

MARIUSZ ROSIŃSKI, DOROTA PIASECKA-KWIATKOWSKA,
JERZY R. WARCHALEWSKI

PRZEGLĄD METOD SEPARACJI I OCZYSZCZANIA BIAŁEK PRZYDATNYCH W BADANIACH I ANALIZIE ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Dokonano przeglądu nowoczesnych metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności. Proces oczyszczania białek obejmuje cztery główne etapy: wybór źródła białka, ekstrakcję białka z materiału biologicznego, oczyszczanie wyekstrahowanego białka z wykorzystaniem technik chromatografii kolumnowej oraz jego przechowywanie do czasu analizy.

Zawartość białka w materiale biologicznym i jego rozmieszczenie jest jednym z czynników decydujących o wyborze źródła białka. Znaczne ilości białek można uzyskać wykorzystując techniki rekombinacji DNA, które prowadzą do ich zwiększonej ekspresji w komórkach bakteryjnych. W przypadku izolacji białek wewnątrzkomórkowych należy zastosować dodatkowe zabiegi mające na celu rozbić zarówno tkanki, jak i komórki. Komórki znajdujące się w zawieszynie rozbija się za pomocą szeregu metod. W przypadku białek integralnych, związanych z błoną biologiczną, błona biologiczna zostaje poddana działaniu detergentu anionowego, takiego jak Tryton X-100, który nie denaturuje białka i zapobiega jego inaktywacji.

Przed przystąpieniem do dalszego oczyszczania białek należy określić ich przeznaczenie, wymagany stopień czystości oraz aktywność. W zależności od przeznaczenia produkt finalny może mieć trzy stopnie czystości: bardzo wysoki >99%, wysoki 95-99% oraz umiarkowany <95%.

Techniki chromatograficzne są wykorzystywane do separacji makromolekuł na podstawie takich parametrów, jak: wielkość i kształt, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy czy powinowactwo. Pierwszą z tych technik - sączeniem molekularnym zwanym także filtracją żelową - rozdziela się białka na podstawie wielkości i kształtu ich cząsteczek. Separacja białek za pomocą chromatografii jonowymiennej polega na wykorzystaniu różnic w ładunku powierzchniowym cząsteczek białka. W chromatografii oddziaływań hydrofobowych uwzględnia się różnice w hydrofobowości białka, natomiast w chromatografii powinowactwa wykorzystuje się powinowactwo dwóch substancji, np. enzymu i substratu, z których jedna jest unieruchomiona na nośniku.

Dyskutowano także stopień czystości białka jako produktu finalnego w zależności od jego potencjalnego zastosowania.

Słowa kluczowe: źródło białka, wyodrębnianie białek, metody chromatograficzne, przechowywanie białek

Wprowadzenie

Żywność stanowi skomplikowaną matrycę związków chemicznych, często labilnych. Dla analityka badanie składników żywności stwarza określone trudności i wymaga zastosowania albo specyficznych metod, albo bardzo dokładnego wyodrębnienia analizowanych związków w stanie możliwie niezmodyfikowanym, w szczególności białek.

Stały postęp w zakresie rozwoju technik i metod separacji oraz oczyszczania białek ma istotny wpływ na wiele dziedzin nauki i przemysłu. Wymagany stopień czystości białka jako produktu końcowego jest różny w zależności od jego potencjalnych zastosowań, np. wysoki stopień czystości jest konieczny w przypadku zastosowań terapeutycznych i badań krystalograficznych, natomiast niższy w przypadku dodatków w przemyśle spożywczym [17].

Oczyszczanie białek jest procesem, w którym wyróżnia się następujące etapy: wybór źródła białka, izolowanie i ekstrakcja białka z wybranego materiału biologicznego, oczyszczanie wyizolowanych białek na drodze chromatografii kolumnowych, przechowywanie oczyszczonego białka.

Wybór źródła białka

Po ustaleniu białka docelowego dokonuje się wyboru źródła białka. Materiałem wyjściowym mogą być tkanki roślinne, zwierzęce, drożdże oraz bakterie. O wyborze materiału biologicznego decyduje zarówno rozmieszczenie białka, jak i jego zawartość w surowcu.

Białka występujące w materiale biologicznym można podzielić na trzy grupy, w zależności od umiejscowienia:

- białka rozpuszczalne, obecne w płynach ustrojowych;
- białka występujące wewnątrz komórki:
 - w cytozolu;
 - w organellach komórkowych;
- białka nierozpuszczalne lub połączone z częściami stałymi komórki:
 - białka błonowe;
 - białka strukturalne.

Znaczne ilości białek można uzyskać stosując techniki rekombinacji DNA, które prowadzą do ich zwiększonej ekspresji w komórkach bakteryjnych czy eukariotycznych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku białek rzadko występujących lub występujących w małych ilościach.

Izolowanie i ekstrakcja białka z wybranego materiału biologicznego

Kolejnym etapem, po ustaleniu odpowiedniego źródła, jest uwolnienie oczyszczanego białka do roztworu. Ma to istotne znaczenie w przypadku białek występujących np. w organellach komórkowych czy związanych z błonami

biologicznymi. W przypadku izolacji tych białek należy zastosować dodatkowe zabiegi mające na celu rozbicie zarówno tkanek, jak i komórek. Komórki znajdujące się w zawieszynie rozbija się za pomocą szeregu metod (tab.1).

Tabela 1

Metody uwalniania białek z materiału biologicznego do roztworu

Methods of extracting proteins from biological material and introducing them into a solution

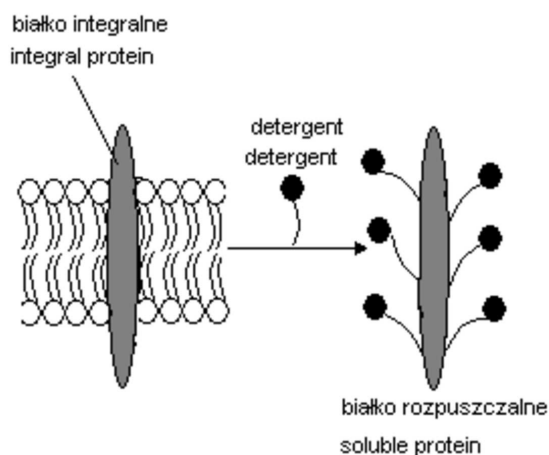
Metody uwalniania białek Methods of extracting and introducing proteins	Źródło białka Source of protein
Łagodna Gentle method	
Liza komórki (szok osmotyczny) Cell lysis (osmotic shock)	Erytrocyty, <i>E.coli</i> , okołoplazmowe: białka wewnątrzkomórkowe Erythrocytes, <i>E.coli</i> , periplasm: intracellular proteins
Trawienie enzymatyczne Enzymatic digestion	Bakterie: białka wewnątrzkomórkowe Bacteria: intracellular proteins
Ręczna homogenizacja Manual homogenisation	Tkanka wątroby Liver tissue
Siekanie (mielenie) Mincing (grinding)	Mięśnie Muscles
Umiarkowana Moderate method	
Homogenizator Blade'a Blade's homogeniser	Tkanka mięśniowa, większość tkanek roślinnych i zwierzęcych Muscle tissue, the majority of animal and plant tissues
Mielenie ze ścieraniem, np. piaskiem Grinding using abrasive materials, e.g. sand	Bakterie, tkanki roślinne Bacteria, plant tissues
Energiczna Vigorous method	
Ultradźwięki Ultrasonication	Zawiesina komórek Cell suspension
Homogenizator Manton-Gaulina Manton-Gaulin homogeniser	Zawiesina komórek Cell suspension
Prasa Frencha French press	Bakterie, komórki roślinne Bacteria, plant cells
Precypitacja frakcyjna Fractional precipitation	Lizat komórek, przeciwciała monoklonalne, białka zewnątrzkomórkowe Cells lysate, monoclonal antibodies, extra-cellular proteins

Źródło: / Source: [17]

Spośród metod fizycznych stosuje się najczęściej homogenizację, sonikację (działanie ultradźwięków), bądź też działanie wysokich ciśnień (prasa Frencha). Inną metodą rozbijania komórek jest tzw. „bomba azotowa”, wykorzystująca gwałtowną dekompresję zawiesiny komórek nasyconej rozpuszczalnym gazem, najczęściej azotem, pod wysokim ciśnieniem. Z innych metod można wymienić ogrzewanie, działanie zasadami czy detergentami oraz rozpuszczalnikami organicznymi. Inną

prostą metodą rozbicia komórek i uwolnienia zawartości cytoplazmy jest liza osmotyczna, polegająca na rozerwaniu komórek na skutek dyfuzji wody z roztworu izotonicznego do bardziej stężonego – cytozolu, wskutek czego dochodzi do pęcznienia i rozerwania komórki [7].

Dodatkowy etap oczyszczania stosuje się w przypadku białek związanych z błonami (rys 1).



Rys. 1. Mechanizm uwalniania białek błonowych za pomocą detergentów.

Fig. 1. Mechanism of releasing membrane proteins using detergents.

Stanowią one w przybliżeniu 1/3 wszystkich białek zakodowanych w genomie, jednak mniej niż 1% ma poznaną strukturę. Wysoko wydajna krystalografia zwiększa możliwości poznania struktury tych białek. Do celów krystalograficznych niezbędne jest otrzymanie białka o wysokim stopniu czystości [12]. W przypadku białek integralnych, związanych z hydrofobowym rdzeniem, błona biologiczna zostaje poddana działaniu detergentu anionowego, takiego jak Tryton X-100, który nie denaturuje białka i zapobiega jego inaktywacji.

W wyniku działania detergentu dochodzi do uszkodzenia podwójnej warstwy lipidowej i uwolnienia do roztworu integralnych białek błonowych, które zostają okryte warstwą cząsteczek detergentu, co zapobiega agregacji białka. Wybór detergentu jest jednym z czynników mającym wpływ na czystość uzyskanego białka. Istnieje wiele różnych detergentów w codziennym użyciu w biochemii, ale kilka o dopiero co poznawanych właściwościach. Mieszaniny detergentów są szczególnie przydatne, z niedenaturującymi dodatkami, które często odgrywają krytyczną rolę w procesie oczyszczania [12]. Natomiast peryferyjne białka błonowe, które niezwiązane są z rdzeniem hydrofobowym błony biologicznej, można usunąć bez dezintegracji dwuwarstwy lipidowej, przez przemywanie błon roztworem o dużej sile jonowej, np. 1 M NaCl lub o wysokim pH, na skutek zerwania oddziaływań jonowych i wodorowych, przytrzymujących białka peryferyjne na powierzchni błony [2, 5, 7, 8, 13].

Oczyszczanie wyizolowanych białek na drodze chromatografii kolumnowych

Przed przystąpieniem do dalszego oczyszczania białek należy określić ich przeznaczenie, wymagany stopień czystości oraz aktywność. W zależności od przeznaczenia produkt finalny może mieć trzy stopnie czystości: bardzo wysoki >99%, wysoki 95-99% oraz umiarkowany <95% (tab. 2).

O zaakceptowaniu określonego stopnia czystości decyduje również rodzaj zanieczyszczenia, który pozostał w preparacie białkowym. Mogą być tolerowane tylko te, które są nieszkodliwe. Gorzej, jeśli wykazują one aktywność biologiczną i ich obecność może wiązać się z poważnymi problemami zarówno w analityce, jak i zastosowaniach terapeutycznych. Dlatego ważne jest wczesne rozpoznanie rodzaju zanieczyszczeń i stwierdzenie, które muszą być bezwzględnie usunięte, a które mogą pozostać w preparacie na akceptowalnym poziomie. Ważne jest wczesne usunięcie wszelkich czynników powodujących straty białka i obniżenie jego aktywności biologicznej, np. proteazy [17].

Tabela 2

Wymagany stopień czystości preparatu białkowego w zależności od jego przeznaczenia.
A required purity degree of a protein product depending on its application.

Bardzo wysoki > 95% Extremely high degree > 95%	Badania <i>in vivo</i> , zastosowania terapeutyczne <i>In vivo</i> studies, therapeutic application
Wysoki 95 – 99% High degree 95 – 99%	Krystalografia oraz większość metod fizykochemicznych X-ray crystallography and the majority of physical & chemical characterisation methods
Umiarkowany < 95% Moderate degree < 95%	Antygen do produkcji przeciwciał, sekwencjonowanie białka od N-końca Antigen to produce antibodies, N-terminal sequencing

Zródło: / Source: [17]

W celu właściwego oczyszczania białek obecnych w materiale biologicznym ważna jest znajomość właściwości białka docelowego oraz zanieczyszczeń, które należy usunąć. Dotyczy to zarówno technik separacji, jak i warunków oczyszczania, tak aby straty białka spowodowane jego inaktywacją były możliwie najmniejsze. Warunkiem otrzymania białka o wymaganej aktywności biologicznej i niezmięnionej strukturze jest zapewnienie warunków podobnych do naturalnych, jakie występują w materiale biologicznym. Pomimo dużej ostrożności stosowane procedury oczyszczania mogą powodować zmianę warunków środowiskowych, co nierzadko ma negatywny wpływ na stabilność oczyszczanych białek. Znajomość parametrów środowiska krytycznych dla stabilności białka ma istotne znaczenie w zminimalizowaniu zmian podczas doboru buforów do ekstrakcji i przy dalszych etapach oczyszczania. Dotyczy to zwłaszcza takich parametrów, jak: pH, siła jonowa, właściwości redukujące,

obecność kofaktorów czy takich czynników fizycznych, jak czas, temperatura, ciśnienie [17]. Istnieje wiele związków, które mają stabilizujący wpływ na strukturę białka. Związki redukujące, takie jak ditiotreitol (DTT) czy β -merkaptoetanol zapobiegają utlenianiu grup tiolowych, dzięki czemu chronią białko przed zmianami konformacyjnymi czy utratą aktywności enzymatycznej. Kolejnym ważnym czynnikiem mającym wpływ na stabilność białka i jego rozpuszczalność jest pH środowiska. Jeśli pH środowiska jest identyczne z punktem izoelektrycznym białka, wówczas rozpuszczalność białka maleje i łatwo ulega ono agregacji. Jednym z kluczowych parametrów, który należy brać pod uwagę, jest siła jonowa środowiska. Niekorzystne stężenie soli w buforze może prowadzić do agregacji białek. Przy sile jonowej w przedziale od zera do wartości fizjologicznych (0,15–0,2 M) niektóre białka wykazują tendencję do tworzenia precypitatów na skutek niewystarczających ładunków powodujących odpychanie się cząsteczek białka. Natomiast, gdy stężenie soli jest za wysokie, wówczas białka ulegają wysalaniu. Jeśli białko wykazuje stabilność temperaturową, to można wykonywać wszelkie czynności w niższej temperaturze [10]. Ważna jest też wiedza o wrażliwości na działanie enzymów proteolitycznych, co ma wpływ na podjęcie decyzji o usunięciu proteaz lub też dodatku inhibitorów. Równie ważna jest znajomość właściwości mających bezpośredni wpływ na dobór techniki separacji (tab. 3), takich jak: masa cząsteczkowa (sączenie molekularne), ładunek powierzchniowy białka (w celu ustalenia warunków chromatografii jonowymiennej), powinowactwo (wybór ligandu do chromatografii powinowactwa), hydrofobowość (wybór medium do chromatografii hydrofobowej) [10, 17].

Bardzo istotne jest opracowanie metod analitycznych umożliwiających monitoring dobrze przeprowadzonego procesu oczyszczania białka. Dotyczy to zarówno samego białka, jak i metod identyfikacji krytycznych zanieczyszczeń. Ilość białka oznacza się zwykle za pomocą metod Lowry'ego [14] czy Bradforda [3]. W eluacie białko może być mierzone na podstawie pomiaru absorbancji światła o długości fali 280 nm, absorbowanego przez tyrozynę, tryptofan i fenyloalaninę. Z innych metod można wyróżnić: metody immunochemiczne, takie jak ELISA czy immunoblotting [20], metody elektroforetyczne, szczególnie przydatne do określania efektywności oczyszczania (SDS-PAGE, NATIVE) czy metody chromatograficzne HPLC [16]. Ponadto, jeśli oczyszczane białko wykazuje aktywność biologiczną, wówczas ta jego właściwość może być wykorzystana do określania stopnia czystości.

Tabela 3

Właściwości białka mające wpływ na dobór parametrów oczyszczania.

Properties of proteins and their effect on the selection of the purification process parameters.

Próba i właściwości białka docelowego Sample and properties of a target protein	Wpływ na strategię oczyszczania Type of the effect on the purification strategy
Stabilność temperaturowa Temperature stability	Możliwość pracy w niższej temperaturze It is possible to work at a lower temperature
Stabilność pH pH stability	Wybór buforów do ekstrakcji i oczyszczania, ustalenie warunków chromatografii jonowymiennej, powinowactwa i odwróconej fazy Selecting buffers for extraction and purification, identifying conditions of the ion exchange, affinity or reversed phase chromatography
Wymagania dotyczące detergentów (zwykle niejonowych) Requirements referring to detergents (usually non-ion detergents)	Wpływ na stabilność białka, izolowanie białek błonowych Effect on the protein stability; separation of cell proteins
Stężenie soli (siła jonowa środowiska) Concentration rate of salts (ion strength)	Ustalenie warunków precypitacji oraz warunków oddziaływań hydrofobowych Identifying precipitation conditions and conditions of the hydrophobic interaction chromatography
Obecność kofaktorów w celu zapewnienia stabilności i aktywności Presence of co-factors to ensure the stability and activity	Wybór dodatków, pH, soli, buforów Selection of additives, pH, salts, and buffers
Wrażliwość na działanie proteaz Protease sensitivity	Usunięcie proteaz lub dodatek inhibitorów Fast removal of proteases or addition of inhibitors
Wrażliwość na jony metali Sensitivity to metal ions	Dodatek związków chelatujących do buforów (EDTA lub EGTA) Addition of EDTA or EGTA to buffers
Wrażliwość na utlenianie Redox sensitivity	Dodatek reduktorów wiązań S-S (2-merkaptoetanol, DTT) Addition of bond reducing agents (2-merkaptoethanol, DTT)
Masa cząsteczkowa Molecular weight	Wybór medium do sączenia molekularnego Selection of gel filtration media
Ładunek powierzchniowy białka Surface charge of the protein	Ustalenie warunków chromatografii jonowymiennej Identifying and determining the ion exchange conditions
Powinowactwo Bio-specific affinity	Wybór ligandu do chromatografii powinowactwa Selecting a ligand for the affinity chromatography
Hydrofobowość Hydrophobicity	Wybór medium do chromatografii oddziaływań hydrofobowych Selecting a medium for the hydrophobic interaction chromatography

Przy podejmowaniu decyzji odnośnie do oczyszczania białka bardzo ważne jest zastosowanie procedury wykorzystującej jak najmniejszą liczbę technik, jednocześnie zapewniającą uzyskanie produktu o wymaganym stopniu czystości i wymaganej aktywności. Wynika to m.in. z ryzyka utraty znacznych ilości białka oraz jego aktywności na poszczególnych etapach oczyszczania, a także istnieje możliwość znacznego wydłużenia czasu i tym samym zwiększenie kosztów finalnych całego procesu oczyszczania. Przykładowo, jeśli próba ma niską siłę jonową środowiska, wówczas w pierwszym etapie może być oczyszczana przy zastosowaniu IEX (tab. 4).

Tabela 4

Porównanie warunków początkowych i końcowych stosowanych technik chromatograficznych.
Comparison of the starting and closing conditions for the chromatographic techniques applied.

Technika Technique	Warunki początkowe Starting conditions	Warunki końcowe Closing conditions
Chromatografia jonowymienna (IEX) Ion exchange chromatography	Niskie stężenie soli, objętość próby nielimitowana Low ionic strength, sample volume not limited	Wysokie stężenie soli lub zmiana pH, próba zagęszczona High ionic strength or pH change, concentrated sample
Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC) Hydrophobic interaction chromatography	Wysokie stężenie soli, objętość próby nielimitowana High ionic strength, sample volume not limited	Niskie stężenie soli, próba zagęszczona, Low ionic strength, concentrated sample
Chromatografia powinowactwa (AC) Affinity chromatography	Warunki charakterystyczne wiązania do ligandu, objętość próby nielimitowana Specific binding conditions, sample volume not limited	Warunki charakterystyczne dla elucji, próba zagęszczona Specific elution conditions, concentrated sample
Sączenie molekularne (GF) Gel filtration	Ograniczona objętość próby <5% całkowitej objętości kolumny Limited sample volume <5% total column volume)	Wymiana buforu, próba rozcieńczona Buffer exchange; diluted sample

Źródło: / Source: [17]

Po elucji z kolumny IEX próba znajduje się zwykle w buforze o wysokiej sile jonowej i w następnym etapie może być oczyszczana na kolumnie HIC (w razie potrzeby można ustalić pH oraz dodać soli). I odwrotnie, jeśli próba jest eluowana z kolumny HIC, wówczas ma wysokie stężenie soli i niekiedy należy ją rozcieńczyć lub wymienić bufor do poziomu umożliwiającego zastosowanie IEX [17]. Kolejny przykład, precypitacja siarczanem amonu stanowi często pierwszy etap klarowania i zagęszczania białka i w tej sytuacji HIC, która przebiega w warunkach wysokiego stężenia soli niezbędnego do związania białek w matrycy kolumny, stanowi idealną technikę w pierwszym etapie oczyszczania. Stężenie soli oraz objętość końcowa próby zostanie znacznie zmniejszona po elucji z kolumny HIC. Rozcieńczanie frakcji lub szybka wymiana buforu, z zastosowaniem kolumnienek do odsalania Sephadex G-25, przygotowuje próby do etapu oczyszczania na IEX lub AC. Z kolei technika sączenia molekularnego jest szczególnie przydatna po technikach zagęszczających (IEX, HIC, AC), z uwagi na ograniczenia objętości nanoszonych prób [17].

Bardzo często frakcjonowanie białek przeprowadza się stosując związki chemiczne powodujące precypitację (tab. 5).

Tabela 5

Przykłady stosowania związków chemicznych do precypitacji białek.
Examples of chemical compounds used in the protein precipitation process.

Związek precypitujący Precipitation agent	Rodzaj próby Sample type	Komentarz Comment
Siarczan amonu Ammonium sulphate	>1mg białka/ml, szczególnie immunoglobuliny >1mg /ml proteins, especially immunoglobulins	Stabilizuje białka, nie denaturuje, supernatant bezpośrednio kierowany na HIC Stabilizes proteins; no denaturation, supernatant can go directly to HIC
Glikol polietylenowy Polyethylene glycol	Białka plazmy Plasma proteins	Nie denaturuje białka, supernatant bezpośrednio kierowany do IEX lub AC. No protein denaturation; supernatant goes directly to IEX or to AC
Aceton Acetone	Precypitacja peptydów lub zagęszczanie białek do elektroforezy Useful in the peptide precipitation or while concentrating proteins for the electrophoresis process	Może denaturować białka nieodwracalnie Can irreversibly denature protein

Źródło:/Source: [17]

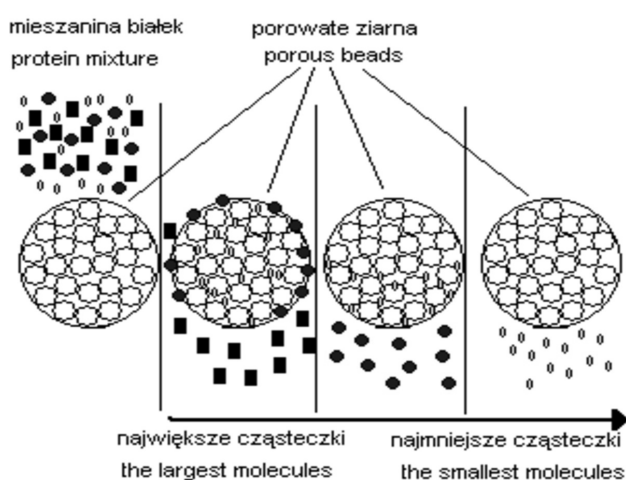
Najczęściej stosuje się siarczan amonu, którego zaletą jest to, że zachowuje natywną strukturę białka. W technice tej wykorzystuje się fakt, że w obecności dużego stężenia soli rozpuszczalność większości białek maleje. Przy odpowiednio dużym stężeniu soli białko wypada z roztworu, czyli ulega precypitacji. Wielkość obszarów hydrofobowych w strukturach wysalanych białek wpływa bezpośrednio na zastosowanie niezbędnego stężenia soli. Białka o większych obszarach hydrofobowych ulegają wysalaniu szybciej niż te o mniejszych obszarach hydrofobowych. Stąd też jest możliwe zastosowanie tej procedury do frakcjonowania mieszaniny białek. Wysalanie stosuje się również w późniejszych etapach procesu oczyszczania, aby zagęścić rozcieńczony roztwór białka, ponieważ białko po precypitacji może zostać ponownie rozpuszczone w mniejszej objętości buforu [17].

Techniki chromatograficzne są wykorzystywane do separacji makromolekuł na podstawie takich parametrów, jak: wielkość i kształt, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy czy powinowactwo [1].

Sączenie molekularne

Stosując sączenie molekularne, zwane także filtracją żelową, rozdziela się białka na podstawie wielkości i kształtu ich cząsteczek. W technice tej mała objętość próby, stanowiąca < 5% objętości kolumny, jest nanoszona na szczyt kolumny, której wypełnienie stanowią porowate ziarna nierozpuszczalnego polimeru, takiego jak poliakryloamid. Ponadto stosuje się ziarna, których podstawowym składnikiem jest

dekstran (Sephadex). Do syntezy ziaren żelu Sephadex stosuje się dekstran o średniej masie cząsteczkowej $30\text{--}50 \cdot 10^3$ Da. Otrzymane ziarna mają zdolność wiązania wody w granicach 25 ml/ml. Żele serii G stosowane są do rozdzielania substancji w środowisku wodnym i glicerolowym, natomiast w środowiskach polarnych stosuje się Sephadex LH-20. Innym związkem do produkcji ziaren jest agaroz, a otrzymany związek – Sepharose – jest przeznaczony do rozdzielania cząstek o masie powyżej $100 \cdot 10^4$ Da [11]. Podczas rozdzielania małe cząsteczki, takie jak jony, dyfundują w głąb żelu i poruszają się wolniej w kolumnie, natomiast cząsteczki większe lub o wydłużonym kształcie wypływają z kolumny jako pierwsze (rys. 2).



Rys. 2. Mechanizm separacji cząsteczek na podstawie wielkości i kształtu przy zastosowaniu sączenia molekularnego.

Fig. 2. Mechanism of separating molecules by their sizes and shapes in a gel filtration process.

W przeciwieństwie do pozostałych technik chromatograficznych cząsteczki nie wiążą się z wypełniaczem kolumny, dlatego skład buforu nie ma wpływu na rozdział. Zaletą tej metody jest także fakt, że warunki rozdzielania mogą być dostosowane do rodzaju próby, a także warunków wymaganych w kolejnych etapach oczyszczania, analizy czy przechowywania.

Technika ta szczególnie nadaje się do oczyszczania białek wrażliwych na zmiany pH czy występowanie jonów metali. Sam rozdział może być prowadzony w obecności niezbędnych jonów, kofaktorów, detergentów, mocznika, przy wysokiej lub niskiej sile jonowej, a oczyszczone białka mogą znajdować się w dowolnym buforze [6].

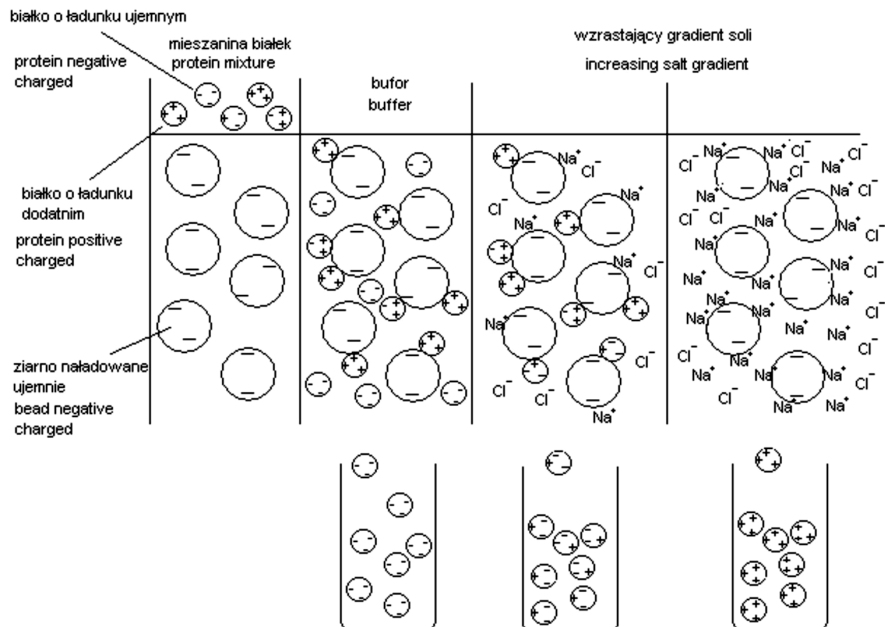
Chromatografia jonowymienna

W chromatografii jonowymiennej rozdział białek uzależniony jest od ich powierzchniowego ładunku i polega na odwracalnej wymianie jonowej ze znajdującymi się w roztworze, obdarzonymi ładunkiem przeciwnym, unieruchomionymi jonami wymiennicza jonowego. Pierwszym etapem jest kalibracja,

podczas której wymiennicz jonowy jest doprowadzany do warunków początkowych, dotyczy to pH oraz siły jonowej środowiska, które zapewniają wymianę jonową pożądaných cząsteczek z buforem inicjującym. Na tym etapie grupy wymiennicza są związane z przeciwjonami buforu startowego (zwykle Cl^- lub Na^+). W drugim etapie następuje naniesienie próby na kolumnę oraz adsorpcja znajdujących się w roztworze cząsteczek o ładunku przeciwnym do ładunku grup wymiennicza. Obdarzone ładunkiem cząsteczki białka wypierają związane z wymienniczem przeciwjony i wiążą się z nim odwracalnie. Niezwiązane substancje mogą być wymyte z kolumny za pomocą buforu startowego. Następnie, związane białka są usuwane z kolumny na drodze wymiany jonowej z buforem wymywającym. Osiąga się to zwykle przez zwiększenie siły jonowej (wzrost stężenia soli) buforu eluującego lub przez zmianę jego pH. W przypadku zwiększania stężenia soli desorpcja następuje wraz ze zwiększaniem gradientu soli, a związane cząsteczki są uwalniane z kolumny w zależności od siły wiązania z wymienniczem (rys. 3).

Najsłabiej związane substancje są eluowane jako pierwsze. Oprócz elucji gradientem NaCl, białka można wymywać zmieniając pH buforu, co powoduje zmianę stanu jonizacji bocznych reszt aminokwasów, a co za tym idzie ładunku białka. Po zakończonym rozdziale kolumnę regeneruje się w celu usunięcia z niej substancji niewymytych, na drodze elucji buforem o wysokiej sile jonowej, a następnie przeprowadza się kalibrację do warunków początkowych [17].

Do rozdziału białek obdarzonych ładunkiem ujemnym stosuje się kolumny zawierające dodatnio naładowane grupy dietyloaminoetylowe (DEAE), takie jak DEAE-celuloza lub DEAE-Sephadex. Jest to typ chromatografii anionowymiennej. Natomiast do rozdziału białek o ładunku dodatnim stosuje się kolumny zawierające wypełnienie obdarzone ładunkiem ujemnym grup karboksymetylowych (CM), np. CM-celuloza lub CM-Sephadex. Jest to typ chromatografii kationowymiennej [7, 9, 11].

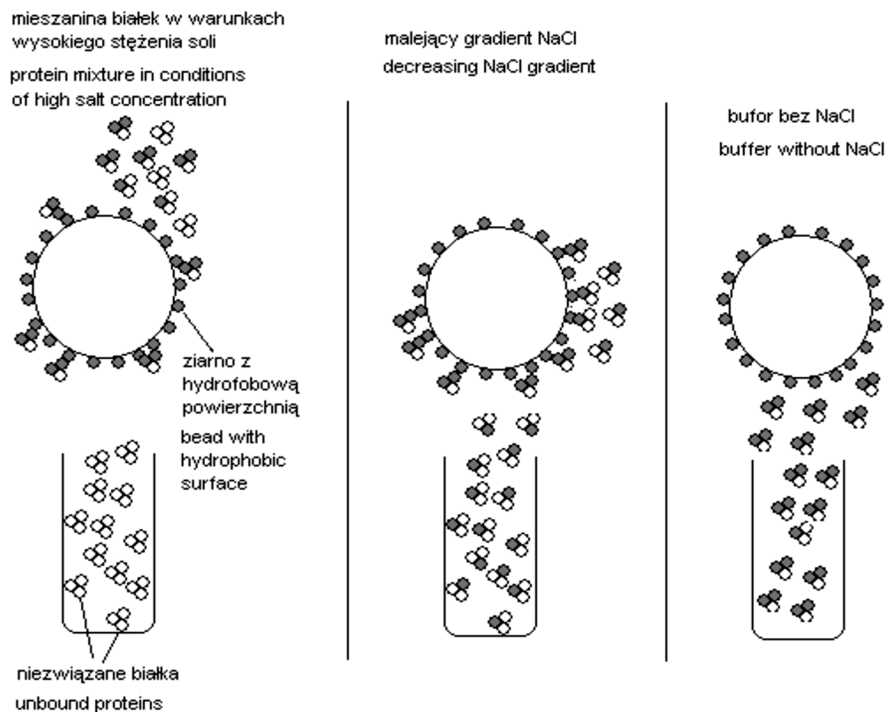


Rys. 3. Przykład rozdziłu białek za pomocą techniki chromatografii jonowymiennej w gradiencie soli.
Fig. 3. Example of separating proteins with the use of ion exchange chromatography in a salt gradient.

Chromatografia oddziaływań hydrofobowych

Ważną techniką oczyszczania białek, wykorzystującą ich hydrofobową naturę, często stosowaną w połączeniu z chromatografią jonowymienną oraz sączeniem molekularnym, jest chromatografia oddziaływań hydrofobowych.

Technika chromatografii oddziaływań hydrofobowych rozdziela białka na podstawie różnic w sile oddziaływania obszarów hydrofobowych białka z jeszcze bardziej hydrofobowymi grupami ligandów, umocowanymi na powierzchni nośnika pozbawionego ładunku elektrycznego. Wiązanie białka do nośnika hydrofobowego jest osiągane przez stosowanie buforów o wysokiej sile jonowej środowiska, np. 1,5 M roztwór siarczuanu amonu, a uwalnianie białek następuje przez ich wymywanie buforem o zmniejszającym się gradiencie soli [2, 12, 17, 19]. Mechanizm oczyszczania białek za pomocą techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych przedstawiono na rys. 4. Inny sposób elucji polega na zwiększeniu pH buforu czy dodatku komponentów wykazujących silne powinowactwo do ligandu lub zwiększające hydrofilność białek, np. alkohole i aminy alifatyczne lub detergenty niejonowe.



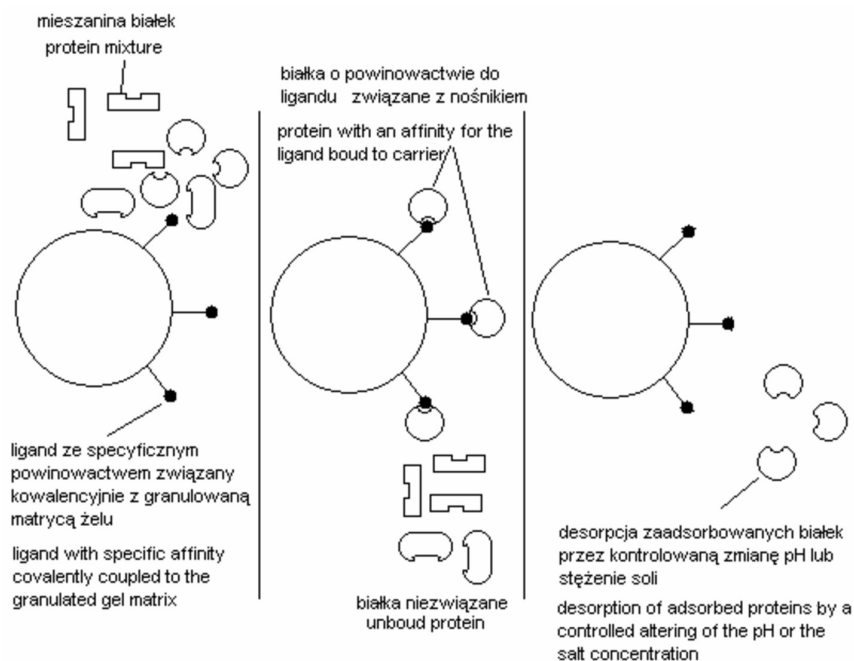
Rys. 4. Oczyszczanie białek za pomocą techniki chromatografii oddziaływań hydrofobowych.

Fig. 4. The protein purification process with the use of hydrophobic interaction chromatography.

Chromatografia powinowactwa

Techniką rozdzielania wykorzystującą wzajemne powinowactwo dwóch substancji jest chromatografia powinowactwa. Umożliwia ona rozdział białek na podstawie odwracalnej reakcji dwóch wykazujących specyficzne powinowactwo substancji, z których jedna – ligand związana jest ze stałym nośnikiem. Dzięki tej technice można oczyszczać następujące substancje: enzym-substrat, enzym-inhibitor, przeciwciało-antygen, hormon-receptor, kwasy nukleinowe-białka [1, 4, 11, 15, 21]. Na rys. 5 przedstawiono schemat oczyszczania białek techniką chromatografii powinowactwa.

W chromatografii powinowactwa wyróżnia się następujące etapy: kalibracja, adsorpcja białka i elucja niezwiązanego materiału, zakończenie wymywania niezwiązanego materiału, elucja związanych białek, zakończenie wymywania związanych białek, kalibracja kolumny.



Rys. 5. Oczyszczanie białek za pomocą techniki chromatografii powinowactwa.

Fig.5. Protein purification with using affinity chromatography.

Jedną z najskuteczniejszych technik oczyszczania białek jest chromatografia immunopowinowactwa, wykorzystująca unieruchomione przeciwciała. Wysokie powinowactwo przeciwciała do antygeny może być wykorzystane do wysoce selektywnej adsorpcji białek. W chromatografii immunopowinowactwa zastosowanie mają dwa rodzaje przeciwciał: przeciwciała poliklonalne i przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała poliklonalne, otrzymane w wyniku immunizacji zwierzęcia, są mieszaniną przeciwciał o różnej specyficzności, wiążących różne epitopy antygeny [21]. Przeciwciała te są relatywnie łatwe do otrzymania, jednak mają także kilka wad. Ze względu na duże zróżnicowanie przeciwciał pod względem specyficzności istnieje niebezpieczeństwo wystąpienia reakcji krzyżowej, czyli wiązania białek mających identyczny lub zbliżony strukturalnie epitop, co w konsekwencji uniemożliwiłoby skuteczne oczyszczanie danego białka. Ponadto, produkcja przeciwciał poliklonalnych nie jest powtarzalna ze względu na cechy osobnicze immunizowanych zwierząt tego samego gatunku, co wiąże się z dodatkowymi etapami usuwania niepożądanych przeciwciał. Poza tym trudno jest uzyskać odpowiednią ilość krwi – w zależności od gatunku zwierzęcia od kilku do kilkudziesięciu cm^3 . Natomiast przeciwciała monoklonalne, mimo że ich otrzymanie jest znacznie droższe i bardziej złożone, mają wiele zalet, dzięki którym doskonale nadają się do oczyszczania białek. Po pierwsze, do ich produkcji nie potrzeba antygeny o wysokim stopniu czystości. Poza tym mogą być

otrzymywane potencjalnie w nieograniczonej ilości oraz, co jest bardzo istotne, dzięki identycznej specyficzności, tj. wiązaniu tego samego epitopu z identyczną siłą, zapewniają powtarzalność procesu oczyszczania, dotyczącą zwłaszcza warunków wiązania i elucji białek [4].

Ze względu na siłę oddziaływania między antygenem i przeciwciałem dość trudno jest wymyć antygen z kolumny immunopowinowactwa. Jednak można tego dokonać na kilka sposobów, np.: zastosowanie skrajnych wartości pH (3 lub 10), użycie związków denaturujących (8 M mocznik lub 6 M chlorowodorek guanidyny) lub związków chaotropowych (3 M KSCN). Aczkolwiek należy liczyć się z tym, że elucja w tych warunkach prowadzi bardzo często do zmian strukturalnych białka, co jest niepożądane, zwłaszcza w przypadku białek wykazujących aktywność biologiczną, np. enzymów [4].

Przechowywanie oczyszczonego białka

Warunki w jakich przechowuje się białko mają istotny wpływ na zachowanie jego niezmienionej struktury oraz aktywności biologicznej przez cały okres przechowywania. Okres ten może wynosić od kilku dni do ponad roku w zależności od natury białka oraz warunków przechowywania. Czynniki, które mają największy wpływ na stabilność białka podczas przechowywania są: temperatura, czas przechowywania, czystość preparatu. Porównanie warunków przechowywania przedstawiono w tab. 6.

Tabela 6

Porównanie warunków przechowywania białek.
Comparison of the protein storage conditions.

Warunki przechowywania Storage conditions	Roztwór w temp. 4°C Solution at 4°C	25-50% glicerol lub glikol etylenowy w temp. -20°C 25-50% glycerol or ethylene glycol at -20°C	Zamrożone w temp. od -20°C do -80°C lub w ciekłym azocie Frozen at -20°C to -80°C or in liquid nitrogen	Liofilizowane (zwykle zamrożone) Lyophilised (usually frozen)
Czas przechowywania Storage period	1 miesiąc 1 month	1 rok 1 year	Kilka lat Several years	Kilka lat Several years
Wymagania dotyczące sterylności lub dodatku substancji anybakteryjnych Requirements with regard to sterile conditions or antibacterial agents added	Tak Yes	Zwykle tak Usually yes	Nie No	Nie No
Rozmrażanie próby Defrosting of the sample	Wiele razy Many times	Wiele razy Many times	Jeden raz Once	Jeden raz Once

Źródło: / Source: [18]

Białka do czasu wykonania analiz powinny być przechowywane w temperaturze poniżej 4°C w czystych, autoklawowanych szklanych pojemnikach lub probówkach polipropylenowych. Przechowywanie w temperaturze pokojowej prowadzi bardzo często do degradacji i obniżenia aktywności biologicznej białka, głównie na skutek obecności drobnoustrojów. Natomiast w temp. 4°C białka można przechowywać od jednego dnia do kilku tygodni. Obniżenie temp. do przedziału od -20°C do -80°C wydłuża okres przechowywania białka nawet do kilku lat. W tym przypadku należy unikać rozmrażania i ponownego zamrażania preparatu, ponieważ prowadzi to do obniżenia stabilności białka, a w rezultacie do obniżenia jego aktywności. Dlatego preparat białka przeznaczony do zamrożenia należy przechowywać w małych porcjach, które nie będą ponownie zamrażane [18].

Na stabilność białka wpływa również stężenie białka w preparacie. Białko o stężeniu poniżej 1 mg/ml jest bardziej podatne na inaktywację i straty ze względu na niski poziom wiązania do ścianek naczynia, w którym jest przechowywane [18]. Dlatego najlepszym sposobem jest przechowywanie białka w bardziej skoncentrowanej formie albo dodanie białka stabilizującego, takiego jak oczyszczona albumina serum krwi bydlęcej (BSA) do końcowego stężenia 10–15 mg/ml, co pozwoli ochronić przechowywane białko przed stratami.

Wiele składników może mieć wpływ na okres przechowywania białka [18], np.:

- substancje kriochronne, takie jak glicerol lub glikol etylenowy w stężeniu 25–50%, pomagają stabilizować białko przez zapobieganie tworzeniu się kryształów lodu, który niszczy strukturę białka przechowywanego w temp. -20°C i niższej;
- inhibitory proteaz, które zapobiegają degradacji proteolitycznej białka;
- substancje antybakteryjne, takie jak azydek sodu (NaN_3) w stężeniu 0,02–0,05% hamują wzrost mikroorganizmów;
- związki chelatujące w stężeniu 1–5 mM zapobiegają utlenianiu grup –SH indukowanemu przez metale;
- związki redukujące, takie jak DTT, czy 2-merkaptoetanol w stężeniu 1–5 mM zapobiegają utlenianiu cysteiny, stabilizując tym samym strukturę przestrzenną białka.

Podsumowanie

Wyzolowanie białka z zachowaniem jego aktywności biologicznej i struktury natywnej jest zadaniem trudnym, wynikającym z konieczności zapewnienia warunków zbliżonych do naturalnych podczas samego procesu oczyszczania i przechowywania. Ograniczenie, tam gdzie to jest możliwe, liczby etapów oczyszczania sprzyja zmniejszeniu strat oczyszczanego białka. Dlatego też stosowane metody powinny być starannie dobrane i na tyle łagodne, aby zminimalizować degradację cząsteczek białka, a ponadto powinny charakteryzować się bardzo wysoką specyficzną rozdzielczą białek występujących w materiale biologicznym, co pozwala na wysoki stopień ich

oczyszczenia. Ma to duże znaczenie zarówno w badaniach, jak i w analityce żywności, a także w poznaniu ich właściwości funkcjonalnych, szczególnie w przypadku białek stosowanych jako dodatki do żywności.

Literatura

- [1] Affinity Chromatography Handbook. www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/affinity.pdf.
- [2] Bowie J.U.: Stabilizing membrane proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 2001, **11**, 397-402.
- [3] Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.*, 1976, **72**, 248-254.
- [4] Burgess R.R., Thompson N.E.: Advances in gentle immunoaffinity chromatography. *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, **13**, 304-308.
- [5] Eriks L.R., Mayor J.A., Kaplan R.S.: A strategy for identification and quantification of detergents frequently used in the purification of membrane proteins. *Anal. Bioch.*, 2003, **323**, 234-241.
- [6] Gel Filtration Handbook. home.postech.ac.kr/~smw1905/source/gel%20filtration.pdf.
- [7] Hames B.D., Hooper N.M., Houghton J.D.: *Krótkie wykłady. Biochemia*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1999.
- [8] Ichimura T., Ikuta N., Uda Y., Horigome T., Omata S.: Separation of membrane proteins solubilized with a non-denaturing detergent and a high salt concentration by hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioch.* 1995, **224**, 250-255.
- [9] Ion Exchange Chromatography Handbook. www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/ion_exchange.pdf
- [10] Kaufmann M.: Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures. *J. Chrom. B.*, 1997, **699** 347-369.
- [11] Kłyszewko-Stefanowicz L. (red.): *Ćwiczenia z biochemii*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1999.
- [12] Lienqueo M.E., Mahn A., Vasquez L., Asenjo J.A.: Methodology for predicting the separation of proteins by hydrophobic interaction chromatography and its application to a cell extract. *J. Chrom. A.*, 2003, **1009** 189-196.
- [13] Loll P.J.: Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J. Struc. Biol.*, 2003, **142** 144-153.
- [14] Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall J.R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol.Chem.*1951, **193**, 265-275.
- [15] Muronetz V.I., Sholukh M., Korpela T: Use of protein – protein interactions in affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, **49** 29-47.
- [16] Pospiech E., Peltre G., Wąsowicz E., Jeleń H., Greaser M.L., Mikołajczak B., Bresińska A., Gorączka A.: Metody separacji i ocena rozdziałów: elektroforeza, wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa, spektroskopia masowa. W: *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii – pod red. M. Jankiewicza i Z. Kędziora*. Wyd. AR. Poznań 2003, s. 155-193.
- [17] Protein Purification Handbook. www.fm.uit.no/info/imb/amb/courses/bio360s/pdf/handbook.pdf
- [18] Protein stability and storage. Technical resource. TR0043.0 www.piercenet.com/files/TR0043dh4
- [19] Queiroz J.A., Tomaz C.T., Cabral J.M.S.: Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Biotech.* 2001, **87** 143-169.
- [20] Warchalewski J.R., Kałużewska M., Piasecka-Kwiatkowska, Daussant J., Bielecki S., Wyatt G.M., Gruchała L.: Metody immunoanaliz i ich zastosowanie w przemyśle spożywczym. W: *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii – pod red. M. Jankiewicza i Z. Kędziora*. Wyd. AR Poznań 2003, s. 17-154.

- [21] Wilchek M., Miron T.: Thirty years of affinity chromatography. *Reac. Func. Polym.*, 1999, **41** 263-268.

THE REVIEW OF PROTEIN SEPARATION AND PURIFICATION METHODS APPEARING USEFUL IN RESEARCH AND FOOD ANALYSIS

S u m m a r y

In this paper, some up-to-date methods of protein separation and purification appearing useful in research and food analysis were reviewed. The protein purification process includes four major phases: selecting a source of protein, isolating and extracting protein from the biological material, purifying the extracted protein using a column chromatography technique, and, finally, storing the protein obtained until it is taken for further analysis.

The content of protein in a biological material and its distribution is one of the factors determining the protein source to be selected. It is possible to win considerable amounts of proteins by employing a DNA recombination technique leading to their increased expression in bacterial cells. When isolating intracellular proteins, it is necessary to utilize additional measures in order to destroy both the tissues and the cells. The cells present in a suspension are destroyed using several methods. With regard to integral protein bound to a biological membrane, an anionic detergent, for example Tryton X-100, is applied to such a biological membrane since this anionic detergent does not cause the denaturation of protein, and it prevents inactivation of the proteins.

Prior to starting the purification process of proteins, it is necessary to determine the application of the final proteins to be obtained, the required degree of their purity, and their activity. Depending on its applications, the final protein product can have three degrees of purity: very high > 99%, high, ranging between 95 and 99%, and moderate < 95%.

Chromatographic techniques are employed to separate macromolecules on the basis of such parameters like: size and shape, hydrophobicity, surface net charge, or affinity. The first of those techniques is molecular sieving chromatography, also known as a gel filtration. If this technique is applied, macromolecules are separated according to their sizes and shapes. The other technique is ion exchange chromatography and with it, proteins are separated according to differences in the surface net charge of protein macromolecules. While applying the hydrophobic interaction chromatography, the separation of proteins is based on differences in the protein hydrophobicity, whereas the affinity chromatography utilizes the affinity of two substances, for example an enzyme and a substrate, and one of these two substances is carrier-bound, thus, immobilized.

In the paper, the purity degree of protein as a final product was discussed with regard to the potential application of such a protein product.

Key words: source protein, protein isolation, chromatographic methods, storage of proteins ☒