

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

Кафедра биохимии и биотехнологии

Р.Х. АЮПОВ, М.М. ЮСУПОВ

Выделение и очистка белка

Учебно-методическое пособие

Казань – 2015

УДК 577.29

ББК 28.072

Принято на заседании кафедры биохимии и биотехнологии

Протокол №4 от 19 января 2015 года

Рецензент:

кандидат биологических наук (PhD),
ассистент кафедры биохимии и биотехнологии КФУ Валидов Ш.З.

Аюпов Р.Х., Юсупов М.М.

Выделение и очистка белка / Р.Х. Аюпов., М.М. Юсупов – Казань:

Казан. ун-т, 2015. – 19 с.

Настоящее учебно-методическое пособие является кратким руководством по планированию и проведению экспериментальной работы в области выделения и очистки белка. В пособии описывается ход работы на примере выделения и очистки белка SaHpf клонированного в *E.coli*. Пособие кратко описывает основные проблемы, возникающие в процессе экспериментальной работы, и предлагает пути их решения. Данное пособие предназначено для студентов, бакалавров, магистров, аспирантов и ученых, интересующихся выделением и очисткой белков.

© Аюпов Р.Х. 2015

© Юсупов М.М. 2015

Выделение и очистка белка

Для характеристики белков зачастую требуется получение их высокоочищенных препаратов. Процесс получения чистых препаратов белков включает в себя клонирование, экспрессию, выделение и очистку (схема 1). Первый этап – клонирование – состоит в создании рекомбинантной плазмиды, содержащей структурный ген интересующего белка, с модификациями, облегчающими последующее выделение белка из совокупности макромолекул клетки. Благодаря системам индуцируемых промоторов на плазмиде, экспрессия обычно не вызывает проблем. Наиболее частой проблемой следующего этапа – выделения – является выпадение белка в осадок внутри клетки (inclusion bodies). Для получения растворимого белка часто приходится начинать конструирование плазмиды для экспрессии сначала.

Выделение и очистка связаны между собой по времени. Если после предыдущих этапов можно остановить процесс: плазмиду после создания можно хранить в виде ДНК, потом трансформировать в клетки *E.coli* и провести экспрессию белка и далее заморозить клетки, то процесс очистки следует делать сразу после выделения. Именно, на этих двух последних этапах, будет сосредоточено внимание в данном пособии.

При выделении белка из осажденных клеток необходимо учитывать несколько важных моментов:

- клетки должны находиться при 0°C, не следует проводить манипуляции с клетками при более высокой температуре, процесс размораживания клеток также следует проводить во льду, иначе есть возможность активирования протеаз, которые могут расщепить ваши белки

- весь процесс работы должен занимать как можно меньше времени, чем быстрее вы выделите белки из клеток и приступите к стадии очистки, тем больше вероятность получения качественного белка

- не пренебрегайте протоколом работы, все изменения фиксируйте в письменной форме, отбирайте аликвоты раствора для электрофоретического анализа – все это, позволит вам выяснить, где именно была допущена ошибка или даст возможность оптимизировать процесс выделения для получения более качественного результата

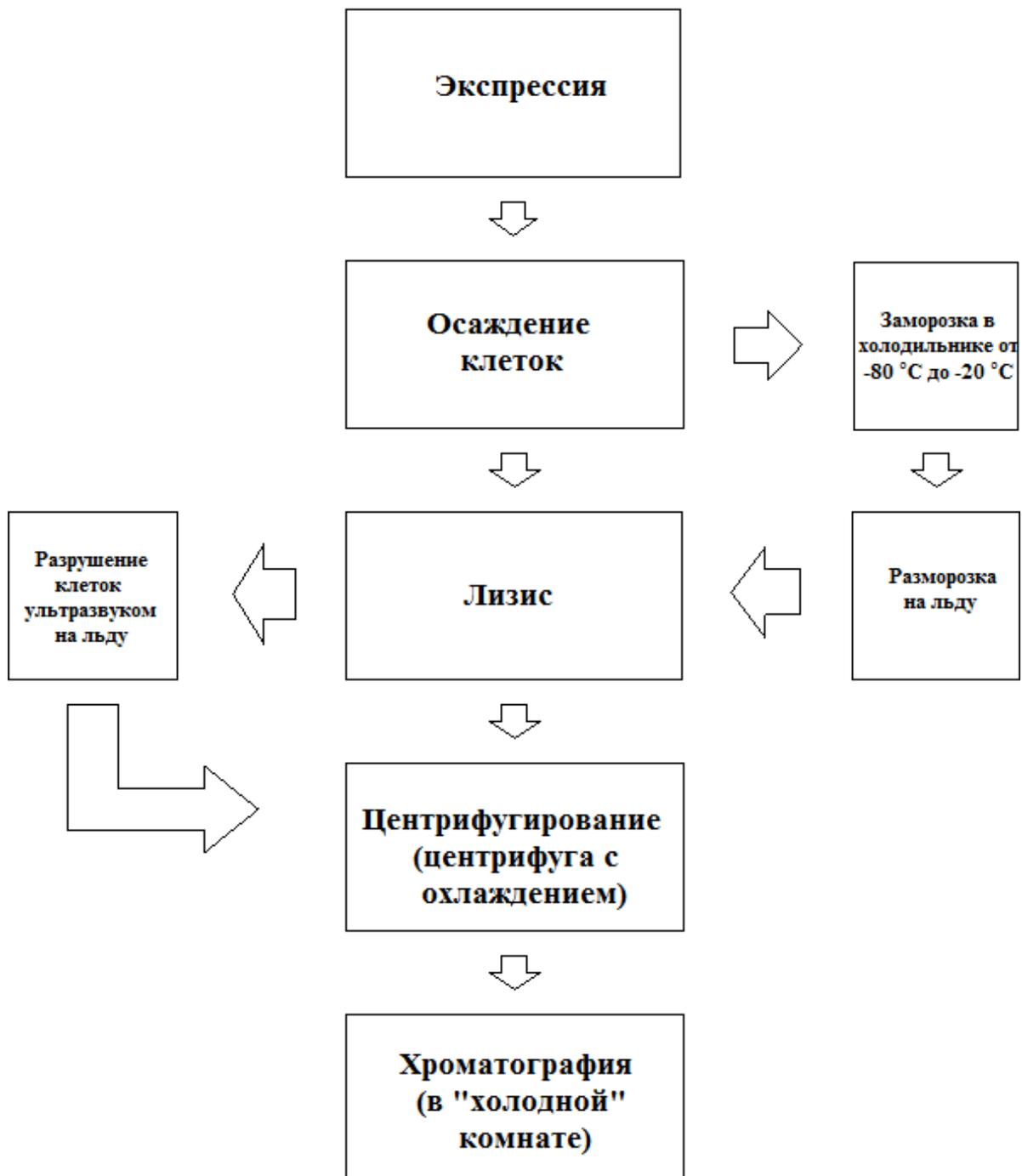


Схема 1. Общий план эксперимента

Протокол выделения и очистки белка

Данная процедура разработана для штаммов *E.coli*, которые содержат плазмидные конструкции, экспрессирующие белки

1. Разморозить клетки выставив их в лед (в зависимости от условий, клетки могут храниться в интервале температур от -80°C до -20°C). Этот этап пропускается, если работа ведется со свежесаживаемыми клетками.

2. К осажденным или размороженным клеткам добавляют лизисный буфер. Соотношение объема буфера и массы клеток может варьировать и зависит от конкретного эксперимента, например: метод разрушения клеток, объемы посуды для центрифугирования и т.д.. Чаще всего применяют соотношение 5 мл буфера к 1 гр клеток.

Лизисный буфер готовят непосредственно перед разрушением клеток, например, пока идет размораживание клеток.

В состав лизисного буфера входят:

- PIC (Protein inhibition cocktail) – ингибиторы протеаз; необходимы для защиты выделяемого белка от протеаз

- DNase – необходимы для снижения вязкости – они расщепляют DNA клетки

Для выделения так же может быть использован ряд других компонентов, которые могут добавляться в зависимости от особенностей протокола, выделяемого белка и метода очистки

Чаще всего, состав лизисного буфера схож с составом буфера для посадки белка на хроматографическую колонку. В противном случае необходимо произвести замену буфера путем диализа¹.

3. Одним из часто используемых методов является ультразвуковое разрушение клеток. Достоинством данного метода является простота процедуры и относительная дешевизна оборудования. Недостатком метода является примерно 50% выход, поскольку разрушается не более 50 % клеток.

Мы предлагаем следующий протокол применения ультразвука который включает в себя 4 секундный цикл: 2 секунды ультразвука, 2 секунды покоя. Но так как не все ультразвуковые оборудования имеют программы настройки, применяют циклы удобные экспериментатору, например 30 сек ультразвука, 30 сек покоя². На 1 гр клеток приходится 3 минуты работы ультразвука. Рекомендуется делать перерыв в работе ультразвука, чтоб ваш раствор с разрушенными и еще не разрушенными клетками остыл. Ультразвуковое разрушения клеток – процесс с большим тепловыделением, поэтому его проводят на холоду, на практике это значит, что ваш сосуд с раствором клеток окружен снегом или льдом. Это защищает белки от тепловой денатурации и других возможных химических реакций в клетке.

5. Следующий этап работы включает центрифугирование разрушенных клеток, целью которого является осаждения не разрушенных клеток и клеточного дебриса и иных больших соединений и комплексов клеток. Центрифугирования проводят в два этапа. Вначале осаждают самые тяжелые фрагменты клеток и не разрушенные клетки, а потом с использованием ультрацентрифугирования осаждают рибосомальные комплексы и соединения схожей массы. Вероятно, можно по-разному модифицировать данный этап,

¹ При работе с белком, ранее выделенным и очищенным другими экспериментаторами, необходимо ознакомиться с их протоколами и результатами очистки.

² Внимание, ультразвук вреден для здоровья, при проведения данной процедуры на вас должны быть наушники.

главной целью которого является получения в супернатанте растворенного белка. Любые процессы связанные с выделением и очисткой белка следует проводить при охлаждении, в том числе и центрифугирование. С каждого шага работы отбираем аликвоты (20-50 мкл) для электрофоретического анализа, это необходимо для проверки наличия белка в растворе и если в конечном итоге белка не будет, то с помощью отобранных аликвот, пойдем на каком этапе работы теряем белок.

1. Используется центрифуга Beckman J21 i rotor JA25. Центрифугу необходимо включить заранее и довести температуру внутри нее до 4°C. Переливаем раствор разрушенных клеток в центрифужные фальконы. Уравновешиваем их и загружаем в центрифугу. Для первого центрифугирования ставим 25000³ rpm оборотов в минуту (30 000g). Центрифугирование будет происходить в течении 30 минут.

2. Отбираем супернатант S30 и используем для следующего центрифугирования при 43000 rpm (225000 g) в течении 1 часа при 4 °C. После этого центрифугирования получаем супернатант S100, который можно использовать для хроматографии.

Хроматографическая очистка полученного супернатанта с целью выделения интересующего белка.

Если предыдущие этапы работы в общих чертах для большинства молекул схожи, то метод хроматографии предполагает избирательный подход.

1. В зависимости от того какой белок выделяете, выбирается тип хроматографии и хроматографическая колонка. Если ваш белок имеет tag (так был клонирован белок), то на первом этапе обычно выбирается аффинная

³ Указанные значения оборотов в rpm для разных центрифуг и роторов различны, в то время как обозначения оборотов g чаще схожее у всех оборудований. В инструкции по работе с центрифугами и прилагаемыми к ним роторам можно найти таблицы переводов значения.

хроматография и в зависимости от tag колонка для His или GST. Это позволяет вам благодаря tag связать белок с колонкой, а потом элюировать. Tag – это определенный субстрат, который ковалентно связан с вашим исследуемым белком и позволяет вам выделить его из раствора других белков, в следствии особых связывающих свойств с колонкой. В качестве примера часто используемых tag можно привести белок GST или пептид из шести аминокислотных остатка His.

2. Если при выделении белка из клетки вы использовали буфер по составу значительно отличающийся от буфера для посадки белка на колонку, вам необходимо поменять раствор в котором находится ваш белок. Для этого используют специальные диализные мешочки. Вы переносите супернатант S100, после второго центрифугирования, в диализный мешочек и помещаете мешочек в емкость с буфером для хроматографии. Объем вашего мешочка к емкости буфера должен иметь соотношение 1:100 (то есть, если у вас 20 мл супернатанта, то емкость с буфером должна быть 2000 мл), подобное соотношение позволить вам заменить лизисный буфер на буфер для посадки белка на колонку. Рекомендуется провести процедуру диализа 2-3 раза с временем диализа 2-4 часа, для полной смены буфера.

3. Выбрав колонку, заменив буфер в котором находится белок, необходимо выбрать или разработать метод посадки и дальнейшего элюирования белка с колонки. В качестве примера, предположим, что наш белок содержит His tag. Для такого белка используют буфер с содержанием имидазола, с низкой концентрацией для посадки на колонку и с высокой концентрацией (чаще в 100 раз больше чем для посадки) для элюирования с колонки. Процесс элюирования может быть градиентным или ступенчатым. При первом, концентрация имидазола будет постепенно повышаться до тех пор, пока не достигнет своего максимума, при этом с колонки все будет смываться постепенно, и на графике хроматографии сможем увидеть смыв всех макромолекул, которые связываются с колонкой. При втором способе,

концентрация второго буфера (с высоким содержанием имидазола) будет увеличиваться резко, в зависимости от того какие ступени увеличения будут заданы.

4. Схема протокола хроматографии включает в себя 4 стадии: посадка белка, смыв с колонки всего, что не связалось с колонкой, элюирование белка и отмывка с колонки от всего, что не элюировалось в зоне белка.

5. На всех этапах хроматографии собирают фракции для их анализа на содержании белкового компонента. При элюировании сбор фракций идет в небольших объемах, для того, чтобы получить наиболее чистую фракцию очищаемого белка.

После завершения хроматографии проводят измерение всех отобранных фракций (в том числе и аликвот) на содержании белкового компонента, для этого можно использовать NanoDrop – спектрофотометр для малых объемов. Основываясь на профиле элюции отбирают фракции хроматографии для электрофореза, совместно с отобранными аликвотами при других этапах выделения белка.

Электрофорез покажет степень чистоты полученных фракций. Самые чистые фракции можно объединить и заморозить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Если степень чистоты белковых фракций не удовлетворяет, то так же проводят ионообменную хроматографию. В зависимости от заряда вашего белка, или катион- или анион-обменную. Если заряд белка положительный, то выбирается колонка содержащая в качестве акцептора лиганд с отрицательным зарядом, в таком случае произойдет связывание белка с лигандом и наоборот, если заряд белка отрицательный, то лиганд положительно заряженный. Далее происходит элюирование белка, в ходе которого постепенно увеличивается концентрация элюирующего буфера и отщепление от лиганда соединенных молекул, в том числе и исследуемого белка. Фракции полученные после элюированию проверяют на электрофорезе, для определения в какой именно

момент произошло отщепление исследуемого белка от лиганда. Фракции собранные в данном диапазоне собирают и хранят при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Есть и иные типы хроматографии и в каждом случае, выделении и очистки белка, необходимо продумывать весь цикл работы с учетом и хроматографии и выделения и наличием тех и иных химических реагентов в лаборатории.

В некоторых случаях белок бывает не растворим, то есть его нельзя обнаружить во фракции супернатанта. Тогда прибегают к различным манипуляциям, добавляют различные реагенты, позволяющие сделать белок растворимым. Мочевина или различные не ионные детергенты позволяют частично денатурировать белок и увеличить его растворимость. Данный процесс является для каждого конкретного белка индивидуальным и требует от экспериментатора знаний в области и молекулярной биологии и практических навыков.

Протокол выделения и очистки белка
на примере SaHpf (белок - His-GST-SaHpf)

1. К размороженным клеткам добавляем лизисный буфер (соотношение 1 гр : 2,5 мл)

2. Разрушаем клетки ультразвуком

3. Центрифугируем 25000 rpm, 30 мин при 4 °С, Beckman J21, rotor JA25.

4. Отбираем супернатант, центрифугируем его при 43000 rpm, 30 мин при 4 °С, Beckman L8, rotor Ti 45.

5.A. Отбираем супернатант S100, наносим на аффинную колонку (хроматография). Колонка HisTrap HP, матрица – 6% агароза, содержит 15 мкмоль/мл Ni^{+2} , объем – 5 мл.

Раствор белка наносился на колонку со скоростью 1,5 мл/мин.

5.B. Элюирование.

Элюирование происходило со скоростью 1 мл/мин. Объем фракции – 1 мл, всего было собрано 60 мл раствора, который содержал белок, по данным хроматографии.

6. Отобранные фракции после хроматографии (рис.1) и аликвоты при центрифугирования наносим на гель, проводим электрофорез (рис.2)

7. Оцениваем степень чистоты отобранных фракций

8. Объединяем наиболее чистые фракции для следующей хроматографии, анионообменной.

9. Наносим объединенные фракции на анионообменную колонку (рис.3).

Колонка Mono Q HR, матрица – 6% агароза, 0.27–0.37 ммоль/мл $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, объем – 5 мл.

Раствор белка наносился на колонку со скоростью 1,5 мл/мин. Элюирование происходило со скоростью 1 мл/мин. Объем фракции – 1 мл, всего было собрано 60 мл раствора, который содержал белок, по данным хроматографии.

10. Отбираем фракции и проводим с ними электрофорез (рис.4), для определения в каких фракциях содержится исследуемый белок и степени его чистоты

Состав буферов

Лизисный буфер – 50 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazol + (на 20 г клеток) 50 мкл DNase ,500 мкл PIC (ингибитор протеазы)

Буфер для посадки белка на аффинную колонку - 50 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazol

Буфер для элюирования - 50 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Метод элюирования – градиентный, от 0% до 100% буфера для элюирования в течении 100 мл, то есть концентрация второго буфера увеличивается по 1% на каждый следующий мл элюирования

Буфер для посадки белка на анионообменную хроматографию – 20 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1mM DTT

Буфер для элюирования - 20 mM TrisHCl pH 8.0, 500 mM KCl, 1mM DTT

Метод элюирования градиентный, в течении 120 мл.

Иллюстрационный материал

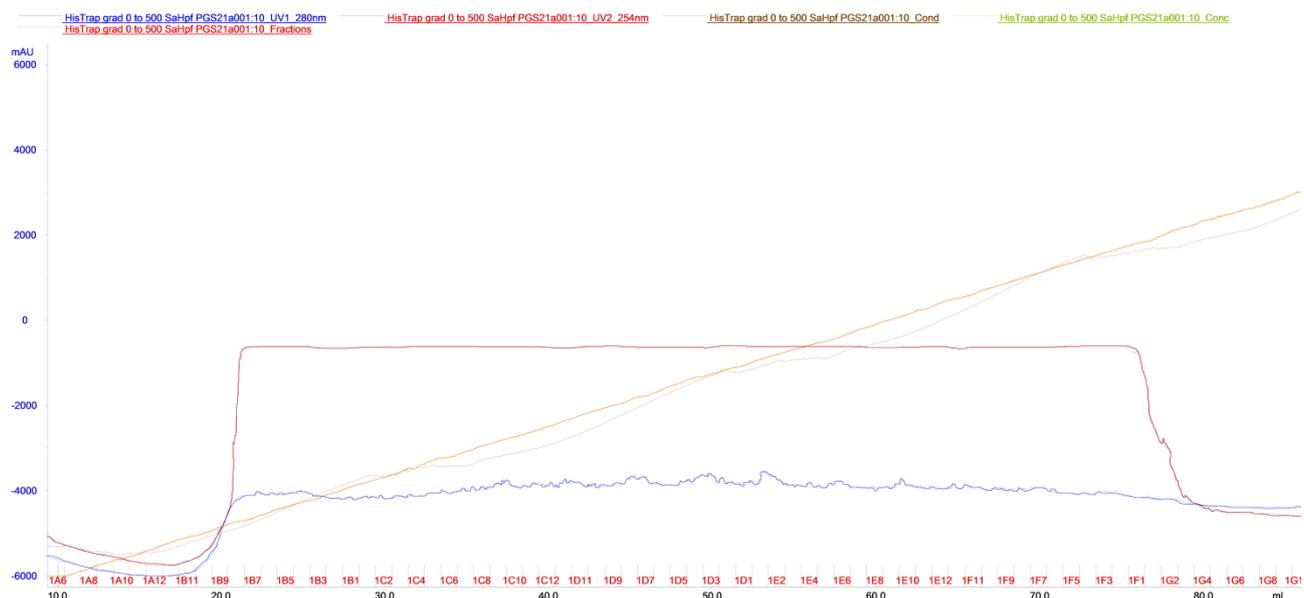
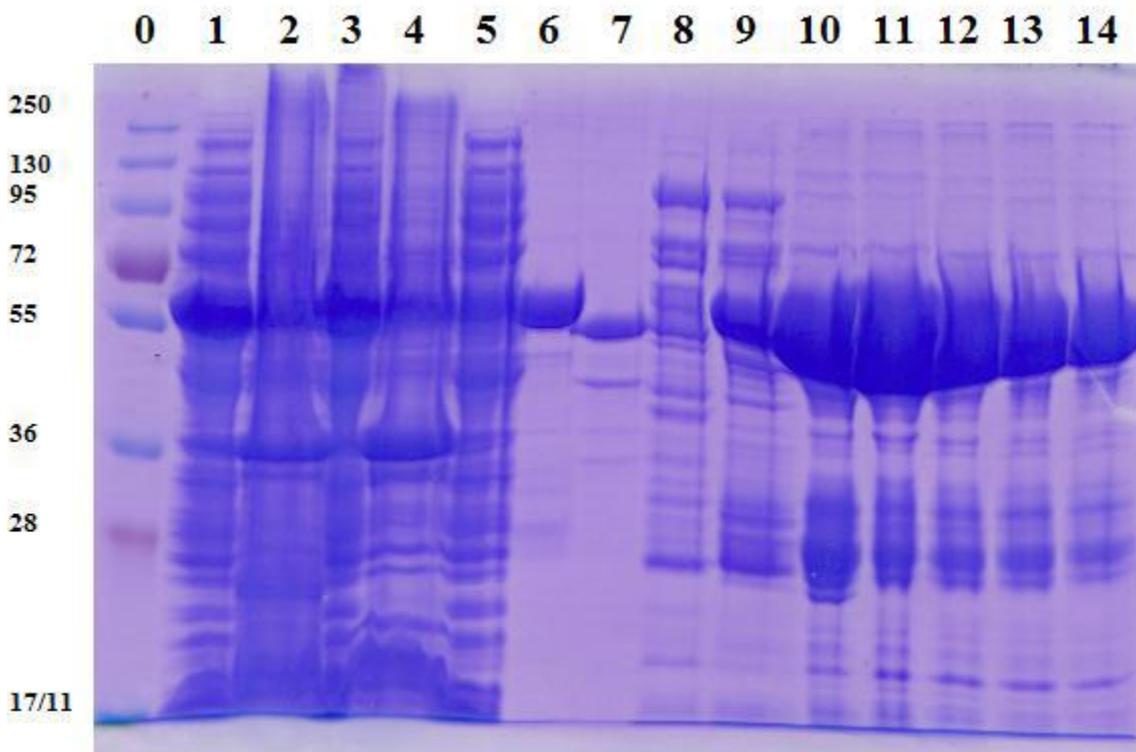


Рис.1 График аффинной хроматографии

Пояснение к рисунку 1.

На рис.1, показаны результаты анализа фракции аффинной хроматографии белка SaHpf. Шкала слева показывает концентрация измеряемого раствора (синие цифры). Шкала снизу отмечает объем раствора пройденного через колонку (черные цифры) и показывает номера фракций в собираемой плашке (красные цифры с буквами). Лини на графики значение концентрации того или иного содержимого в растворе. Кривая постоянного роста показывает увеличение концентрации элюирующего буфера. Кривая синего цвета (самая нижняя) показывает концентрацию при 260 нм, чаще всего в этом диапазоне измеряется концентрация нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). Кривая с широким плато показывает концентрация объекта при 280 нм, в данной области измеряют концентрацию белковых растворов.



Электрофорез различных стадий выделения и очистки SaHpf (His-GST-SaHpf). 6.08.2014

0 - маркер, 4 мкл. 1 - супернатант после первого центрифугирования, 300 мОД; 2 - лизат после первого центрифугирования, 300 мОД; 3 - супернатант после второго центрифугирования, 300 мОД; 4 - лизат после второго центрифугирования, 300 мОД; 5 - то что не село на колонку, 300 мОД; 6 - промывка колонки имидазолом 500 мМ после элюирования, 300 мОД; 7 - первое выделение этого белка (22.07.2014); далее номера элюированных фракций по 10 мкл: 8 - 1B9, 9 - 1C2, 10 - 1C12, 11 - 1D3, 12 - 1E8, 13 - 1F7, 14 - 1G1.

Рис.2 Электрофорез после аффинной хроматографии

Пояснение к рисунку 2.

На рис. 2 показаны результаты электрофоретического анализа различных стадий выделения и очистки белка. В лунке 0 – показан разбег маркера, белкового раствора с белками у которых известна молекулярная масса. В лунках 1-4 показаны распределения по массе компонентов фракций при выделении белка. Полоски очень размыты, что говорит о перегрузке линии, то есть для четкого видения линий нужно было добавить раствор с меньшей концентраций (развести первоначальный раствор) или в меньшем объеме. Однако целью данного электрофореза являлось попытка определить, сколько исследуемого белка было в каждом этапе выделения (или белков схожей молекулярной массы). Остальные фракции – этапы очистки, тоже были добавлены в избытке, но в данном случае для того, чтобы было можно увидеть количество примесей в каждой фракции. В строке напротив «55» линии изгибаются, это характерное явление при избытке белка (ов) с одинаковой молекулярной массой, в нашем случае это наш выделяемый белок.

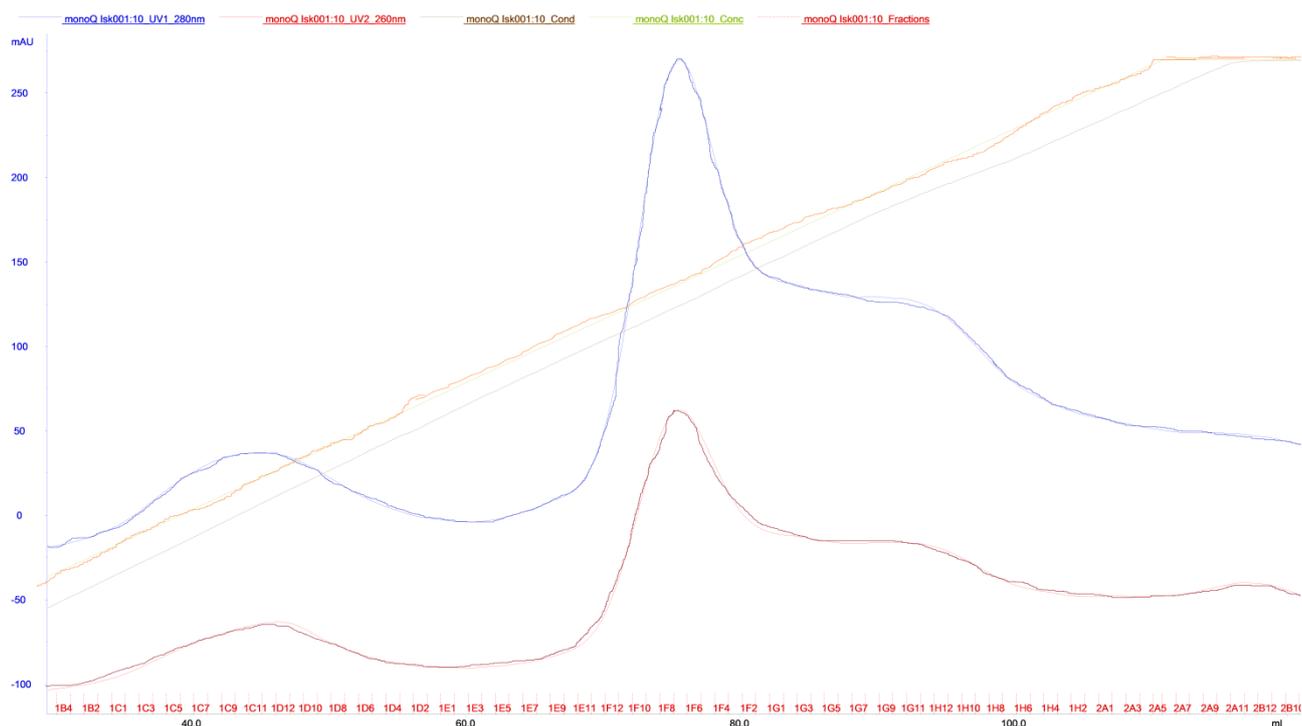
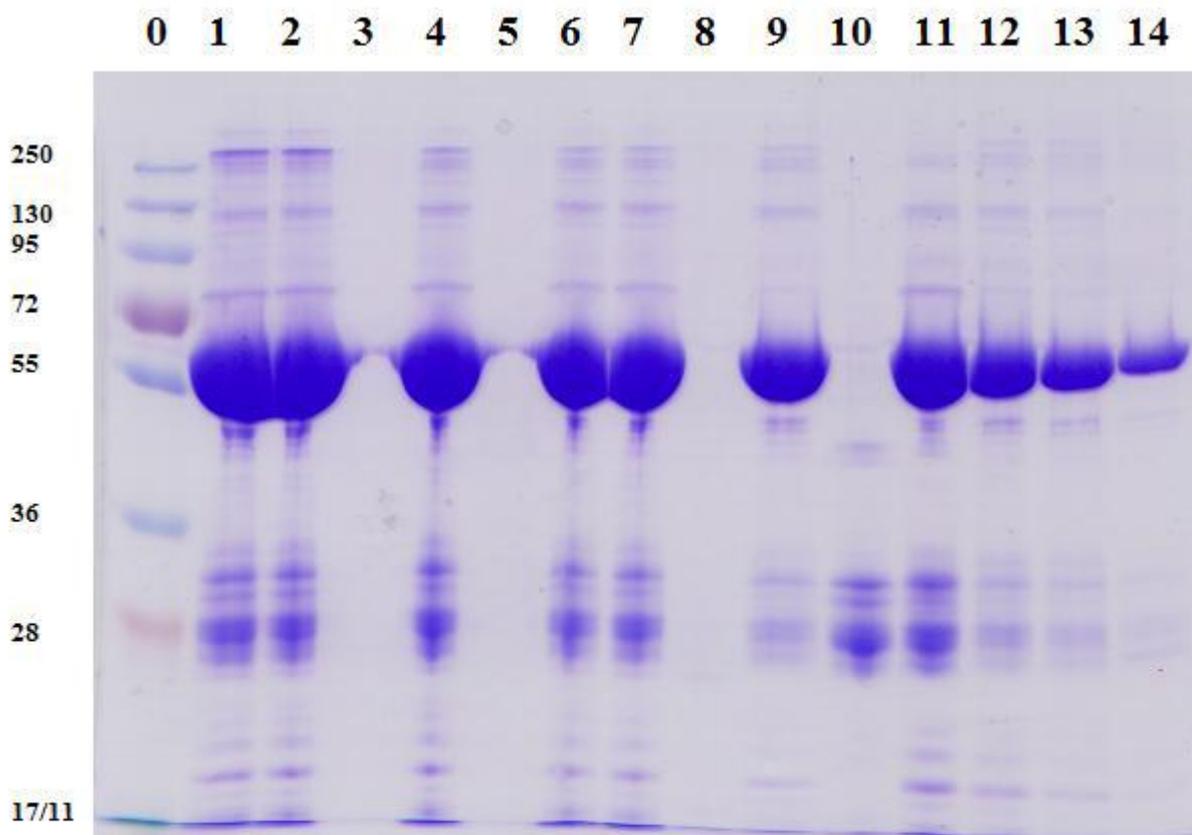


Рис.3 График анионообменной хроматографии

Пояснение к рисунку 3.

Шкала слева показывает концентрация измеряемого раствора (синие цифры). Шкала снизу отмечает объем раствора пройденного через колонку (черные цифры) и показывает номера фракций в собираемой плашке (красные цифры с буквами). Лини на графики значение концентрации того или иного содержимого в растворе. Кривая постоянного роста показывает увеличение концентрации элюирующего буфера. Кривая синего цвета (имеющий самый высокий пик) показывает концентрацию при 260 нм, чаще всего в этом диапазоне измеряется концентрация нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). Кривая красного цвета с маленькими пиками показывает концентрация объекта при 280 нм, в данной области измеряют концентрацию белковых растворов.

Результаты, показанные на рис.3 говорят о разделении нашего белкового раствора на две фракции (маленький и большой красные пики), в зависимости от заряда белка. Таким образом, мы смогли очистить раствор с исследуемым белком от части примесей.



Электрофорез после анионообменной хроматографии (7.08.2014) фракций белка SaHpf (His-GST-SaHpf) полученных после аффинной хроматографии (6.08.2014).

7.08.2014

0 - маркер, 4 мкл. 1 - фракция после аффинной хроматографии, 30 мОД; 2 - концентрирование фракции после аффинной хроматографии, 30 мОД; 3 - пропуск при концентрировании, 13 мкл; 4 - концентрирования и разведения фракции после концентрирования (2), 30 мОД; 5 - пропуск при (4), 13 мкл; 6 - после изменения буфера (разведения (4) до 100 мл буфером А), 13 мкл; 7 - образец (6) после фильтрации, 13 мкл; 8 - пропуск анионообменной хроматографии, 13 мкл; 9 - отмывка после элюирования, 13 мкл; далее фракции после анионообменной хроматографии, 10 мкл: 10 - 1C10, 11 - 1F8, 12 - 1G9, 13 - 1H8, 14 - 2B12.

Рис.4 Электрофорез после анионообменной хроматографии

Пояснение к рисунку 4.

На рис. 4 показаны результаты электрофоретического анализа после очистки методом анионообменной хроматографии. В лунке 0 – показан разбег маркера, белкового раствора с белками у которых известна молекулярная масса. В лунках 1-7 показаны распределения по массе компонентов фракций после различных манипуляций с раствором белка. Остальные фракции получены после анионообменной хроматографии.

Сравнивая рис. 2 и 4 мы можем оценить степень очистки белкового раствора после анионообменной хроматографии. Однако, полученный результат не достаточен. Если работа требует более высокой степени чистоты белка, то необходимо продолжить очистку белкового раствора другими методами.

Вопросы по учебно-методическому пособию

1. Назовите главные условия при выделении белков.
2. Перечислите этапы предшествующие выделению и очистки белка.
3. Опишите ход работы при выделения белков.
4. Какие компоненты необходимо обязательно добавить при выделении белков?
5. Разрушение клеток ультразвуком, плюсы и минусы.
6. Центрифугирование, основные положения метода.
7. Суть метода хроматографии.
8. Tag, что это и для чего?
9. Перечислите этапы хроматографии.
10. Какие типы хроматографии есть?
11. Какие способы элюирования знаете?
12. Как можно проверить наличие белка в растворе?

Список литературы

1. http://wolfson.huji.ac.il/purification/Purification_Protocols.html
2. <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/Home/en/GELifeSciences/>
3. http://www.piboc.dvo.ru/structure/ext_labs/LabEnzymChem/protein_purification.pdf
4. Скоупс Р. Методы очистки белков // Из-во: Мир, Москва – 1985 г., 358 с.
5. <http://molbiol.edu.ru/>