили водою, перенесли у склянку, залили додатково 0,5-1 М розчином гідрохлориду натрію (HCl) і інкубували 20 хвилин, перенесли у лійку Бюхнера з фільтрувальним папером і знову промили водою. Повторили цей цикл обміну принаймні ще один раз перед змішуванням обмінної смоли.

4. Помістили аніонну смолу в пластикову склянку, додали надлишок 1 М NaOH і витримали протягом 20 хвилин для переходу смоли в ОН-форму. перенесли у воронку з великою горловиною, оснащену

фільтрувальним папером і промили водою, щоб видалити всі надлишкові іони ОН, тепер аніонна смола має вигляд ОН<sup>-</sup>.

CO<sub>2</sub> у повітрі повільно нейтралізує аніонну смолу до бікарбонатної форми, тому для тривалого зберігання її слід зберігати в прохолодному місці, подалі від контакту з повітрям. Смола повинна завершити повний цикл обміну протягом декількох днів перед використанням.

5. Готуємо смолу для захисної стрічки попереднього обміну наступним чином:

a) Проводимо реакцію аніонної смоли з 0,2 М оцтовою кислотою, потім промиваємо водою, щоб отримати аніонообмінник.

b) Проводимо реакцію катіонної смоли з 0,2 М гідроксидом амонію, потім промиваємо водою, щоб отримати катіонообмінник

6. Змішуємо іонообмінні смоли і завантажуюмо в колонку як наведено на рис. 1.

7. Визначаємо необхідну швидкість потоку. Якщо ємність змішаного шару достатня для уловлювання всіх солей, колонка розміром 2 × 30 см деіонізує від 50 до 100 мл 1% до 5% розчину білка за □3 год. Відповідна швидкість потоку в середньому становить від 0,5 до 1 мл/хв.

8. Проводимо колонкове розділення сирого білкового розчину. Перша порція, 20-30 мл елюату, буде досить розбавленою, оскільки білковий розчин витісняє воду в колонці, і може бути відкладена.

9. Проводимо біоаналіз на білок, що цікавить.

10. Після використання для деіонізації білка смолу слід промиваємо 0,2 М розчином HCl, щоб видалити білок і запобігти розмноженню бактерій.

Проходження через цю колонку позбавляє білок солі і автоматично підлаштовується до ізоіонного рН білка. Ця колонка використовується для білків, які залишаються розчинними в ізоіонній точці. Будова деіонізаційної колонки зображена нижче (рис. 1).

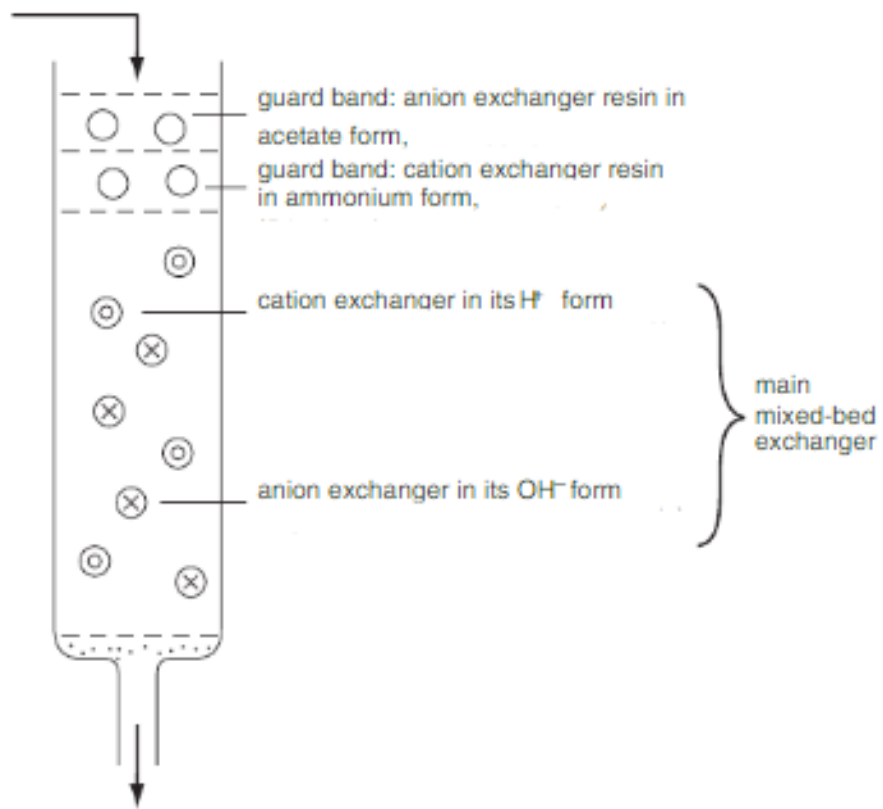


Рис. 1: Деіонізаційна колонка. Основні компоненти.

### **Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Метод виділення та очищення білків яєчного білку повинен ґрунтуватися на структурі та властивостях (наприклад, молекулярній масі, розчинності та ізоелектричній точці) цільового білка. Крім того, метод повинен відповідати вимогам лабораторного або промислового масштабу, що вимагає вищої чистоти і якості, більшого виходу продукту та меншої собівартості отримання та очистки, а також промислового масштабу. Дослідники також повинні враховувати молекулярну активність ізольованих білків; наприклад, виділення лізоцимів осадженням органічними розчинниками, може знизити його корисність через денатурацію та інактивацію білків. Крім того, необхідно враховувати біобезпеку, релевантність і простоту реалізації роботи.

#### **3.1. Оцінка методу осадження білків додаванням солей**

Даний метод був обраний через простоту виконання, високу швидкість осаджування білків та часткову оберненість даного процесу, низьку собівартість і можливість промислового використання.

Метод висолювання сильно залежить від фізико-хімічних властивостей шуканих білків, так як швидкість і якість проведення реакцій осадження залежить від рН розчину та його температури.

Метод був розроблений більш ніж 130 років тому, але залишається одним із напоширеніших, через швидкість та простоту проведення реакцій осадження, за рахунок властивості білків осаджуватися при рівності рН розчину та рНі безпосередньо білка.

Однією з головних проблем є наявність коосаду, через трудомісткість забезпечення вузькоспеціалізованого рН середовища та необхідності повторного проведення висолювання.

У найпростішому варіанті знесолення, білки випадають в осад відносно рано, залишаючи надосадову рідину, яку зазвичай відкладають

або викидають. Це підвищує імовірність коосадження небажаних білків або їх залишення в надосадовій рідині. Задля зменшення відходів, надосадову рідину не рідко використовують на другому етапі знесолення, де коригують рН або збільшують концентрацію солі, або обидві дії одночасно, для більш селективного осадження білків.

Також, досить часто, даний метод комбінується з іншими, наприклад діалізом, хроматографією та іншими, для забезпечення кращої очистки екстракту з більшим вмістом шуканих білків, або як елемент підготовчого етапу, для зменшення вмісту зайвих білків без негативного впливу на шуканий білок.

### **3.2 Оцінка методу осадження білків шляхом хроматографії**

Хроматографія є найбільш широко використовуваним і усталеним методом. Однак хроматографія є відносно громіздкою, трудомісткою, а матеріальні витрати на колонку є високими. Тому сучасні дослідження з очищення білків яєчного білку зосереджені на підвищенні пропускної здатності хроматографічних колонок, поєднанні хроматографії з іншими методами розділення та впровадженні нових методів для підвищення ефективності розділення та скорочення часу фракціонування. Даний метод дозволяє повторно використовувати реактиви наприклад катіонних та аніонних смол, що зменшує собівартість цього методу та час на пошуки нових реагентів.

Висока селективна здатність розподілу робить цей метод одним із найточніших і придатних до промислового використання, що з пошуком нових та поєднанням старих методів хроматографії несе колосальний прибуток.

Для зменшення часу реакції та підвищенню чистоти вихідної продукції можлива попередня обробка білкового матеріалу шляхом висолювання, ультрафільтрації та діалізу.

## ВИСНОВКИ

1. Було проведено аналіз наявних на даний момент методів отримання білків з водних розчинів, і вияснено, що комбінування різних методів може привести до зменшення часу на виконання дослідів, сприяти виходу більш чистої продукції, здатне зменшити собівартість та покращити якість вихідного продукту.
2. Проаналізувавши наявні досліді, було усвідомлено важливість проведення підготовчого етапу, з покроковим пошуком даних про шуканий білок, його властивостей, методології отримання розчину білка та його превентивною очисткою перед проведенням осадження на основі курячого білка.
3. Було описано найважливіші фізико-хімічні властивості, серед яких молекулярна маса, ізоелектронна точка, іонна сила та температура, що мають найвагомійший вплив і можуть повпливати на хід проведення дослідів та зменшити час їх виконання.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Phillips, A. T. and Signs, M. W. 2005. Desalting, concentration, and buffer ex-change by dialysis and ultrafiltration. *Curr. Protoc. Protein. Sci.* 38:4.4.1-4.4.15. doi:10.1002/0471140864.ps0404s38.
2. Singh, R.K. 1995. Precipitation of biomolecules. In *Bioseparation Processes in Foods* (R.K. Singhand S.S. Rizvi, eds.) pp. 139-173. Marcel Dekker, New York.
3. Scopes, R.K. 1987. *Protein Purification: Principles and Practice*, 2nd ed., pp. 45-54. Springer-Verlag, New York.
4. Benede, S.; Molina, E. Chicken Egg Proteins and Derived Peptides with Antioxidant Properties. *Foods* 2020, 9, 16.
5. А. В. Сиволоб (2008). Молекулярна біологія (PDF). К: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет». с. 33-64.
6. Terpe K (January 2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems". *Applied Microbiology and Biotechnology.* 60 (5): 523–533. doi:10.1007/s00253-002-1158-6.
7. Branden C, Tooze J (1999). *Introduction to Protein Structure*. New York: Garland Pub. ISBN 978-0-8153-2305-1.
8. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Garland.
9. Erickson HP (2007). Evolution of the cytoskeleton. *Bioessays.* 29 (7): 668—677.
10. Karp G. (2005). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* (вид. Fourth). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. с. 346—358.
11. Wolberg AS (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 21 (3): 131—142.
12. Li J., Barreda D. R., Zhang Y. A., Boshra H., Gelman A. E., Lapatra S., Tort L., Sunyer J. O. B lymphocytes from early vertebrates have

potent phagocytic and microbicidal abilities // *Nat Immunol.* — 2006. — T. 7, ВЫП. 10. — С. 1116—1124.

13. Driessen AJ, Nouwen N. Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annu Rev Biochem.* 2007 Dec 13

14. Wittenberg JB. On optima: the case of myoglobin-facilitated oxygen diffusion. *Gene.* 2007 Aug 15. 398(1—2):156—161.

15. Drory O., Nelson N. The emerging structure of vacuolar ATPases // *Physiology (Bethesda)*. — 2006. — Vol. 21. — P. 317—325

16. Eliot M. Hermana and Brian A. Larkins. Protein Storage Bodies and Vacuoles // *The Plant Cell.* — 1999. — T. 11. — С. 601—613.

17. Dupré DJ, Hébert TE. Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes. *Cell Signal.* 2006;18(10): 1549—1559.

18. Schroer, Trina A. Dynactin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2004 20, 759—779.

19. Papin JA, Hunter T, Palsson BO, Subramaniam S (February 2005). "Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 6 (2): 99–111.

20. Linda J. Heffner; Danny J. Schust. *The Reproductive System at a Glance* (АНГЛ.). — John Wiley and Sons, 2010. — P. 16

21. Campbell, L.; Raikos, V.; Euston, S.R. Modification of functional properties of egg-white proteins. *Nahrung* 2003, 47, 369–376.

22. Guerin-Dubiard, C.; Pasco, M.; Molle, D.; Desert, C.; Croguennec, T.; Nau, F. Proteomic analysis of hen egg white. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3901–3910

23. Huntington, J.A.; Stein, P.E. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B* 2001, 756, 189–198

24. Giansanti, F.; Leboffe, L.; Angelucci, F.; Antonini, G. The Nutraceutical Properties of Ovotransferrin and Its Potential Utilization as a Functional Food. *Nutrients* 2015, 7, 9105–9115.

25. Ko, K.Y.; Mendona, A.F.; Ahn, D.U. Influence of Zinc, Sodium Bicarbonate, and Citric Acid on the Antibacterial Activity of Ovotransferrin Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Model Systems and Ham. *Poult. Sci.* 2008, 87, 2660–2670
26. de Oliveira, F.C.; Coimbra, J.S.D.; da Silva, L.H.M.; Rojas, E.E.G.; da Silva, M.D.H. Ovomucoid partitioning in aqueous two-phase systems. *Biochem. Eng. J.* 2009, 47, 55–60
27. Hu, X.X.; Liu, Y.F.; Zhu, D.D.; Jin, Y.G.; Jin, H.B.; Sheng, L. Preparation and characterization of edible carboxymethyl cellulose films containing natural antibacterial agents: Lysozyme. *Food Chem.* 2022, 385, 132708.
28. Jin, H.B.; Li, P.S.; Jin, Y.G.; Sheng, L. Effect of sodium tripolyphosphate on the interaction and aggregation behavior of ovalbumin-lysozyme complex. *Food Chem.* 2021, 352, 9.
29. Jin, H.B.; Chen, J.H.; Zhang, J.; Sheng, L. Impact of phosphates on heat-induced egg white gel properties: Texture, water state, micro-rheology and microstructure. *Food Hydrocolloid* 2021, 110, 106200.
30. Omana, D.A.; Wang, J.P.; Wu, J.P. Ovomucin—A glycoprotein with promising potential. *Trends Food Sci. Technol.* 2010, 21, 455-463.
31. Kitamoto, T.; Nakashima, M.; Ikai, A. Hen egg-white ovomacroglobulin has a protease inhibitory activity. *J. Biochem.* 1982, 92, 1679–1682.
32. Geng, F.; Huang, X.; Ma, M.-H.; Li, Z.; Zhang, X.-W. Simple Two-step Chromatographic Method for Purification of Ovomacroglobulin. *Asian J. Chem.* 2013, 25, 2683–2686
33. Abeyrathne, E.D.N.S.; Huang, X.; Ahn, D.U. Antioxidant, angiotensin-converting enzyme inhibitory activity and other functional properties of egg white proteins and their derived peptides—A review. *Poult. Sci.* 2018, 97, 1462–1468.

34. Jain, A.; Cheng, K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis. *J. Control Release* 2017, 245, 27–40.
35. Chen, G.N.; Guo, P.Q.; Wang, Y.; Wang, L.; Shu, H.; Li, Y.Z.; Jing, W.H.; Chang, C.; Fu, Q. Preparation of molecularly imprinted polymers and application in a biomimetic biotin-avidin-ELISA for the detection of bovine serum albumin. *Talanta* 2019, 198, 55–62.
36. Wilchek, M.; Bayer, E.A. The avidin biotin complex in bioanalytical applications. *Anal. Biochem.* 1988, 171, 1–32.
37. Helmenstine, Anne Marie (February 3, 2020). "Tyndall Effect Definition and Examples". ThoughtCo.
38. Timasheff, S.N. 1992. Water as ligand: Preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry* 31:9857-9864. doi:10.1021/bi00156a001
39. Nehete, J.Y., Bhambar, R.S., Narkhede, M.R., and Gawali, S.R. 2013. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications. *Pharmacogn. Rev.* 7:107-116.
40. Singer S. J. The structure and insertion of integral proteins in membranes // *Annu Rev Cell Biol.* — 1990. — T. 6
41. Gurd, F.R.N. and Wilcox, P.E. 1956. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and amino acids. *Adv. Protein Chem.* 11:311-427.
42. Barz, D.P.J., Ehrhard. P., Model and verification of electrokinetic flow and transport in a micro-electrophoresis device, *Lab Chip*, 2005
43. Gallagher, S. R. 2012. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 68:10.1.1-10.1.44.
44. Abbas AK, Lichtman A, Pillai S (2018). "Antibodies and Antigens". *Cellular and Molecular Immunology* (9th ed.). Philadelphia: Elsevier.
45. Hammel, H.T.; Scholander, P.F. (1976). Perspectives on the Mechanism of Osmosis and Imbibition In: *Osmosis and tensile solvent.*

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

46. Shah, M.A., Mir, S.A. *Plant Proteases in Food Processing // Reference Series in Phytochemistry*. 2019. P. 443–464.
47. Olson, B. J. and Markwell, J. 2007. Assays for determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Protein Sci.*
48. Alner, D.J., Creczek, J.J., and Smeeth, A.G. 1967. Precise pH standards from 0° to 60°. *J. Chem. Soc. A* 1205-1211.
49. Astrup, T., Birch-Andersen, A., and Schilling, K. 1954. Fractional precipitation of serum proteins by means of specific anions. *Acta Chem, Scand.* 8:901-908.
50. Matulis, D. and Lovrien, R. 1996. Coprecipitation of proteins with matrix ligands: Scaleable protein isolation. *J. Mol. Recognit.* 9:433-443.
51. Edsall, J.T. and Wyman, J. 1958. *Biophysical Chemistry*, pp. 591-662. Academic Press, New York.
52. Sternberg, M. and Hershberger, D. 1974. Separation of proteins with polyacrylic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 342:195-206.
53. Kressman, T.R. 1957. Commercial materials. In *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry* (C. Calmon and T. Kressman, eds.) pp. 107-109. Interscience Publishers, New York.
54. Guérin-Dubiard, C., M. Pasco, A. Hietanen, A. Quiros del Bosque, F. Nau, and T. Croguennec. 2005. Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 1090:58–67.