

## 11. Классификация белков по функции.

Ферменты, классификация ферментов (примеры для основных групп по ЕС - «Enzyme Commission»/«классификация ферментов»).

Хроматографические методы разделения белков: гель-фильтрация, ионообменная хр-я, обращённая фаза, аффинная хр-я.

## Классификация белков по функциям

**1. Ферменты** - специализированные белки, ускоряющие течение химических реакций. Благодаря ферментам в клетке скорости химических реакций возрастают в миллионы раз. Так как ферменты, как и любые белки, имеют активный центр, они специфически связывают определённый лиганд (или группу похожих лигандов) и катализируют определённый тип химического превращения данной молекулы. Например, протеолитический фермент трипсин разрушает в белках пептидные связи, образованные карбоксильной группой основных аминокислот - аргинина или лизина. Фермент рибонуклеаза расщепляет фосфоэфирную связь между нуклеотидами в полинуклеотидной цепи.

**2. Регуляторные белки** - большую группу белковых гормонов, участвующих в поддержании постоянства внутренней среды организма, которые воздействуют на специфические клетки-мишени. Например, гормон инсулин выделяется в кровь при повышении концентрации глюкозы в крови после еды и, стимулируя использование глюкозы клетками, снижает концентрацию глюкозы до нормы, т.е. восстанавливает гомеостаз.

Кроме того, к регуляторным относят белки, присоединение которых к другим белкам или иным структурам клетки регулирует их функцию. Например, белок кальмодулин в комплексе с четырьмя ионами  $\text{Ca}^{2+}$  может присоединяться к некоторым ферментам, меняя их активность.

Регуляторные ДНК-связывающие белки, присоединяясь в определённые моменты к специфичным участкам ДНК, могут регулировать скорость считывания генетической информации.

**3. Рецепторные белки** Сигнальные молекулы (гормоны, нейромедиаторы) действуют на внутриклеточные процессы через взаимодействие со специфическими белками-рецепторами. Так, гормоны, циркулирующие в крови, находят клетки-мишени и воздействуют на них, специфично связываясь с белками-рецепторами, обычно встроенными в клеточную мембрану. Для гидрофобных регуляторных молекул, проходящих через клеточную мембрану, рецепторы локализуются в цитоплазме клеток.

**4. Транспортные белки** Многие белки крови участвуют в переносе специфических лигандов из одного органа к другому. Часто в комплексе с белками переносятся молекулы, плохо растворимые в воде. Так, белок плазмы крови альбумин переносит жирные кислоты и билирубин (продукт распада гемоглобина эритроцитов), а гемоглобин эритроцитов

участвует в переносе  $O_2$  от лёгких к тканям. Стероидные гормоны переносятся в крови специфическими транспортными белками.

Транспортные белки участвуют также в переносе гидрофильных веществ через гидрофобные мембраны. Так как транспортные белки обладают свойством специфичности взаимодействия с лигандами, их набор в клеточной мембране определяет, какие гидрофильные молекулы могут пройти в данную клетку. С помощью белков-переносчиков в клетку проникают глюкоза, аминокислоты, ионы и другие молекулы.

**5. Структурные белки** Некоторые белки, расположенные определённым образом в тканях, придают им форму, создают опору, определяют механические свойства данной ткани. Например, как уже говорилось выше, главным компонентом хрящей и сухожилий является фибриллярный белок коллаген, имеющий высокую прочность. Другой структурный белок (эластин) благодаря своему уникальному строению обеспечивает определённым тканям свойство растягиваться во всех направлениях (сосуды, лёгкие).

**6. Защитные белки** Некоторые белки, в частности иммуноглобулины, обладают способностью узнавать и связывать чужеродные молекулы, вирусные частицы и бактерии, в результате чего происходит их нейтрализация. Кроме того, комплекс чужеродной частицы с иммуноглобулином легко узнаётся и уничтожается клетками иммунной системы.

Защитными свойствами обладают белки свёртывающей системы крови, например фибриноген, тромбин. Они участвуют в формировании тромба, который закупоривает повреждённый сосуд и препятствует потере крови.

**7. Сократительные белки** Некоторые белки при выполнении своих функций наделяют клетку способностью либо сокращаться, либо передвигаться. К таким белкам относят актин и миозин - фибриллярные белки, участвующие в сокращении скелетных мышц. Другой пример таких белков - тубулин, из которого построены клеточные органеллы - микротрубочки. Микротрубочки в период деления клетки регулируют расхождение хроматид. Микротрубочки - важные элементы ресничек и жгутиков, с помощью которых клетки передвигаются.

## Классификация ферментов

По типу катализируемых реакций ферменты подразделяются на 6 классов согласно иерархической классификации ферментов (КФ, ЕС — Enzyme Comission code). Классификация была предложена Международным союзом биохимии и молекулярной биологии (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Каждый класс содержит подклассы, так что фермент описывается совокупностью четырёх чисел, разделённых точками. Например, пепсин имеет название ЕС 3.4.23.1. Первое число грубо описывает механизм реакции, катализируемой ферментом:

- **ЕС 1:** Оксидоредуктазы, катализирующие окисление или восстановление. Пример: каталаза, алкогольдегидрогеназа

- **ЕС 2:** Трансферазы, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую. Среди трансфераз особо выделяют киназы, переносящие фосфатную группу, как правило, с молекулы АТФ.
- **ЕС 3:** Гидролазы, катализирующие гидролиз химических связей. Пример: эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза, липопроотеинлипаза
- **ЕС 4:** Лиазы, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов.
- **ЕС 5:** Изомеразы, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата.
- **ЕС 6:** Лигаза, катализирующие образование химических связей между субстратами за счет гидролиза АТФ. Пример: ДНК-полимераза. Будучи катализаторами, ферменты ускоряют как прямую, так и обратную реакции, поэтому, например, лиазы способны катализировать и обратную реакцию — присоединение по двойным связям. Полная номенклатура отражена на сайте <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

Однако, такая классификация не учитывает структурные особенности молекул ферментов и слабо отражает молекулярный механизм их действия. Кроме того, классификация, основанная преимущественно на субстратной специфичности, не принимает во внимание эволюционные процессы, такие как дивергенция или конвергентная эволюция.

Другая проблема номенклатуры ферментов состоит в том, что она не подходит для ферментов, проявляющих широкую специфичность (т.е. для тех, которые действуют на различные субстраты). Очевидно, что имеется прямая взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и пространственной структурой молекул (Chothia, Lesk, 1986). С 1985 года начато систематическое сравнение первичных последовательностей гликозилгидролаз (Gilkes et al., 1991; Henrissat, 1991).

В процессе этого сравнения возникла классификация, основанная на структурном сходстве молекул, и образованы семейства, объединяющие различные ферменты со сходной субстратной специфичностью. Классификация, которая отражает сходство первичной структуры ферментов (следовательно, структурное сходство) безусловно, полезна, особенно при быстро растущем числе расшифрованных генов гликозилгидролаз, и способствует увеличению числа установленных третичных структур. Предложенная Henrissat классификационная система коррелирует со структурой и молекулярным механизмом действия ферментов, что позволяет делать предположения относительно каталитических остатков и даже третичной структуры О-гликозилгидролаз. Однако, при таком подходе к систематизации ферментов в те или иные классы ферментов неизбежно попадают белки, функция которых может быть весьма далека от ферментативной трансформации углеводов. Например, некаталитические белки, которые могут специфически связываться с углеводами. Поэтому, тип катализируемого процесса не является отныне абсолютным критерием для классификации фермента. Более того, по мере накопления данных о структуре белков последняя все отчетливее выходит на первый план.

## Разделение белков методом хроматографии

<https://elib.bsu.by/bitstream/123456789/105662/1/Лаб.%20практикум%20выд.%20и%20оч.методичка.pdf>

Принцип метода. Простейшее устройство для хроматографического разделения на колонках изображено на рис. 1.4.

Колонки – полые стеклянные трубки, размер которых зависит от целей работы и способа разделения. В основание колонки впаивают пористую стеклянную пластинку или перфорированный диск (2). Необходимо следить за тем, чтобы «мертвое» пространство под диском, между ним и основанием колонки, а также внутренний диаметр шлангов, по которым выходящий из колонки элюат поступает в коллектор фракций (рис. 1.4), было минимальным. В противном случае происходит смешивание уже разделенных веществ. Коммерческие колонки снабжены специальными приспособлениями – концевыми адаптерами переменной длины (10), которые позволяют регулировать длину колонки и сводят к минимуму перемешивание элюируемых фракций.

Заполнение колонки. Колонку укрепляют строго вертикально, закрывают нижний кран (зажим) (4) и наливают в нее примерно на 1/3 ее объема дистиллированной воды. Энергичными движениями стеклянного поршня (8) освобождают пространство под регистрирующим устройством и (или) коллектором фракций диском от пузырьков воздуха. На диск с помощью поршня помещают кружок фильтровальной бумаги, по размерам точно соответствующий внутреннему диаметру колонки. Поршень осторожно вынимают, следя за тем, чтобы в колонку не попали пузырьки воздуха. Через воронку или по палочке наливают в колонку густую, тщательно взмученную взвесь используемого сорбента так, чтобы жидкость стекала по стенке колонки и не увлекала в свою толщу пузырьков воздуха. Суспензии дают осесть, через несколько минут открывают кран и продолжают наполнение колонки, постепенно подливая следующие порции взвеси. Во избежание слишком сильного уплотнения сорбента заполнение колонки производят при небольшом давлении (особенно важно следить за этим при работе с гелем сефадекса). Давление определяет величина  $h$  – разница между уровнем жидкости над сорбентом в колонке (или присоединенном к ней верхнем резервуаре) и положением конца шланга, по которому элюат вытекает из колонки. Необходимо следить за тем, чтобы наполнение колонки было равномерным.

Заполнив колонку до нужной высоты, закрывают нижний кран (зажим) и дают суспензии осесть, не допуская «высыхания» наполнителя в колонке (для этого над верхним слоем сорбента всегда должен находиться слой растворителя). Следят также за тем, чтобы верхний слой наполнителя имел гладкую

горизонтальную поверхность. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя при внесении в колонку образца над ним иногда помещают кружок фильтровальной бумаги или поролона. Колонку закрывают пробкой с отво-

дом или со стеклянной трубкой и присоединяют к резервуару, как показано на рис. 1.4, содержащему элюирующий раствор. Для поддержания постоянного давления и сохранения постоянной скорости тока жидкости через колонку используют склянку Мариотта или насосы различных конструкций.

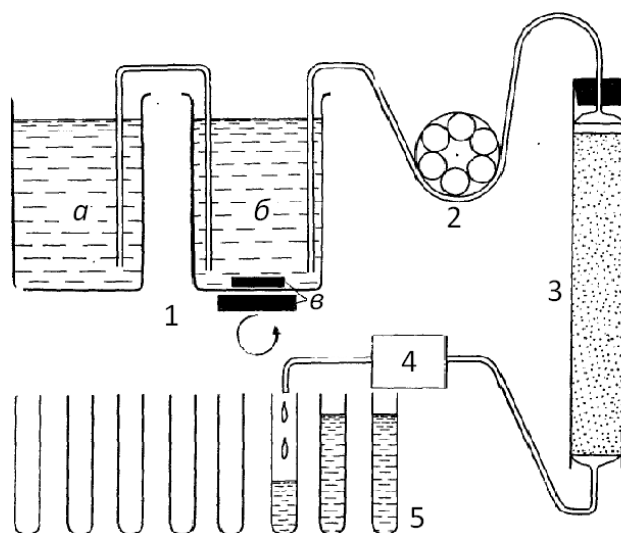


Рис. 1.3 – Схема устройства для колоночной хроматографии.

1 – прибор для создания линейного градиента (а – сосуд с раствором высокой концентрации; б – сосуд-смеситель; в – магнитная мешалка); 2 – перистальтический насос; 3 – колонка; 4 – УФ-детектор; 5 – коллектор фракций.

Внесение образца в колонку можно производить несколькими способами. Самый простой из них заключается в следующем: жидкость с поверхности наполнителя осторожно удаляют, оставляя слой в 1–2 мм; при помощи пипетки осторожно вносят образец и, открыв нижний кран, дают ему впитаться; остатки образца над сорбентом смывают небольшой порцией элюента; после того как он впитается поверхностью наполнителя, добавляют новые порции элюирующего раствора, создавая слой в 5–10 см.

После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, устанавливают необходимую скорость протекания элюирующего раствора путем изменения рабочего давления и начинают сбор фракций с помощью коллектора. Собирать фракции элюата необходимо с момента нанесения образца на колонку. Фракции можно собирать в пробирку по объему (с помо-

щью сифонов), по определенному количеству капель или через определенные промежутки времени.

Элюирование разделяемых веществ с колонок, как правило, проводят растворами, изменяя рН, ионную силу (концентрацию) или оба показателя одновременно. При этом градиент рН и ионной силы может быть ступенчатым или непрерывным (плавным). При создании ступенчатого градиента пользуются серией буферных растворов, пропускаемых через колонку последовательно один за другим. При этом виде элюции каждый из элюирующих буферных растворов пропускают через колонку до тех пор, пока концентрация белка в вытекающем из колонки элюате, пройдя через максимум, не снизится почти до исходных фоновых значений.

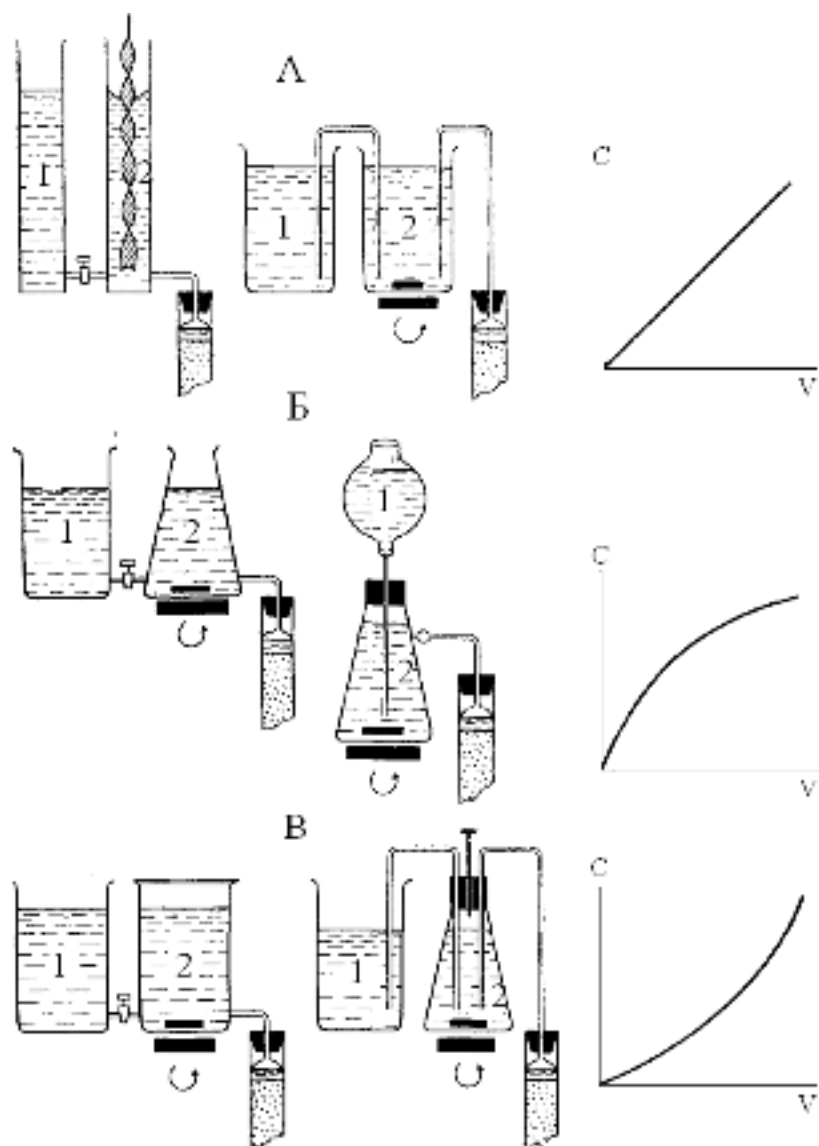


Рис. 1.4 – Приборы для создания градиента концентрации: А – линейного, Б – выпуклого, В – вогнутого

При непрерывном градиенте элюции изменение ионной силы и (или) pH элюирующего раствора происходит постепенно, по линейной или нелинейной зависимости от объема протекающей жидкости. Линейное изменение ионной силы или pH элюирующего раствора происходит тогда, когда эти па-

параметры изменяются пропорционально объему протекающей жидкости. Получить линейный градиент можно с помощью прибора, состоящего из двух соединенных между собой одинаковых сосудов, установленных на одном уровне (рис. 1.4, А). В одном сосуде (1) находится буферный раствор со значением ионной силы (или pH), которое должно быть достигнуто к концу опыта, в другом смесителе (2), из которого раствор поступает непосредственно в колонку, вначале находится равный объем исходного буферного раствора. Часто применяют «выпуклый» или «вогнутый» градиенты, при которых ионная сила раствора увеличивается или уменьшается соответственно

8

по экспоненциальной зависимости. Форму этих градиентов легко получить с помощью простого устройства, изображенного на рис. 1.4, Б, В.

### 1.2.1 Метод гель-хроматографии

**Принцип метода.** Гель-хроматография (гель-фильтрация) – фракционирование смеси компонентов по размерам молекул путем прохождения их через гели с определенной величиной пор.

Раствор, содержащий смесь двух и более веществ, отличающихся по размеру молекул, а, следовательно, и по молекулярной массе, вносят в колонку, заполненную гелем с сетчатой структурой и уравновешенную буферным раствором. Наибольшей скоростью продвижения по колонке обладают компоненты раствора, размеры молекул которых больше пор геля. Такие компоненты не проникают в гранулы гелевой фазы и выходят из колонки первыми. Более мелкие молекулы, способные проникать внутрь геля, непрерывно обмениваются между жидкими фазами внутри и вне геля и продвигаются по колонке значительно медленнее. Находящиеся в растворе самые маленькие частицы (например, неорганические соли) выходят из колонки последними. На этом принципе основаны методы фракционирования белков и других полимеров, их обессоливание, определение молекулярной массы, замена одних буферных растворов другими и др.

Наиболее широкое распространение среди носителей для гель-хроматографии белков получили сорбенты, приготовленные на основе декстрана (сефадексы, сефакрилы, молселекты), полиакриламида (биогели Р, акрилексы) и агарозы (сефарозы, биогели А) и др. Набухая в воде, они образуют гели.

Сефадексы – продукты взаимодействия полисахарида декстрана с эпихлоргидрином. Они устойчивы к органическим растворителям, растворам



щелочей и разбавленных кислот (до 0,1 н.). Рабочий диапазон pH составляет 2–10. Гели декстрана подвержены действию сильных окислителей, вызывающих образование карбоксильных групп.

Номера в маркировке сефадексов характеризуют их пористость. Выбор определенной марки сефадекса определяется молекулярной массой исследуемого белка (чем больше соответствие размеров молекул и величины пор, тем выше селективность), а степень зернения – поставленной задачей. Для обессоливания растворов белков и их концентрирования обычно используют сефадексы G-25 и G-50 (грубый или средний). При разделении же смеси белков пользуются сефадексами тонкого или сверхтонкого зернения. Чем мельче частицы геля, тем эффективнее происходит разделение, но тем меньше скорость протекания раствора через колонку.

Реактивы:

1. Натрий-фосфатный или калий-фосфатный буфер – 0,05 моль/л растворы, содержащие 0,05 моль/л KCl, pH 6,5.

9

2. Сефадекс G-100.

3. Белки с определенной молекулярной массой (Да): яичный альбумин (45000), бычий сывороточный альбумин (68000), рибонуклеаза из поджелудочной железы (12700) цитохром с (13000).

4. Голубой декстран (2000 кДа).

5. Сахароза.

Ход работы.

Разделение белков на колонках с сефадексом. Сухой сефадекс

суспендируют в 200-кратном объеме воды и оставляют стоять на 48 ч при комнатной температуре для полного набухания. Набухание можно ускорить, проводя его на кипящей водяной бане в течение 5 ч.

Колонку (размером 1,5x50 см)<sup>3</sup> подготавливают так, как описано выше.

В нее вносят относительно густую суспензию полностью набухшего геля. Для предотвращения образования пузырьков воздуха в слое геля в колонке суспензию сефадекса перед заполнением колонки можно деаэрировать с помощью водоструйного насоса в колбе Бунзена или вносить его в колонку при температуре, значительно превышающей комнатную (50-60 °C). Сефадексу в колонке дают отстояться, затем с целью уравнивания и достижения по-

стоянной высоты столба геля колонку промывают 3-5 объемами буферного раствора. Гидростатическое давление для сефадекса G-100 не должно превышать 50 см:  $h=20-50$  см (давление при разделении образца и при заполнении колонки должно быть одинаковым). Для проверки равномерности заполнения через колонку можно пропустить раствор окрашенного белка, например цитохрома с или голубого декстрана. При этом окрашенная зона должна быть компактной и двигаться по колонке параллельно ее основанию.

Исследуемую белковую смесь растворяют в буферном растворе в объеме 1 мл (по 2-4 мг каждого белка) и вносят в колонку. Нанесение пробы на колонку проводят, как описано выше, увеличив плотность раствора добавлением сахарозы до 0,5 моль/л.

Перед использованием колонки определяют ее свободный объем ( $V_0$ ). Для этого через колонку пропускают 1 мл (1 мг/мл) раствора голубого декстрана в 0,5 моль/л растворе сахарозы. В качестве растворителя как для голубого декстрана, так и для исследуемых белков применяют тот же буферный раствор, которым уравновешена колонка. Им же элюируют белки с колонки после нанесения анализируемой смеси. Следует отметить, что поскольку положительно заряженные частицы могут частично взаимодействовать с сефадексом (за счет имеющихся карбоксильных групп), для элюции обычно используют растворы с ионной силой выше 0,02. Если исследуемые белки после гель-хроматографии надлежит лиофилизировать, для элюции используют летучие буферные растворы (аммоний бикарбонатный, ацетатный, формиатный и др.).

Вытекающий из колонки буферный раствор собирают в пробирки порциями по 1—3 мл. Регистрацию объема элюата, прошедшего через колонку,

10

начинают с момента нанесения образца на колонку. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически при 280 нм. Оптическую плотность растворов, содержащих рибонуклеазу, определяют при 230 нм, голубой декстран — при 650 нм, цитохром С — при 412 нм. После окончания анализа колонку промывают несколькими объемами буферного раствора. Строят профиль элюирования отдельных белковых фракций. Для этого вычерчивают график, на горизонтальной оси которого откладывают номера пробирок (фракций) или объем прошедшей через колонку жидкости, а на вертикальной оси — величины оптической плотности фракций.

Регенерация и хранение сефадекса. Сефадексы можно хранить в виде суспензии или в сухом виде. Суспензию сефадекса следует хранить в холодильнике в присутствии антисептиков: 0,02% азида натрия, мертиолата

или хлороформа. Для перевода геля в сухое состояние сефадекс сначала промывают водой для удаления солей, а затем выдерживают несколько минут с 2-кратным объемом 50% этанола; после фильтрования на воронке Бухнера сефадекс выдерживают с 2-кратным объемом 96% этанола. Обработку последним повторяют несколько раз. Осадок высушивают в термостате при 60–80 °С.

### 1.2.2. Метод ионообменной хроматографии

Принцип метода. В основе разделения соединений методом ионообменной хроматографии лежат реакции ионного обмена между анализируемыми соединениями и сорбентами-ионитами, имеющими в своем составе ионизируемые группировки.

Сильные иониты, функциональные группы которых образованы сильными кислотами или основаниями, могут быть ионизированы полностью во всем диапазоне рабочих значений pH (3–11). Слабые иониты, функциональные группы которых образованы слабыми кислотами или основаниями, могут быть ионизированы не полностью и лишь в ограниченной области значений pH.

При фракционировании белков методом ионообменной хроматографии большое внимание уделяют выбору ионообменника (природе матрицы и емкости ионита) и буферного раствора, при котором осуществляется сорбция белков (величине pH и ионной силы, природе буфера и буферной емкости). При работе с белками в качестве сорбентов используют иониты, обладающие высокой степенью гидрофильности.

Белки могут быть разделены как на катионитах, так и на анионитах. Выбор типа ионита определяется изоэлектрическими точками хроматографируемого материала и устойчивостью белка в определенной зоне значения pH.

Эффективная сорбция белков происходит при значениях pH, отстоящих не менее чем на единицу от pI. В области  $\text{pH} < \text{pI} - 1$  белки можно хрома-

тографировать на катионитах, а в области  $\text{pH} > \text{pI} + 1$  – на анионитах. Изменение pH в направлении к ИЭТ способствует десорбции белков. При работе с белками используют буферные растворы с низкой ионной силой, но высокой

буферной емкостью. Для этого пользуются буферными растворами, рК которых отстоит от величины рН, используемой в эксперименте, не более чем на 0,3–0,5 единиц рН. Хроматографию на анионитах ведут в таких случаях, где диссоциируемым компонентом является катион (буферы: трис, пиридин, имидазод и др.), а для катионитов диссоциируемым компонентом является анион (ацетатный, фосфатный, бикарбонатный буфер и др.).

При ионообменной хроматографии смесь белков сорбируется в верхней части колонки и затем вытесняется веществами, уменьшающими их сорбцию на ионите. Понижение сорбции осуществляют повышением ионной

силы раствора и (или) изменением его рН. Изменение рН и ионной силы элюирующего буферного раствора можно проводить путем создания ступенчатой или градиентной элюции.

#### Ход работы.

Подготовка ионообменников к работе. Навеску порошка сорбента суспендируют в 50-кратном и более объеме дистиллированной воды, перемешивают и оставляют набухать на ночь. Слой жидкости над ионообменником декантируют, снова заливают дистиллированной водой, перемешивают и через 2–2,5 ч верхний слой жидкости декантируют вместе с неосевшими мелкими частицами. К оставшемуся осадку приливают 50-кратный объем 0,5 н NaOH, тщательно перемешивают и через час ионит фильтруют через воронку Бухнера. Осадок на воронке промывают водой до рН 7,0. Затем ионит перемешивают в 50-кратном объеме 0,5 н HCl и через 30–60 мин отмывают дистиллированной водой примерно до рН 5,0. На следующем этапе в случае анионитов, например ДЭАЭ-целлюлозы, сорбент повторной обработкой щелочью переводят в OH<sup>-</sup>-форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном объеме 0,5 н NaOH, перемешивают и через час отмывают дистиллированной водой до рН воды. В случае катионитов, например КМ-целлюлозы, сорбент повторной обработкой кислотой переводят в H<sup>+</sup>-форму. Для этого его суспендируют в 50-кратном избытке 0,5 М раствора HCl в течение 30–60 мин. После фильтрования сорбент отмывают дистиллированной водой до тех пор, пока рН промывной жидкости не достигнет рН

воды.

Для освобождения от мелких и крупных частиц ионит суспендируют в

цилиндре на 1 л, перемешивают, отстаивают 20–30 мин и верхний слой жидкости с неосевшими мелкими частицами декантируют. Эту операцию повторяют несколько раз (5–6), пока жидкость над осадком будет свободной от

мелкой взвеси. Чтобы освободиться от крупных частиц, ионит суспендируют в воде, перемешивают и через  $\sim 1$  мин суспензию сливают в другой цилиндр.

После описанной обработки ионит уравнивают буферным раство-

12

ром, в котором осуществляют сорбцию белков на ионообменнике (исходный буферный раствор). Эту процедуру можно проводить как на колонке, так и вне ее. Обработку исходным буферным раствором осуществляют до тех пор, пока не произойдет выравнивания рН элюата на выходе из колонки (или жидкости, в которой суспендируют ионит) с рН исходного буферного раствора. Для ускорения уравнивания колонки ионит можно сначала обрабатывать раствором того же состава, что и исходный, но с большей концентрацией, а после достижения нужного значения рН уравнивание продолжают исходным раствором. Другой способ уравнивания заключается в том, что ионит суспендируют в исходном буферном растворе до получения достаточно жидкой суспензии. Добавлением раствора, содержащего соответственно кислый или основной компонент исходного буфера, доводят рН (на рН-метре) до нужного значения. Затем сорбент уравнивают исходным буферным раствором. Во всех случаях конечное состояние равновесия (величину рН) необходимо контролировать.

**Регенерация.** По окончании работы ионообменники следует регенерировать. Для этого к использованному сорбенту добавляют 30-кратный объем 0,2–0,5 н раствора NaOH, перемешивают до получения однородной суспензии и фильтруют на воронке Бухнера. Обработку щелочью проводят дважды. После этого ионит отмывают водой до нейтральной реакции фильтрата. Регенерированный ионообменник уравнивают соответствующим буферным раствором.

**Хранение.** Ионообменники на основе целлюлозы и декстрана можно хранить во влажном состоянии непродолжительное время. Аниониты лучше хранить в солевой форме (не в OH<sup>-</sup>-форме), катиониты хранят в солевой форме и в H<sup>+</sup>-форме. При хранении набухших ионообменников к ним добавляют антисептики; при добавлении толуола (нескольких капель на литр) следует помнить, что толуол поглощает при 280 нм, а растворимость его в некоторых буферах, например в трис-буфере, достаточно высока.

**Подготовка и заполнение колонки.** Колонку заполняют суспензией ионита в элюирующем буферном растворе. Заполнение колонки можно проводить и суспензией ионита в воде и лишь после уплотнения слоя сорбента

уравновешивать колонку элюирующим буферным раствором. Над верхним слоем сорбента всегда должен оставаться слой жидкости не менее 2 см.

Подготовка исследуемого материала. Раствор белка, наносимый на колонку, должен иметь тот же состав и те же значения pH и ионной силы, что и исходный буферный раствор, которым уравновешен ионообменник. Образец переводят в исходный буферный раствор, подвергая его предварительно диализу или гель-хроматографии. Если объем пробы, предназначенный для ионообменной хроматографии, невелик, образец можно развести исходным буферным раствором. Нерастворимые компоненты удаляют центрифугированием или фильтрованием. Если исследуемый белок связывается

13

с ионообменником прочно, объем наносимого белкового раствора значения не имеет, если он связывается слабо, наносимый объем должен быть по возможности небольшим.

Элюция белков с колонки. Скорость протекания элюента по колонке при ионообменной хроматографии сказывается на результатах разделения. При медленном токе жидкости, например порядка  $8 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ , разделение лучше, чем при токе жидкости через ту же колонку со скоростью  $20 \text{ мл/см}^2 \cdot \text{ч}$ . На разделительной способности колонки сказывается и крутизна создаваемого градиента элюции: чем круче градиент, тем острее пики на кривой элюции, однако лучшему разделению способствует более пологий градиент.