

Специфичность белков

*А. А. Чиркин, заведующий кафедрой химии, доктор биологических наук, профессор;
Е. О. Данченко, профессор кафедры, доктор медицинских наук, доцент
(Витебский государственный университет им. П. М. Машерова)*

Способность к специфическому узнаванию и специфическому взаимодействию является основой биологических функций всех белков. Специфически узнать молекулу — это значит найти поверхность молекулы с такой мозаикой радикалов, с которой можно образовать максимально возможное количество связей. Специфически взаимодействовать — это значит образовывать между участками поверхностей молекул максимально возможное число связей. Поверхности молекул, которые при образовании связей дополняют друг друга, называются *комплементарными*: положительному заряду должен соответствовать отрицательный, а группе с поляризованным протоном — атом с неподелённой парой электронов; одной гидрофобной группе стерически должна соответствовать другая. Отсюда *правило*: две молекулы, поверхности которых комплементарны, находят друг друга и взаимодействуют.

Уникальность белков в том, что они могут менять свою конформацию, делая поверхность комплементарной лиганду, например активный центр фермента—субстрат (по Кошланду). Различные лиганды связываются с белковыми молекулами по центрам связывания, которые, очевидно, должны быть комплементарны функциональным группам лиганда. Поскольку связи между лигандом и центром связывания белка нековалентные (водородные, ионные, гидрофобные), такое связывание обратимо.

Связывание белка с лигандом зависит от числа мест (центров) связывания и количества молекул лиганда. Если количество молекул лиганда превышает число центров связывания на белке, то дальнейшего связывания не происходит (белок насыщен лигандом). Специфическое взаимодействие за счёт комплементарных поверхностей объясняет большинство функций белков (фермент—субстрат; гормон—рецептор; антиген—антитело и т. д.).

I. Самосборка белков

Специфическое взаимодействие определяет уникальное свойство белков — их способность к самосборке. Например, после обработки молекулы гемоглобина мочевиной она распадается на функционально неактивные протомеры, которые после удаления мочевины самопроизвольно объединяются в нативную структуру гемоглобина. Возьмём более поразительный пример — гигантскую молекулу вируса табачной мозаики с молекулярной массой 40 000 000 Да. Она состоит из одной молекулы РНК и 2130 белковых субъединиц, молекулярная масса каждой из которых равна 17 500 Да. Если РНК и субъединицы разделить добавлением детергента, а затем убрать его, то нативная структура молекулы вируса полностью восстановится. При этом вновь восстановятся все биологические свойства вируса. Самосборка не требует никакой дополнительной информации и

происходит самопроизвольно путём взаимодействия комплементарных поверхностей молекул. Подчеркнём, что комплементарность поверхности молекулы белка определяется мозаикой радикалов аминокислот (поверхность третичной структуры). Последовательность же аминокислот детерминирована генетически и записана в первичной структуре. Следовательно, многообразие структурно и функционально различных белков определяется двумя причинами: 1) возможностью образования различных первичных структур из 20 аминокислот; 2) явлением самосборки, основанной на принципе комплементарных поверхностей.

Завершая изложение материала о структуре и функции белков, остановимся на двух важных в практическом отношении аспектах: количественном определении белков и выделении индивидуальных белков.

II. Количественное определение белков

Различают две группы методов.

1. Определение количества белков в растворе на основе *физико-химических свойств*: биуретовый метод (основан на образовании окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белка с ионами двухвалентной меди в щелочной среде); рефрактометрический и нефелометрический методы; поглощение ультрафиолетового излучения (при 280 нм поглощают остатки ароматических аминокислот, при 180—210 нм — пептидная связь и ряд конформационных факторов). Используют закон Ламберта—Бэра:

$$A = \epsilon c l,$$

где ϵ — коэффициент экстинкции ($M^{-1}cm^{-1}$); c — концентрация вещества в растворе (M); l — длина пути светового луча в кювете (cm).

Для триптофана максимум абсорбции при 280 нм и коэффициент экстинкции равен $3400 M^{-1}cm^{-1}$, а для тирозина максимум абсорбции при 276 нм и коэффициент экстинкции составляет $1400 M^{-1}cm^{-1}$ (рис. 1). Определение поглощения света длиной волны 280 нм используется для анализа концентрации белка в растворе (если известно количество остатков триптофана и тирозина в белковой молекуле).

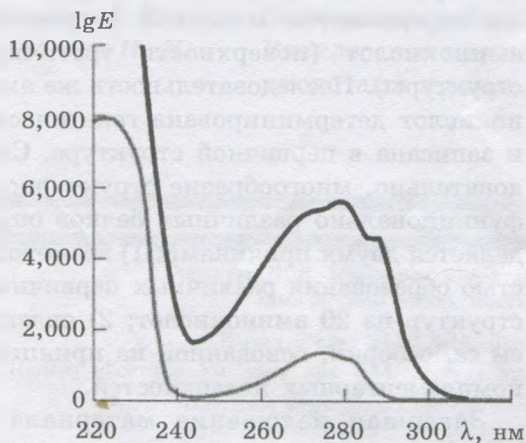


Рисунок 1 — Спектры поглощения триптофана (тёмная линия) и тирозина (светлая линия). Только эти аминокислоты поглощают свет при 280 нм (рис. G. Gatto)

2. Количественное определение индивидуальных белков на основе их *биологических свойств* (радиоиммунный, иммуноферментные методы).

Задача. В биологической жидкости имеется смесь белков ($A+B+X$). Необходимо определить количество белка X . Для количественного определения индивидуального белка X в смеси белков предложен *радиоиммунный метод*. Рассмотрим его суть.

Первый этап: приготовление реагента для определения. Чистым препаратом белка X , полученным заблаговременно, иммунизируют животное. В организме животного образуются антитела к этому белку. Их выделяют из крови и метят ^{125}I . Этот этап осуществляется на предприятиях, производящих наборы реагентов для радиоиммунного определения белка.

Второй этап: анализируют смесь белков, добавляя к ним меченое антитело в избытке, которое из-за специфического взаимодействия связывает только белок X . Этот комплекс выделяют, подсчитывают радиоактивность и количество метки, по которому определяют количество антитела X , т. е. искомого белка. Метод весьма чувствителен, поскольку основан на специфическом комплементарном взаимодействии индивидуальных белков.

В настоящее время широкое распространение нашёл *иммуноферментный анализ* ИФА индивидуальных белков, основанный на сродстве антитела к конкретному антигену. Он включает следующие основные этапы.

1. Образец, в котором хотят обнаружить специфическую молекулу или микроорганизм, фиксируют на твёрдой подложке, чаще используют пластиковые 96-луночные плашки.

2. К фиксированному образцу добавляют антитело, специфичное к маркерной молекуле (первое антитело), затем промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы первого антитела.

3. В лунку добавляют второе антитело, которое специфически связывается с первым антителом и не взаимодействует с маркерной молекулой. К этому антителу присоединён фермент, катализирующий превращение неокрашенного субстрата в окрашенный продукт (чаще, щелочная фосфатаза, пероксидаза или уреазы). Промывают лунку, чтобы удалить несвязавшиеся молекулы конъюгата второе антитело—фермент.

4. Добавляют в лунку неокрашенный субстрат.

5. Проводят количественное (качественное) определение окрашенного продукта.

Основной принцип ИФА — специфическое связывание первого антитела с мишенью (белок, клетка). Применение *моноклональных антител* позволило существенно повысить специфичность метода, поскольку они связываются с одним, строго определённым антигенным сайтом. Напомним, что антитела продуцируют В-клетки (В-лимфоциты). Каждая клетка системы иммунитета вырабатывает одно антитело, которое распознаёт отдельный участок (эпитоп, антигенную детерминанту) молекулы антигена. Поскольку в молекуле антигена присутствует несколько разных эпитопов, антитела к каждому из них вырабатываются отдельными клетками системы иммунитета. Такие антитела, каждое из которых взаимодействует с данным антигеном, называют поликлональными. Они вариabельны по количеству, в связи с чем не нашли применения в методе ИФА. Известно, что В-клетки не воспроизводятся в культуре. Но после слияния с миеломными клетками удалось получить гибридомы и выделить растущие и делящиеся в культуре клоны клеток, которые продуцируют высокоспецифичные моноклональные антитела. Их и используют в методе ИФА.

Если первое антитело не связывается с мишенью, то оно удаляется при первом промывании. Поскольку при этом конъюгату второе антитело—фермент не с чем связываться, он удаляет-

ся при втором промывании, и образец остаётся неокрашенным. Если связывание с мишенью происходит, то второе антитело присоединяется к первому, и конъюгированный фермент катализирует образование легко регистрируемого окрашенного продукта.

Моноклональные антитела в настоящее время широко применяются при определении полипептидных гормонов, маркеров опухолей, цитокинов, лекарственных препаратов, различных низкомолекулярных биорегуляторов, возбудителей инфекционных заболеваний (рис. 2).

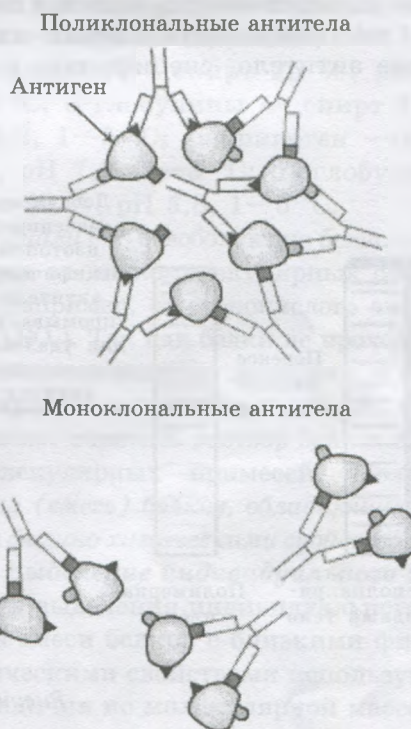


Рисунок 2 — Поликлональные и моноклональные антитела. Большинство антигенов имеют несколько эпитопов (специфических мест связывания). Поликлональные антитела являются смесью различных антител, каждое из которых специфически связывается с одним из эпитопов антигена. Моноклональные антитела идентичны и продуцируются одним клоном клеток. Они связываются только с одним специфичным для их поверхности эпитопом антигена (по Goldsby R.A. et al., 2000)

В ряде случаев требуется определить наличие низкой концентрации белка, находящегося в окружении многих белков, например наличие вирусного

протеина в сыворотке крови. Очень низкие концентрации белка в различных белоксодержащих жидкостях определяют с помощью техники *Вестерн-блоттинга*:

1) белки исследуемого образца разделяют методом электрофореза в блоке полиакриламидного геля (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide del electrophoresis — SDS-PAGE);

2) после завершения электрофоретического разделения на поверхность блока накладывают полимерную плёнку и под давлением или с помощью электрического тока (электроблоттинг) обеспечивают переход разделившихся белков в плёнку;

3) на поверхность плёнки наносят первое антитело, специфичное к опре-

деляемому белку; оно может связаться со своим антигеном, образуя комплекс антиген—антитело;

4) затем детектируют этот комплекс путём добавления специфичного к первому антителу второго энзимсвязанного антитела и красителя (как в методе ИФА). Часто второе антитело метят радиоактивным элементом и детектирование места положения белка производят путём анализа ауторадиограммы.

Техника Вестерн-блоттинга лежит в основе тестов определения корового антигена вирусного гепатита С, а также широко применяется при оценке белковых продуктов при экспрессии клонированных генов (рис. 3).



Рисунок 3 — Вестерн-блоттинг

Наряду с количественным и качественным анализом белков в биологических жидкостях необходимо знать их локализацию и функционирование в клетке. Для этих целей используют флуоресцентные маркеры, которыми метят специфические антитела. Затем обрабатывают клетку мечеными антителами и с помощью флуоресцентного микроскопа оценивают локализацию белка в клетке. Например, с помощью зелёного флуоресцирующего белка (green fluorescent protein — GFP) из тканей медузы был помечен рецептор к стероидным гормонам. Оказалось, что в отсутствие гормо-

на рецептор локализуется в цитоплазме, а при его наличии перемещается в ядро и связывается с ДНК. Разрешающая способность метода около 200 мкм (200 нм, или 2000 ангстрем). Она может быть повышена в 20 раз (10 нм, или 100 ангстрем) в методе иммуноэлектронной микроскопии. Для этого используются специфические антитела, включающие частички золота (по аналогии с ферритином, содержащим атомы железа).

Для реализации методов радио- и иммуноферментного анализа предварительно требуется получить индивидуальные белки.

III. Методы выделения индивидуальных белков

При выделении индивидуальных белков обычно сталкиваются со следующими трудностями: 1) низкое содержание белка в исходном материале (часто < 0,1 % от сухой массы); 2) лабильность белков, что не позволяет применять традиционные методы органической химии (перегонка, перекристаллизация и др.); 3) связь белков со структурными элементами клеток или их наличие в белково-липидных, белково-углеводных и других комплексах биологических жидкостей; 4) наличие близких физико-химических свойств у разделённых белков.

Этапы выделения

1. Перевод белков ткани в раствор

а) *Гомогенизация* — перевод исследуемого материала в гомогенное состояние. При этом используются ступки, ножевые, пестиковые гомогенизаторы, ультразвук, замораживание — оттаивание и прочие методы для разрушения структур тканей.

б) *Экстракция* белков проводится обычно параллельно с гомогенизацией. Для экстракции используются: 8—10%-ные растворы солей (NaCl, KCl и др.) — хорошо растворяют большинство белков тканей; буферные растворы; органические растворители и детергенты — нарушают гидрофобные взаимодействия; сахара, глицерин и другие специальные экстрагенты.

в) *Осветление гомогената* (экстракта) путём центрифугирования или фильтрации. В результате получаем раствор тканевых белков.

2. Групповое разделение белков

а) *Высаливание* — разделение белков на фракции по их растворимости. Принцип метода заключается в дегидратации белков (обычно с помощью сульфата аммония) при pH, близком к изоэлектрической точке (ИЭТ). Различные белки выпадают в осадок при разных концентрациях соли. Это грубый метод разделения на группы. Например, глобулины выпадают в осадок при полунасыщении, а альбумины — при полном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

б) *Избирательная денатурация* — многие белки денатурируют и выпадают в осадок при нагревании раствора до 50 °C или при подкислении среды до pH 5,0. Если выделяемый белок устойчив к нагреванию и изменению pH, то часть ненужных белков можно удалить таким простым способом.

в) *Органические растворители* при низких температурах используются для щадящего группового разделения белков. По методу Кона белки плазмы крови фракционируют спиртом: альбумины — спирт 40 %, pH 4,8, 1—5 °C; β , γ -глобулины — спирт 25 %, pH 6,9, 1—5 °C; α -глобулины — спирт 18 %, pH 5,2, 1—5 °C; фибриноген — спирт 8 %, pH 7,2, 1—3 °C; α_2 -глобулин — спирт 40 %, pH 5,8, 1—5 °C.

г) *Диализ* — освобождение белковых растворов от низкомолекулярных соединений (например, от сернокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Так как белки не проходят через полупроницаемую мембрану, а низкомолекулярные вещества проходят, то это позволяет очистить раствор белков от низкомолекулярных примесей. *Получаем группу (смесь) белков, обладающих близкими физико-химическими свойствами.*

3. Выделение индивидуального белка

Для выделения индивидуального белка из смеси белков с близкими физико-химическими свойствами используются: а) различия по молекулярной массе (методы ультрацентрифугирования и гель-хроматографии); б) различия в заряде (методы электрофореза и ионообменной хроматографии); в) способность белков к специфическим взаимодействиям (аффинная хроматография).

а) Разделение по молекулярной массе.

1) *Ультрацентрифугирование* позволяет получить в центрифужных пробирках, вращающихся со скоростью до 85 000 об/мин, ускорение силы тяжести 300 000—500 000 g, при этом белки с разной молекулярной массой будут двигаться ко дну пробирки с разной скоростью. На дно осядут самые тяжёлые белки, затем средние и лёгкие (рис. 4).

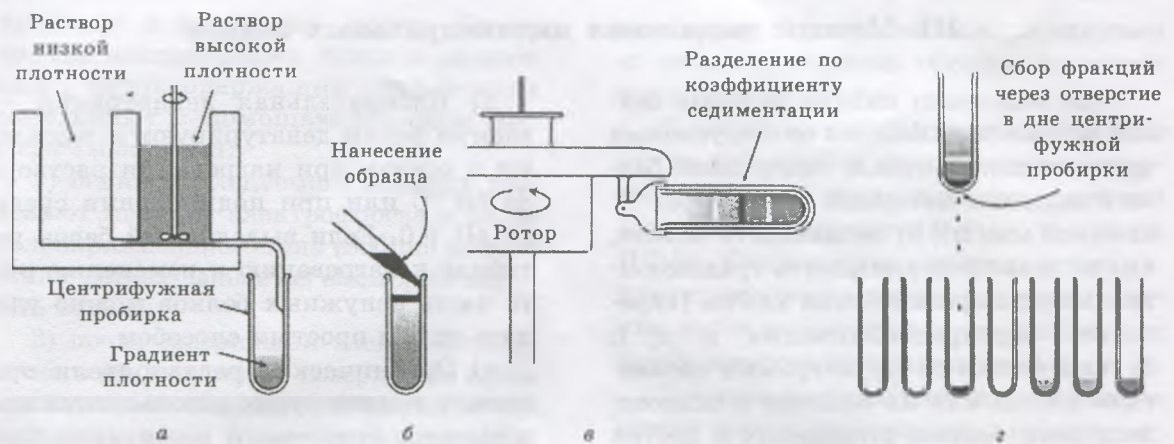


Рисунок 4 — Ультрацентрифугирование (Freifelder D., 1982):

- а — формирование градиента плотности растворителя (растворы сахаразы или хлорида цезия) в центрифужной пробирке; б — нанесение смеси белков на поверхность градиента; в — помещение центрифужных пробирок в ротор и вращение в вакууме до 75 000 об/мин; г — прокалывание дна центрифужных пробирок и сбор вытекающих фракций белков

2) Гель-фильтрация осуществляется с помощью молекулярных сит, например сефадексов. Это нитевидные молекулы полисахарида декстрана, шитые через определённые промежутки попе-

речными связями и свёрнутые в гранулы. В зависимости от размеров пор выпускают ряд марок сефадексов: G-200, G-100, G-75 и др. (рис. 5).

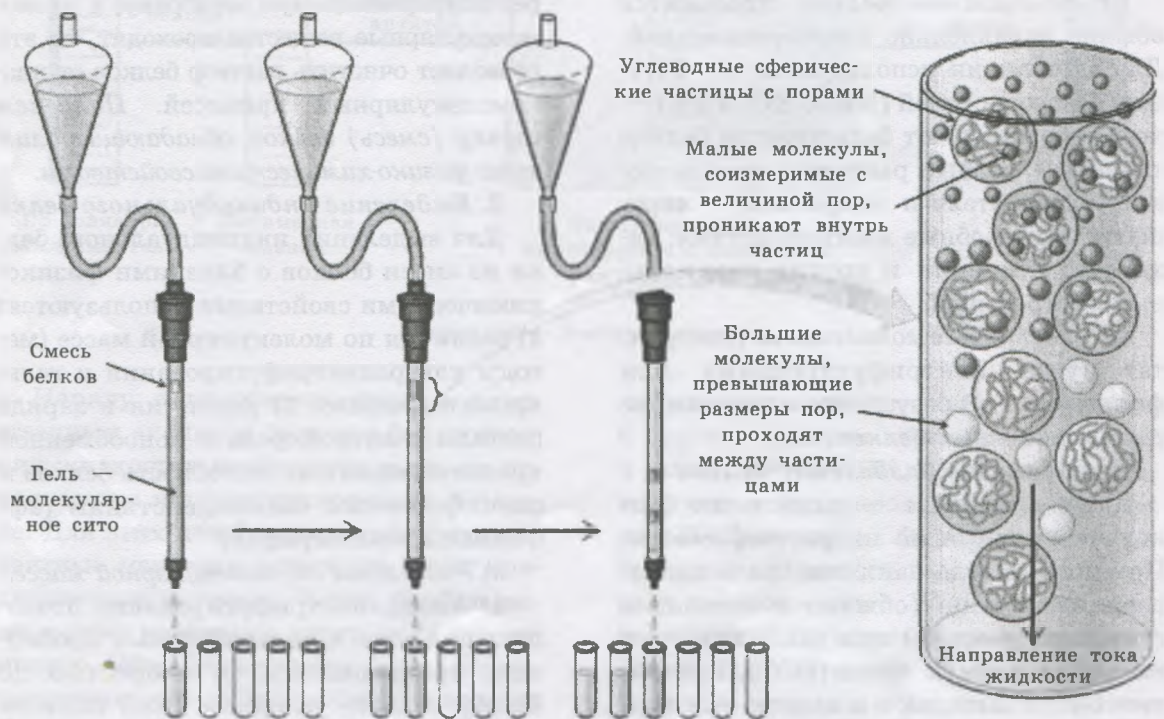


Рисунок 5 — Гель-хроматография. Смесь белков в малом объёме наносится на колонку, заполненную частицами с порами. Крупные частицы не проникают внутрь частицы и элюируются первыми

б) *Разделение по заряду.*

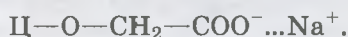
1) **Электрофорез.** Белки, имеющие разное количество ионогенных радикалов в полипептидной цепи имеют в растворе разные заряды, а поэтому в электрическом поле будут двигаться с разной скоростью. Обычно электрофорез используется в полиакриламидном геле. Перспективен метод изоэлектрического фокусирования.

2) **Ионообменная хроматография** заключается в ионном обмене между полимером, заполнившим колонку, и заряженным белком, пропускаемым через колонку. Различают два типа ионообменников.

Катионообменник — КМ (карбоксиметилцеллюлоза) — это полимер целлюлозы, к которой по ОН-группе прищита карбоксиметильная группа:



Подготовка смолы к работе — пропускание через неё NaOH →

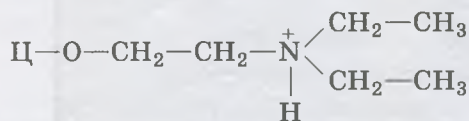


Образуется солевая форма с катионами Na⁺. Теперь пропускаем через колонку катионы белка. Эти катионы вытесняют Na⁺ и становятся на его место:

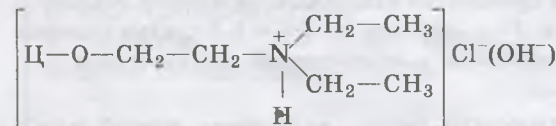


Прочность связи (электростатической) зависит от величины (+)-заряда, т. е. числа ионизированных NH₃⁺ групп.

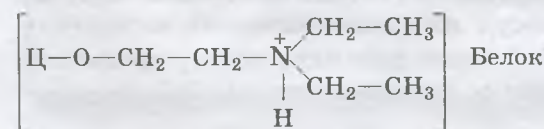
Анионообменник — ДЕАЕ (диэтиламиноэтилцеллюлоза):



Подготовка — обработка анионообменника щёлочью или кислотой, что приводит к образованию солевой формы:



Ионы Cl⁻ или OH⁻ обмениваются на анионы белка:



Для разделения кислых и нейтральных белков используются анионообменники, для разделения основных белков — катионообменники.

Элюцию осуществляют:

1) буферными растворами с изменяющимися значениями pH (возрастающими или убывающими). При этом белки разделяются в соответствии с их зарядами (т. е. отходят от заряженной группы ионита);

2) буферным раствором того же pH, но содержащим катионы (анионы) с большим сродством к ионообменнику (вытеснение по величине заряда).

в) *Разделение на основе специфического связывания. Аффинная хроматография, или хроматография по сродству.* Метод основан на специфическом взаимодействии молекулы белка с определённым лигандом. Готовят матрицу, с которой сшивают соединение (лиганд), обратимо и специфично связывающийся с искомым белком. Затем через колонку пропускают смесь белков. С лигандом матрицы свяжется только искомым белок за счёт специфического взаимодействия, а нейтральные белки будут удалены с растворителем. Затем снять этот белок не представляет труда. Для этого через колонку пропускают раствор с высокой концентрацией свободного лиганда. Часто используется вариант свободного лиганда, имеющего более высокое сродство к белку, чем у фиксированного на матрице лиганда.

Для выделения каждого белка требуется своя последовательность этапов (табл. 1). Успешность выделения белков контролируется на каждом этапе путём определения специфической активности белка и SDS-PAGE анализа (рис. 6). Обычно на каждом этапе оценивают: количество общего белка; общую активность белка (если выделяют фермент, то активность фермента); специфическую активность (общая активность/общее количество белка); выход продукта — на каждом этапе (в % от общей активности гомогената); степень очистки — повышение специфической активности на каждом этапе по отношению к специфической активности исходного гомогената.

Схема выделения белка

№ п/п	Этап	Общий белок, мг	Общая активность, Ед	Специфическая активность, Ед/мг	Выход, %	Степень очистки
1	Гомогенат	15000	150000	10	100	1
2	Высаливание	4600	138000	30	92	3
3	Ионообменная хроматография	1278	115500	90	77	9
4	Гельхроматография	68,8	75000	1100	50	110
5	Аффинная хроматография	1,75	52500	30000	35	3000

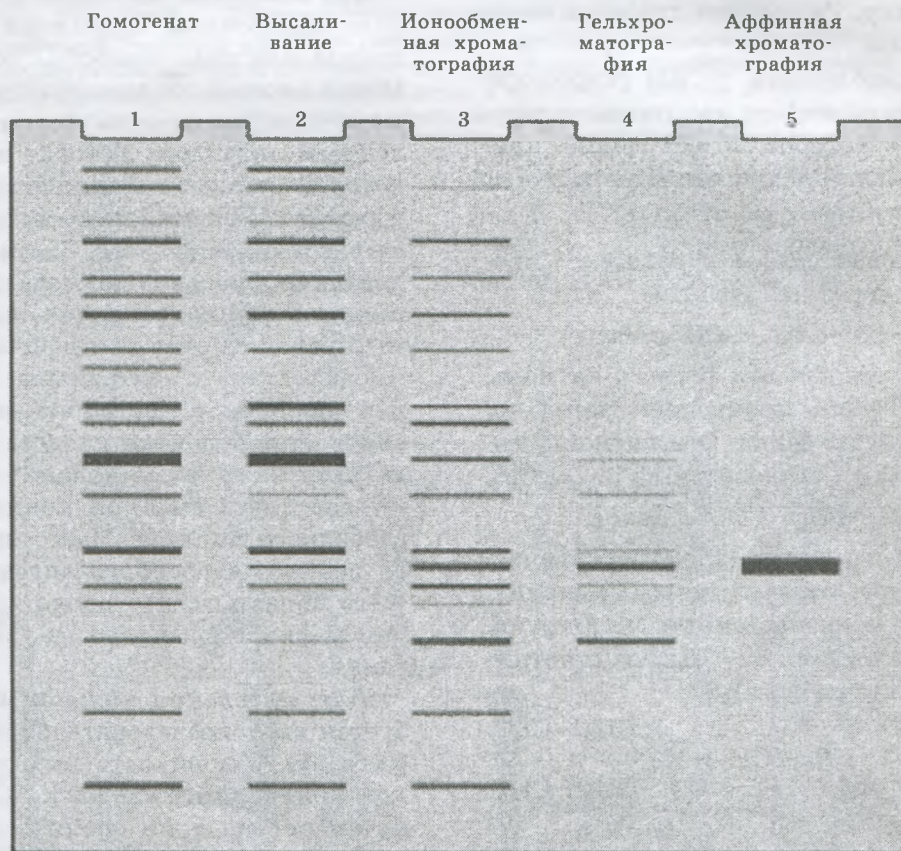


Рисунок 6 — Электрофоретический анализ в процессе очистки белка.

В соответствии со схемой очистки белка из смеси проводится SDS-PAGE на каждой стадии. На каждую дорожку наносилось по 50 мкл образца. При переходе от 1-й к 5-й стадии очистки видно постепенное обогащение одной белковой фракции и исчезновение других белков

Определение гомогенности выделенного белка: кристаллизация (у чистого белка кристаллы одного типа); кривые растворимости (у чистого белка один перелом кривой растворимости); аналитическое ультрацентрифугирование

(чистый белок даёт один узкий пик); электрофорез в ПААГ, изоэлектрофокусирование (чистый белок даёт одну полосу); иммунохимический метод (чистый белок даёт одну полосу преципитации со смесью антител).

IV. Протеомика

Термин «протеом» возник от слова *протеин*, т. е. белков, полученных при экспрессии генома, и определяет системный профиль белков клеток, тканей и органов на основе биохимических, молекулярно-клеточных и генетических методов исследования. Протеомика изучает белковый спектр биологических систем в различных условиях. Если исследование генома (геномика) было основным направлением биологических научных исследований XX века, то протеомика — это наука XXI века. Протеомика основывается на 2-этапном анализе: как можно более детальное разделение белков биологического объекта и их количественная оценка.

Протеомика возникла на основе *двумерного электрофореза в полиакриламидном геле*, в результате которого удаётся увидеть белковый спектр биологического объекта в виде отдельных пятен. Шагом вперёд явилась комбинация этого метода с чувствительным методом детекции — масс-спектрометрией. Протеомика изучает не только изоформы белков, но и особенности их фолдинга, т. е. приобретения нативной конформации. Одним словом, протеомика изучает локализацию белков в клетке, обеспечивает идентификацию отдельных белков, определение их структуры и выявляет характер белок-белковых взаимодействий.

Список использованной литературы

1. *Северин, Е. С.* Биохимия / Е. С. Северин. — М. : Гэотар-Мед, 2003. — 784 с.
2. *Чиркин, А. А.* Биохимия с основами молекулярной биологии. Учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — Витебск : ВГУ, 2006. — 295 с.
3. *Berg, J. M.* Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — N-Y. : W. H. Freeman and Company, 2002. — 1514 p.
4. *Ganten, D.* Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine / D. Ganten, K. Ruckpaul. — N.-Y. : Springer, 2006. — 4378 p.

Поздравляем с юбилеем

Манкевич Нину Владимировну,

*методиста управления
учебно-методической работы
Академии последипломного образования,
члена редакционной коллегии журнала*



Февральские вьюги неспешно уходят,
И март проторяет тропу
В поэзию жизни, и в солнце мелодий,
Весенне венчая судьбу.

И Ваш день рожденья радуют юно
Зима, и весна, и цветы.
А годы, как звонкие лёгкие струны,
Загадочны, ярки, чисты.

Вы были учителем химии. Ныне
Вы учите учителей.
К науке любовь никогда не остынет
И Вам от неё всё теплей.

Пишите таблицы, как строки сонетов,
И в формулах видьте цветы.
Желаем Вам нежности близких и света,
И Вашей святой красоты!

Редколлегия журнала