

**Е. В. Спиридович,
Л. В. Гончарова, А. Б. Власова, И. И. Смолич**

Электрокинетические явления: теория и методы

Учебно-методическое пособие

**Минск
БГУ
2011**

УДК 577.112.088.3:544.638.3(075.8)
ББК 28.072с.я73
Э45

Рецензенты:
доктор химических наук *Киселев П. А.*;
доктор биологических наук *Кабашникова Л. Ф.*

Э45 **Электрокинетические явления: теория и методы** [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие / Е. В. Спиридович, Л. В. Гончарова, А. Б. Власова, И. И. Смолич. – Минск : БГУ, 2011. Режим доступа: <http://www.elib.bsu.by>, ограниченный
ISBN 978-985-518-577-3.

В пособии изучаются электрокинетические явления. Систематизируются теоретические и практические сведения по электрофорезу белков как одному из основных методов разделения биомолекул.

Предназначено для биологов всех специальностей, использующих методы современной биохимии, студентов, аспирантов и преподавателей университетов, а также сотрудников медицинских, педагогических и сельскохозяйственных научных учреждений.

УДК 577.112.088.3:544.638.3(075.8)
ББК 28.072с.я73

ISBN 978-985-518-577-3

© БГУ, 2011

ПРЕДИСЛОВИЕ

Особенностью развития науки в последние десятилетия является возникновение и бурный рост новых отраслей биологии, таких как молекулярная биология, молекулярная генетика, молекулярная фармакология и другие. Недавно появилось направление молекулярной биологии, которое занимается сравнительным изучением клеточных протеомов, т. е. наборов белков данной клетки в данной фазе ее развития в определенный момент времени. Все эти направления представляют собой ответвления биохимии и изучают жизненные явления на молекулярном уровне. Важнейшей предпосылкой их быстрого и успешного развития следует считать разработку принципиально новых и высокоэффективных методов и совершенствование уже существующих методов разделения сложных смесей макромолекулярных веществ, составляющих основу живой материи. Первое место среди этих методов, бесспорно, принадлежит электрофорезу, в основе которого лежат электрокинетические явления. Этот метод благодаря своей доступности, относительной простоте и разнообразию решаемых с его помощью задач получил необычайно широкое распространение.

Клетки и ткани биологических объектов – сложные гетерогенные коллоидные системы. Изучение электрокинетических явлений, протекающих в этих системах, необходимо при проведении физико-химических исследований макромолекулярных структур (белков и ДНК), биосубстратов, клеточных и субклеточных мембран. В связи с этим студентам-биологам необходимо понимать природу и физиологический смысл данных явлений.

Авторы выражают глубокую благодарность рецензентам: профессору, доктору химических наук Петру Андреевичу Киселеву и доктору биологических наук Людмиле Федоровне Кабашниковой за доброжелательный конструктивный анализ рукописи и ценные критические замечания.

Авторы с признательностью примут все замечания и пожелания, направленные на улучшение пособия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БФС – бромфеноловый синий
ДСН – додецил сульфат натрия
ДТТ – дитиотрейтол
ИЭТ – изоэлектрическая точка
ИЭФ – изоэлектрофокусирование
кДа – килодальтон
ЛУК – ледяная уксусная кислота
М. м. – молекулярная масса
МБА – N,N'-метилен-бис-акриламид
ПААГ – полиакриламидный гель
ПСА – персульфат аммония
ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
PMSF – фенилметилсульфонилфлуорид

Глава 1

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

1.1. ПРИНЦИП И ОБЩАЯ ТЕОРИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Сущность электрокинетических явлений, лежащих в основе электрофореза, заключается в движении одной фазы относительно другой под действием электрического поля или в возникновении разности потенциалов в направлении относительного движения фаз при действии механических сил. Впервые эти явления обнаружил профессор Московского университета Ф. Ф. Рейс в 1807 г. Он разделил их на два вида: электрофорез и электроосмос.

Электрофорез – это движение заряженных частиц дисперсной фазы (компонентов дисперсной системы, обладающих наибольшей плотностью) в постоянном электрическом поле по направлению к противоположно заряженному электроду. *Электроосмос* – движение дисперсной среды (компонентов дисперсной системы, обладающих наименьшей плотностью) в постоянном электрическом поле по направлению к электроду, заряженному одноименно с частицами дисперсной фазы. Таким образом, электрофорез и электроосмос – это явления, характеризующиеся взаимопротивоположной направленностью.

В коллоидных растворах при наличии разности гидростатического давления или градиента силы тяжести между дисперсной фазой и дисперсной средой может возникать разность потенциалов. Возникновение потенциала на границе двух фаз всегда связано с наличием на поверхности раздела электрического заряда. Электрический заряд на поверхности клеток и биосубстратов возникает в результате адсорбции ионов на поверхности частиц, а также за счет ионизации диссоциирующих групп дисперсной фазы. Например, большинство глобулярных белков собрано таким образом, что большая часть заряженных групп, а именно гидрофильных, расположена на поверхности белка, тогда как незаряженные, гидрофобные остатки погружены во внутрь глобулы. В электрическом поле в соответствии со своим зарядом белки мигрируют по направлению к противоположно заряженному электроду.

Возникновение зарядов на неионогенных поверхностях (масла, целлюлоза, холестерин и др.) принципиально возможно за счет адсорбции как катионов, так и анионов, но преимущественно адсорбируются последние. Это происходит потому, что анионы менее гидратированы, чем катионы, поэтому для удаления анионов из раствора и их последующей адсорбции на поверхности раздела требуется меньшая затрата энергии. Возникновение поверхностного заряда может происходить в белках, нуклеиновых кислотах, полисахаридах и других органических электролитах, содержащих карбоксильные, гидроксильные, аминные и другие полярные группы, способные к электролитической диссоциации.

Таким образом, наличие заряда на поверхности разделов двух фаз обусловлено асимметричным распределением ионов. Ионы одного знака прочно связаны поверхностью частиц, а ионы противоположного знака находятся в дисперсной среде. Эта система ионов в целом электронейтральна и называется двойным электрическим слоем.

Структура двойного электрического слоя не зависит от механизма возникновения заряда на поверхности частицы, а определяется плотностью расположения зарядов на ее поверхности. При редком расположении зарядов на поверхности частицы вокруг каждого заряда в растворах возникает ионная атмосфера. Истинно двойной слой возникает в случае плотного расположения зарядов и обобществления ионных атмосфер.

Любые факторы, влияющие на величину двойного электрического слоя, изменяют величину электрокинетического потенциала – ζ («дзета»)-потенциала. Электрокинетический потенциал образуется в очень тонком слое жидкости, непосредственно прилегающем к дисперсной фазе, и действует в направлении, перпендикулярном к направлению движения фазы и среды. В связи с этим ζ -потенциал нельзя зарегистрировать непосредственно с помощью электродов. Величину ζ -потенциала можно рассчитать только косвенно, измеряя скорость движения фазы в электрическом поле по следующей формуле (по Гельмгольцу-Смолуховскому):

$$\zeta = 4\eta\pi u / DE,$$

где η – коэффициент вязкости дисперсной среды, u – скорость передвижения фазы, D – диэлектрическая проницаемость, E – градиент потенциала внешнего электрического поля.

Различные частицы или биологические моно- и полимеры, обладая определенной величиной ζ -потенциала, движутся в электрическом поле. Однако направление и скорость движения объектов находится в зависимости от знака и величины их заряда. Для белковых молекул и небольших по размерам частиц, радиус которых соизмерим с толщиной двойного электрического слоя, электрофоретическая подвижность зависит

также от формы и размеров частиц. Именно различия в подвижности частиц, используемые для характеристики вещества, служат основой для разделения смесей веществ в аналитических и препаративных целях.

Итак, величина заряда частицы определяется природой самой частицы, а также находящимися в растворе ионами. Ионы дисперсной среды сильно влияют на величину и знак заряда частиц главным образом благодаря способности адсорбироваться на поверхности частицы.

Так, на величину ζ -потенциала значительно влияют водородные и гидроксильные ионы, сложные органические ионы алкалоидов и красителей благодаря большой адсорбционной способности.

На величину электрокинетического потенциала оказывает влияние концентрация добавленных ионов. Добавление в дисперсную среду ионов противоположно заряженных частиц приводит к тому, что ионная атмосфера, окружающая поверхность частицы, сжимается, становится более плотной, все большее количество противоионов при этом переходит в адсорбционный слой. В результате этого происходит снижение величины ζ -потенциала поверхности частицы. По мере добавления электролитов можно добиться значительного снижения толщины диффузного слоя, а также можно изменить знак заряда частицы на противоположный за счет добавления большой концентрации многовалентных ионов.

В рамках естественнонаучных исследований наиболее часто используют два основных метода электрофореза – макрометод (препаративный) и микрометод (аналитический электрофорез).

Макрометод в большинстве случаев применяют для разделения веществ, находящихся в смеси, и препаративного их выделения. Микрометод используют для изучения подвижности макромолекул в электрическом поле, величины их электрокинетического потенциала, а также для исследования электрохимических свойств поверхности исследуемых объектов. Оба метода могут быть использованы как по отдельности, так и для решения более обширной задачи. Например, для оценки чистоты активных фракций, полученных методом препаративного фракционирования, их подвергают ряду аналитических процедур. Аналитическое фракционирование отличается от препаративного по ряду критериев (табл. 1).

При определении анода и катода в двух различных системах – электрохимической и электролитической, необходимо уяснить различия между процессами, происходящими в системах (табл. 2). Электрофорез еще обозначают как **электролитическая ячейка**, и для исследователя действительный интерес представляет именно движение ионов, а электродные реакции являются предметом изучения электрохимии.

Таблица 1

Различия между препаративным и аналитическим фракционированием

Критерий	Фракционирование	
	Препаративное	Аналитическое
Объем образца	Большой	Малый
Образец	В ходе электрофореза сохраняется	В ходе электрофореза разделяется
Продукт	Активная фракция	Информация

Таблица 2

Сходства и различия между электрохимическими и электролитическими ячейками [P. J. Garnett, 1990]

Электрохимическая ячейка	Электролитическая ячейка
Электрический ток производится в результате химической реакции	Используется электрический ток для осуществления химической реакции
Реакция спонтанная	Необходима электрическая энергия для протекания реакции
Окисление (потеря электронов) происходит на аноде	Окисление (потеря электронов) происходит на аноде
Восстановление (приобретение электронов) происходит на катоде	Восстановление (приобретение электронов) происходит на катоде
Анод обозначен минусом, так как он производит электроны во внешнее окружение	Катод обозначен минусом, так как присоединен к отрицательному терминалу применяемого источника питания
Катод обозначен «плюсом», так как электроны движутся к нему из внешнего окружения	Анод обозначен «плюсом», так как присоединен к положительному терминалу применяемого источника питания
В электролите ток переносят анионы,двигающиеся к аноду, и катионы,двигающиеся к катоду	В электролите ток переносят анионы,двигающиеся к аноду, и катионы,двигающиеся к катоду

С точки зрения физики движение ионов в электролитической системе можно представить следующим образом (рис. 1). Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависит от pH среды. Если этот раствор заключить в канал из изолирующего материала, а затем пропустить через него ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Под дейст-

вием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода. Ограничивающим фактором при этом движении является «трение» макромолекул об «окружающую среду». Отсюда вытекает и суть метода электрофореза: при прочих равных условиях макромолекулы, в зависимости от их величины заряда и размеров, будут обладать различной скоростью миграции.

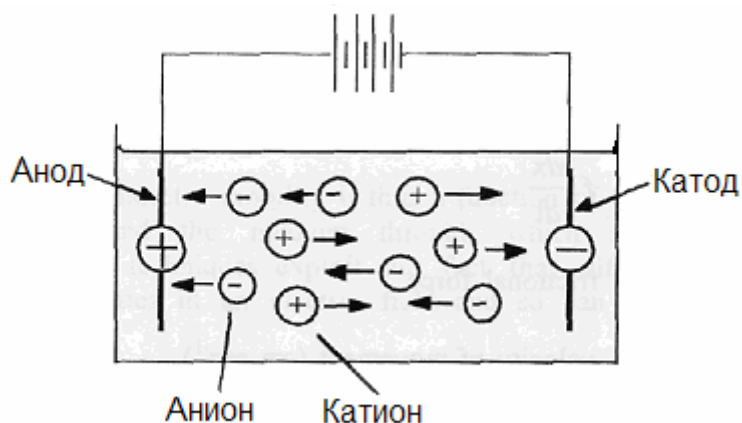


Рис. 1. Схема электрофореза: движение ионов в электрическом окружении

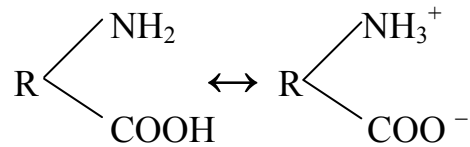
Электрофорез занимает центральное место среди методов биофизических и биохимических исследований белков и нуклеиновых кислот и служит для оценки функционального и патологического состояния клеток и организмов. Среди многих физико-химических техник, которые помогают нам в изучении белков и нуклеиновых кислот, электрофорез занимает ведущее по значению место. Электрофорез оказывается весьма полезным при анализе смеси макромолекул и для оценки чистоты препарата. Использование этого метода позволяет разделять смесь макромолекул, различающихся по таким важнейшим параметрам, как размеры или молекулярная масса, пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд. Причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

1.2. СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ИХ ПОДВИЖНОСТЬ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ПОЛЕ

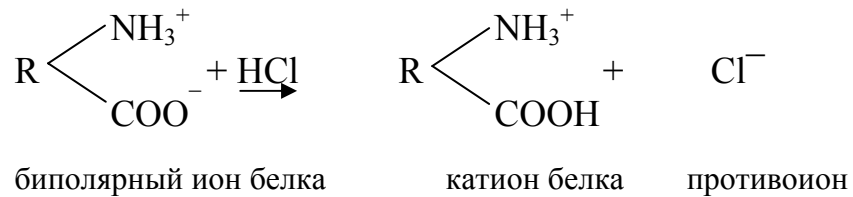
Белки представляют собой амфотерные соединения (цвиттер-ионы), знак и величина заряда которых зависит от кислотных и щелочных группировок белковой молекулы.

Кислотные группировки белка – это карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот, а также фенольные гидроксилы и сульфгидрильные группы. Щелочная реакция белков объясняется наличием амминных,

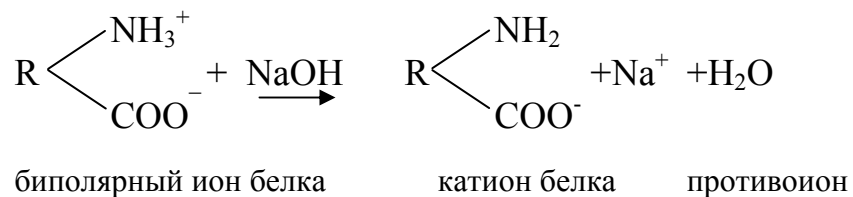
гуанидиновых и имминных групп белка. Кислотно-щелочные свойства белков также зависят от характера соединения остатков аминокислот в белковой молекуле.



В кислых растворах, как правило, большинство белков выступают в роли катиона. Например, при подкислении среды соляной кислотой образуется катион белка и отрицательно заряженный противоион:



В щелочных растворах образуется анион белка. Это связано с диссоциацией карбоксильной группы и с возникновением отрицательно заряженных потенциалобразующих ионов (карбоксилата) и положительно заряженного противоиона:



Установлено, что диссоциация белков зависит от их изоэлектрической точки (ИЭТ, pI). Для большинства белков ИЭТ слегка смещена в кислую сторону.

Итак, белки являются цвиттер-ионами. Их суммарным зарядом, а следовательно, и отношением заряда к массе, можно управлять путем изменения pH буфера, используемого для приготовления заполимеризованного полиакриламидного геля (ПААГ), а также pH рабочего буфера, в котором проводят сам электрофорез. Кислотность рабочего буфера подбирается таким образом, чтобы достичь максимально возможного различия в зарядах белков, составляющих анализируемую смесь. Для кислых белков оптимальные значения pH-буфера находятся в нейтральной или слабощелочной области; миграция белков идет от катода к аноду. Для щелочных белков (гистонов, белков рибосом и др.) целесообразно использовать слабокислые буфера (pH 4–5). Эти белки различаются по ве-

личине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода к катоду.

Степень влияния геля на движение белка (эффект трения) зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости белковой макромолекулы. Электрофоретические свойства глобулярных белков, неспособных к агрегации или диссоциации на субъединицы, мало зависят от структуры геля. Рыхлые глобулярные и, особенно, фибриллярные белки могут деформироваться при взаимодействии с гелем и тем самым облегчать себе миграцию между его нитями.

1.3. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Полиакриламидные гели представляют собой, пожалуй, одну из наиболее широко применяемых гелевых сред при электрофорезе белков, а также нуклеиновых кислот. Поэтому в первую очередь мы приводим примеры использования ПААГ, хотя в исследовательской практике также широко используются гели из агарозы и крахмала. ПААГ образуют вполне определенные, стабильные, химически инертные матрицы с переменным размером пор, механически прочные, удобные в обращении и совершенно прозрачные. Благодаря относительно малому размеру пор диффузия ограничена, а разрешение обычно лучше, чем при работе с любой другой гелевой средой.

Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле (u') пропорциональна их подвижности в свободной жидкости (u_0), которая определяется отношением суммарного заряда макромолекулы к ее массе. Фактором, обуславливающим отличие u' от u_0 , является сила трения о гель, которая зависит от соотношения линейных размеров макромолекул и пор геля и, следовательно, от молекулярных масс белков и концентрации ПААГ. Таким образом, подвижность макромолекул в ПААГ обратно пропорциональна среднему размеру пор (формула Фергюсона):

$$\lg U = \lg U_0 - K_r T,$$

где K_r – коэффициент задержки; U – подвижность макромолекул в геле; U_0 – подвижность макромолекул в свободном растворе; T – плотность геля (концентрация мономеров).

Важной характеристикой полиакриламидного геля является размер пор, которые образуются при его полимеризации. Этот показатель определяет способность биомacroмолекул продвигаться внутри геля в процессе проведения электрофореза. Наличие разветвленной сети пор позволяет селективно просеивать макромолекулы различных размеров.

1.4. ПРИНЦИПЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПААГ И АППАРАТУРА

Рассмотрим основные технические приемы приготовления и использования гелей для электрофореза.

Для получения ПААГ используют акриламид и N,N'-метилен-бис-акриламид (или бис-акриламид, МБА), последний из которых отвечает за образование поперечных сшивок в геле (рис. 2). Размер пор в геле определяется процентным содержанием мономеров (Т, %) и процентным содержанием сшивающего агента (МБА) от общего количества мономеров (С, %): Т = (акриламид + бис-акриламид), г · 100 %/общий объем, мл; С = акриламид, г · 100 %/(акриламид + бис-акриламид), г.

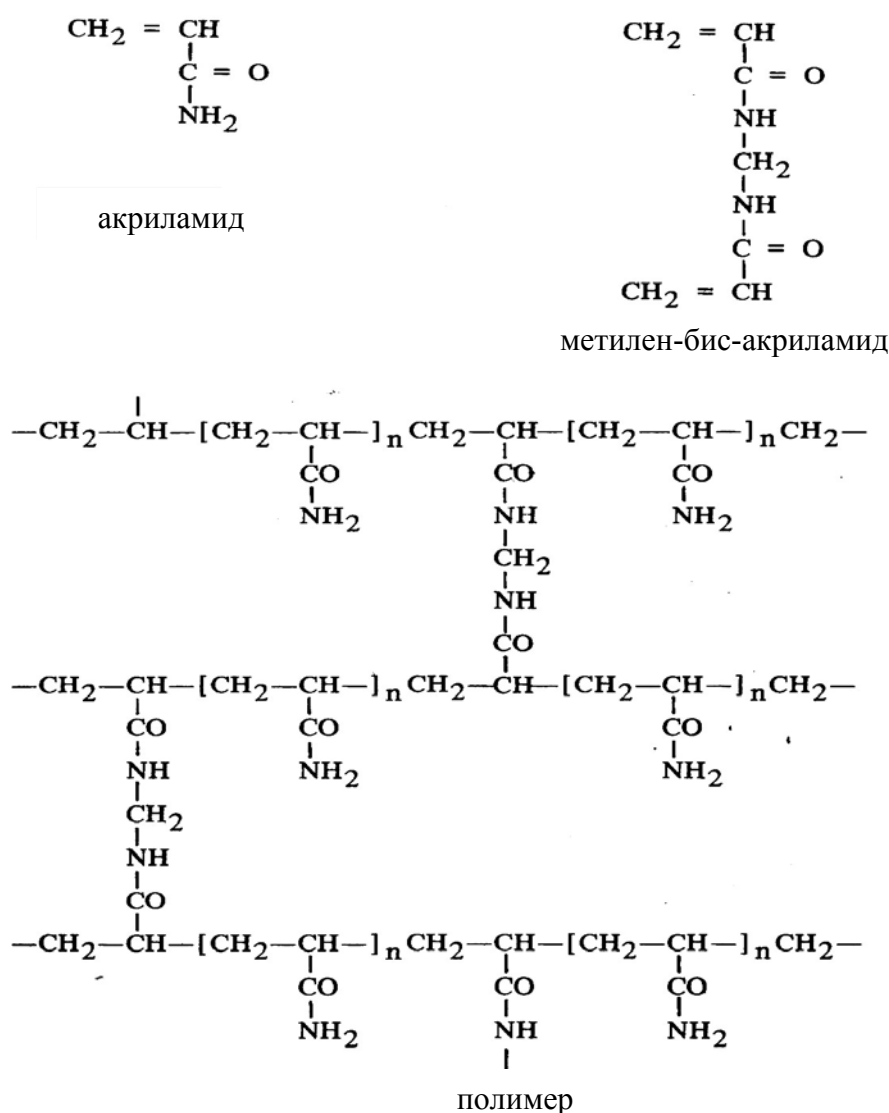


Рис. 2. Структура полиакриламидного геля и его составляющие

Отметим, что соотношение между сшивающим агентом и акриламидом является очень важным показателем, так как оно существенно влияет на свойства геля: чем выше концентрация акриламида, тем ниже должна быть концентрация бис-акриламида, и наоборот. Одновременное увеличение или уменьшение содержания обоих компонентов влечет за собой ухудшение качества геля, приводя в первом случае к образованию гелей с повышенной жесткостью и хрупкостью, а во втором – к его размягчению. В настоящее время принято считать, что для разделения макромолекул белковой природы наиболее подходящим является гель со значением $C = 2,67\%$ и значением $T = 7,5\% - 24\%$ [Остерман, 1981].

В качестве инициатора процесса полимеризации используется персульфат аммония (ПСА) (рис. 3).

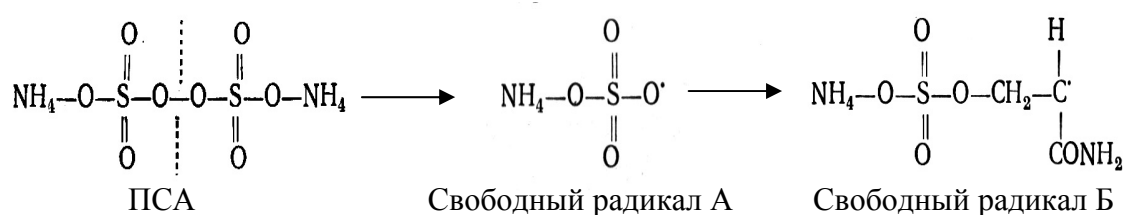
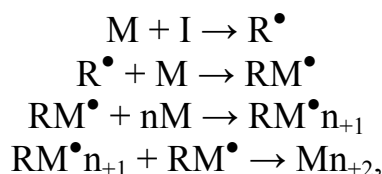


Рис. 3. Схема инициации процесса полимеризации акриламида

Гомолитический разрыв связи между атомами кислорода в молекуле ПСА приводит к образованию двух долго живущих свободных радикалов А с одним неспаренным электроном у атома кислорода. Радикал А взаимодействует с молекулой акриламида по двойной связи, образуя радикал с неспаренным электроном у атома углерода (свободный радикал Б). Вновь образовавшийся радикал, в свою очередь, вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с возникновением нового радикала. Таким образом, персульфат выступает в роли инициатора (I) цепной реакции полимеризации мономера (M) по механизму свободнорадикальной реакции. В нашем случае процесс, происходящий в растворе акриламида в присутствии инициатора, может быть представлен в следующем виде:



где точка над буквой обозначает неспаренный электрон.

В случае акриламида рост цепи полимера идет по механизму «голова – хвост». Поскольку акриламид имеет только одну реакционную группу,

образование поперечных сшивок (кроссшивок) между полимерными цепями не происходит. Это объясняет необходимость в бифункциональном кроссшивающем реагенте – МБА. В присутствии акриламида, бисакриламида и инициатора полимеризации происходит одновременное протекание двух реакций – линейная полимеризация «голова – хвост» и поперечная полимеризация – кросспининг [Остерман, 1981].

Катализатором процесса полимеризации, заметно ускоряющим данный процесс, является тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) – $(\text{CH}_3)_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{CH}_3)_2$. Он эффективен только в своей неионизированной форме, поэтому при полимеризации акриламида в кислой среде содержание ТЕМЕД следует значительно увеличить.

Электрофорез в ступенчатом градиенте концентраций полиакриламидного геля является методом, позволяющий добиваться очень тонкого разделения компонентов. В этом случае растворы геля с постепенно уменьшающимися концентрациями акриламида последовательно наслаивают друг на друга, получая структуру с постепенным изменением размера пор. Электрофорез в градиенте пористости ПААГ, т. е. через изменяющийся вдоль направления миграции белков размер пор, имеет целый ряд существенных преимуществ.

Во-первых, ему присуще самоограничение миграции белков в геле. По мере продвижения в электрическом поле белковые зоны попадают в области все более мелких пор, трение о гель увеличивается, и движение зон замедляется. Если размеры белков достаточно велики, то в какой-то момент миграция их может практически прекратиться. К моменту окончания процесса фракционирования белки разной величины займут свои стационарные положения и окажутся в разных участках градиента пористости.

Во-вторых, при электрофорезе в градиенте пористости ПААГ отпадает необходимость в использовании концентрирующего геля, поскольку первоначальное сужение полос происходит за счет того, что белки в передней части каждой зоны постоянно оказываются в области чуть более мелких пор, чем идущие в задней части этой же зоны. Этот процесс противодействует диффузии белков из зоны.

По существу, картина разделения белковых зон при электрофорезе в градиенте ПААГ зависит только от отношения размеров белков в препарате и характере градиента пористости геля. Выбор электродного буфера и электрического режима электрофореза играет второстепенную роль. Можно использовать буфера со сравнительно малой концентрацией (0,03–0,05 М), достаточной лишь для сохранения знака заряда белка. Это позволяет повысить напряженность поля, что для данного метода нема-

ловажно, так как скорости миграции белков при приближении к конечным положениям существенно уменьшаются.

Электрофорез в градиенте концентрации ПААГ применяется не только для фракционирования белков, РНК и нуклеопротеидных частиц, но также для определения молекулярной массы макромолекул. Данный метод позволяет повысить разрешение картинки разделения белков определенной зоны (по молекулярной массе). Например, электрофорез в гелях с градиентом концентрации ПААГ 12–24 % позволяет качественно разделить фрагменты с М. м. от 10 до 70 кДа. При этом градиентный гель хорош только для разделения белков по размерам. В случае разделения по заряду он может даже ухудшить результат, так как белки с различной величиной заряда, но одинаковых размеров при длительном электрофорезе могут перекрываться на электрофореграммах.

Диапазоном концентраций и формой градиента, а также размерами геля можно варьировать в широких пределах. Это позволяет на практике подобрать соответствующую систему градиентного геля для разделения любой смеси веществ.

Градиентный гель обладает высокой разрешающей способностью, по сравнению с однородным: в первом белки сыворотки крови человека разделяются на 28 фракций, в то время как во второй системе обнаруживается 21 зона. Для повышения качества разделения биомолекул электрофорез в геле с линейным градиентом концентраций АА можно сочетать с каким-либо другим электрофоретическим методом во втором направлении.

В зависимости от способа формирования гели могут представлять собой трубочки или пластины. Первые формируют в трубочках, вторые получают путем полимеризации между двумя плоскими стеклами.

1.5. ОСНОВНЫЕ УСЛОВИЯ УСПЕШНОГО ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА БЕЛКОВ

Как уже отмечалось выше, для получения качественного разделения компонентов при электрофорезе необходимо подобрать оптимальные условия: рН и ионную силу буфера, напряженность электрического поля, концентрацию геля, его длину, количество разделяемой белковой смеси.

Выбор рабочего буфера. Буфер, в котором проводится электрофорез, имеет большое влияние на миграцию белков. Во-первых, рН буфера будет влиять на заряд белка, и, соответственно, на направление и скорость его миграции. Во-вторых, ионная сила буфера влияет на силу тока, возникающую при движении белков – при низкой ионной силе буфера белки будут «переносить» бóльшую силу тока, и, следовательно, будут бы-

стрее двигаться. При высокой ионной силе ток обеспечивается в основном движением ионами буфера, а белки мигрируют медленнее.

Приведем аналогию, демонстрирующую данный эффект. Представим себе банк, где имеются два счета (кассы) – один для вкладов (в случае электрофореза – анод), а другой для снятия денег (катод), при этом деньги – это электроны. Ионы можно представить себе в виде клиентов, которые ждут, чтобы их обслужили в любой из касс, расположенных в разных концах банковского зала. На рис. 4 кружками представлены клиенты, которые ждут обслуживания.

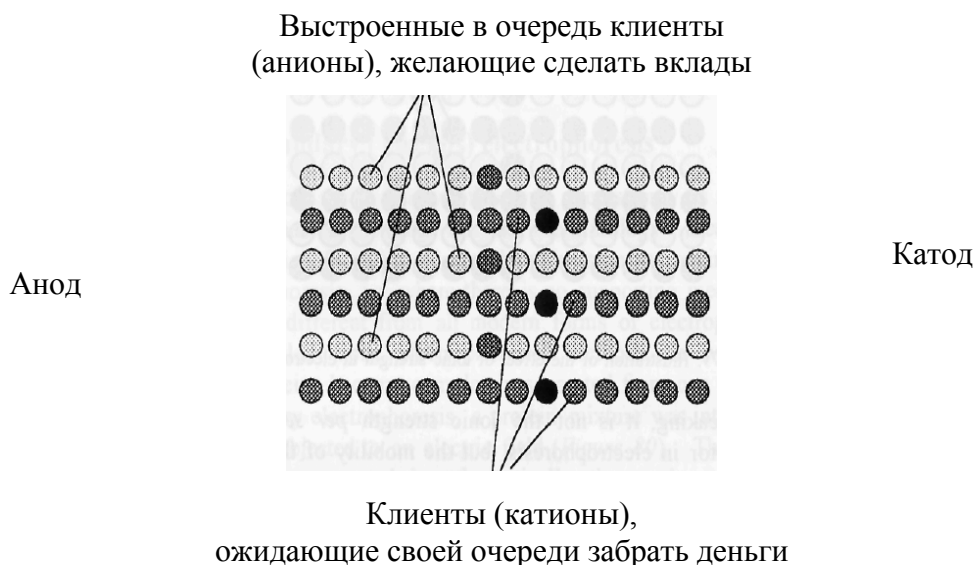


Рис. 4. Схема процесса электрофореза (аналогия с банковским залом)

При электрофорезе эти очереди будут располагаться по направлению линий поля, которые обычно (но не обязательно) являются прямыми линиями. Светлые кружки – «клиенты»-ионы буфера, темные кружки – «клиенты»-белки. После того как клиент был обслужен в кассе, он уходит, оставляя «дырку». Эта «дырка» заполняется другим клиентом и так далее. Таким образом «дырка» движется в обратном направлении по линиям. Не имеет значения, насколько далеко находятся клиенты от кассы, они будут продвигаться к кассе с периодическим возникновением «дырок» в очереди непосредственно перед ними. Если ассистенты в кассах будут работать энергично (продуцировать высокий ток), эти «дырки» будут появляться очень быстро, и клиенты будут продвигаться активно. И наоборот, если ассистенты в кассах будут пассивны (продуцировать низкий ток), «дырки» будут появляться реже, и продвижение клиентов будет медленным. На рис. 4 относительное соотношение ионов белка и ионов буфера таково, что в каждой очереди находится один ион белка.

В случае если ассистенты в кассах будут работать с постоянной скоростью (при постоянной силе тока), но увеличится количество клиентов (увеличится ионная сила), будет иметь место ситуация, представленная на рис. 5.

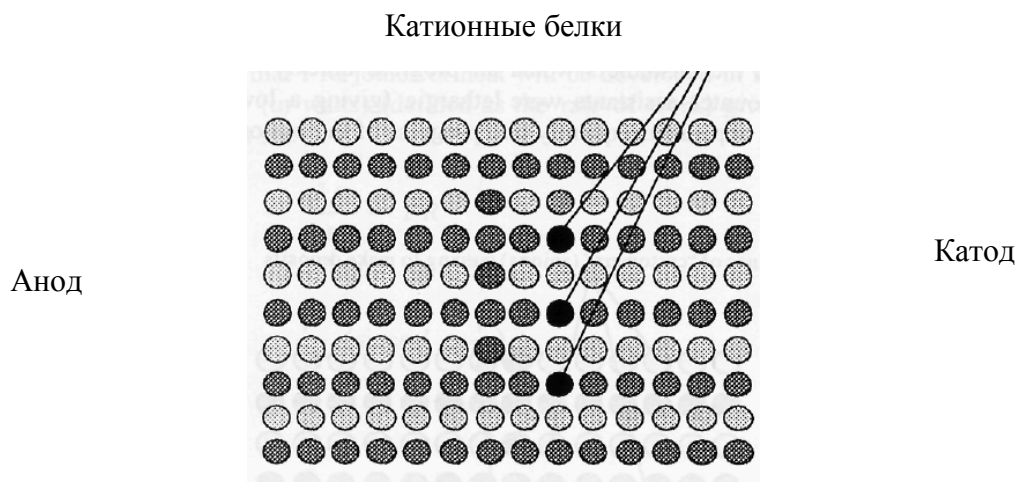


Рис. 5. Схема, демонстрирующая эффект ионной силы в процессе электрофореза

Чем больше буферных ионов, несущих заряд (и, соответственно, ток), тем более медленным будет продвижение всех ионов (в том числе и белковых) в соответствующих очередях. Таким образом, при электрофорезе низкая ионная сила буфера является более предпочтительной, так как при этом увеличивается скорость миграции ионов белка и не происходит сильного нагревания. Использование буфера с высокой ионной силой, напротив, будет приводить к освобождению большого количества тепла.

Эффект ионной силы в действительности является более сложным, чем объяснено в представленной выше схеме. Ионная сила также влияет на двойной электрический слой, который окружает белки в растворе. Ионы в двойном электрическом слое уменьшают заряд на молекулах белка. По мере движения в ходе электрофореза белки захватывают часть двойного электрического слоя. При увеличении ионной силы толщина двойного электрического слоя уменьшается, и эффективно уменьшается заряд движущихся белков. Мобильность белков, таким образом, уменьшается с увеличением ионной силы буферного раствора.

Уже отмечалось, что значения рН-буферных растворов следует выбирать с таким расчетом, чтобы различия в зарядах между компонентами разделяемой смеси были максимальными. Чем больше разница между рН-среды и рI макромолекул, тем быстрее они движутся и тем уже их зоны. Электропроводность рабочего буфера определяется тремя факторами: концентрацией, необходимой для поддержания нужного рН в бел-

ковых зонах, степенью диссоциации буферных веществ при данном рН и характером участвующих в диссоциации ионов.

Поэтому становится очевидным, что буфер не должен содержать посторонних солей даже в малых концентрациях. Избыток соли в препарате приводит к размыванию передней границы и увеличению резкости задней границы полосы препарата сразу после его «вхождения» в гель. При нормальном разделении должна иметь место как раз обратная картина – четкая передняя и более диффузная задняя граница полосы.

Помимо суммарной электропроводности, определенную роль играет электрофоретическая подвижность ионов буфера, мигрирующих в том же направлении, что и разделяемые макромолекулы. Качество получаемых при разделении смеси полос выигрывает, если эти ионы по своей подвижности приближаются к самим макромолекулам. Таковыми являются большие органические ионы: трис⁺ (катион), остатки барбитуровой и какодиловой кислот (анионы) и такие цвиттер-ионы, как глицин и аланин. Следовательно, при прочих равных условиях трис-буфер следует предпочесть при фракционировании кислых белков, а барбитуратный – для слабокислых белков. Напряженность поля следует поддерживать настолько высокой, насколько это возможно по условиям образования и рассеивания тепла. Мощность не должна превышать 10–12 Вт на гель, так как в противном случае разделяющиеся зоны становятся вогнутыми из-за того, что в центре геля они движутся быстрее, чем у его поверхности (так называемый «смайл-эффект»). В начале опыта лучше использовать небольшой ток, чтобы образец плавно сконцентрировался и вошел в гель при минимальном нагреве и конвекции (от 30 до 60 мин).

К изменению высоты геля надо подходить очень осторожно, так как простое увеличение размеров геля приводит к избыточному образованию тепла и потере отдельных белков, а порой и к менее эффективному разделению. При использовании гелей длиной 5–10 см обычно получается вполне удовлетворительное разделение. Чтобы разделить два компонента, мигрирующих близко друг к другу, рекомендуется подобрать соответствующие условия, варьируя рН, напряженностью поля, концентрацией ПААГ, но не размерами геля, особенно если его длина уже достигает 10 см.

Количество материала, фракционируемого в одном опыте, зависит от площади поперечного сечения геля, температуры во время электрофореза и состава разделяемой смеси. Обычно целесообразно наносить до 10 мг белка на 1 см² поверхности геля, но если белки движутся слишком близко друг к другу, это количество необходимо снизить примерно до 2 мг/см².

Наряду с вышеупомянутыми факторами для получения наилучших результатов при проведении электрофореза исследуемых образцов необходимо учитывать следующее. Температурный режим электрофореза оказывает существенное влияние на подвижность белков вследствие того, что при понижении температуры вязкость воды повышается, при пониженных температурах ДСН, входящий в состав рабочего буфера, может выпадать в осадок. В то же время повышение температуры только на 1 °С (с 17 до 18 °С) приводит к тому, что скорость перемещения белков увеличивается примерно на 20 %. Если не обеспечен необходимый отвод тепла, то образуются искривленные полосы. Для устранения этого эффекта нужно использовать гель с меньшей концентрацией акриламида или буферный раствор меньшей ионной силы, а сам электрофорез проводить при пониженных температурах.

Причиной искривления полос может стать слишком быстрая полимеризация геля, приводящая к неправильному формированию пор. В этом случае целесообразно снизить концентрацию инициаторов полимеризации и/или катализатора (ТЕМЕД, ПСА).

Использование не свежеприготовленного геля, недостаточно чистых реактивов для приготовления растворов, образование пузырьков воздуха при заливке геля, неравномерная заливка градиентного геля или неаккуратное насаивание воды далеко не весь перечень причин, приводящих к более или менее серьезным искажениям результатов. Выпадение в осадок белков при разделении, особенно на границе концентрирующего и разделяющего гелей, приводит к образованию «хвостов». Плохое разделение (расхождение) компонентов исследуемой смеси может быть также результатом низкого качества разделяемого препарата (загрязненностью интерферирующими агентами, агрегированием белков и т. п.), недостаточного времени электрофореза, неподходящей концентрации геля, ионной силы и рН буфера, ионной силы раствора, содержащего пробу, избыточного выделения тепла или просачивания буфера между стеклянными пластинками и гелем.

1.6. ТЕХНИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Существует несколько вариантов проведения аналитического электрофореза в вертикальных и горизонтальных пластинах.

Для электрофореза белков обычно используют вертикальные пластины шириной 8–14 см и длиной 8–28 см (приложения 1 (Б); 2 (А) и 3 (Б)). Полимеризацию акриламида, а затем и сам электрофорез ведут в кассете между двумя стеклянными пластинами толщиной 5–6 мм.

Расстояние между пластинами задается толщиной прокладок (спейсеров) из тефлона или плексигласа, которое и определяет толщину геля. Спейсеры шириной 10–15 мм и толщиной 0,4–2 мм смазывают силиконовой смазкой (если этого требует конструкция используемого прибора) и устанавливают вдоль боковых краев стекол. В качестве нижней прокладки может быть использована резинка, набухающая в вазелиновом или силиконовом масле (приложение 3 (В)). Собранную кассету устанавливают строго вертикально и заливают в нее раствор мономеров ПААГ.

В аналитических опытах на одной пластинке обычно ведут электрофорез нескольких образцов (контрольных и опытных образцов), компонентный состав которых необходимо сопоставить при идентичных условиях разделения. Иными словами, несколько препаратов подвергают фракционированию в параллельных треках. В ходе полимеризации на верхнем крае геля формируют ряд одинаковых углублений прямоугольной формы – «карманов», в которые затем вносят исследуемые образцы. Для этого в незаполимеризовавшийся гель вставляют «гребенку» из тефлона или плексигласа такой же или чуть меньшей толщины, чем прокладки между стеклами (спейсеры). Прямоугольные зубцы гребенки формируют карманы для последующего нанесения препарата (приложение 3 (В)). Необходимо, чтобы гребенка была установлена ровно для формирования одинаковых карманов. Гель заливают между пластинами так, чтобы он заполнил все промежутки между зубцами гребенки, т. е. без формирования пузырей воздуха. После полимеризации геля гребенку аккуратно достают и промывают карманы водой или электродным буфером. Удаляют нижнюю резиновую прокладку.

Для получения пластин с градиентом пористости геля по высоте используют в основном те же приемы, что описаны выше. Для заливки этого геля используют градиентный смеситель (приложение 1 (А)) и перистальтический насос. Путем смешивания растворов геля двух различных концентраций в смесителе получают градиент концентрации АА.

После приготовления гелей собирают прибор для электрофореза (приложения 1 (Б); 2 (А); 3 (Б); 4 (Б)) заливают «верхний» (1/2 его часть) и «нижний» электродный буфер (см. гл. 3). Затем вносят в кармашки геля исследуемые образцы, и доливают верхний электродный буфер (таким образом, чтобы он покрыл сверху кармашки геля). Прибор подключают к источнику тока и подают ток 15–20 мА на 1 пластину до того момента, когда образцы достигнут границы с разделяющим гелем (30–60 мин). Далее силу тока увеличивают до 30–40 мА на 1 пластину. При таких условиях электрофорез в однородном геле проходит за 1,5–2 часа, а в градиентном геле – за 3,5–4 часа.

Лидирующие красители. Для наблюдения за ходом электрофореза в исходный препарат вносят краситель, мигрирующий в том же направлении, что и фракционируемые белки. Он не должен связываться с белками, а скорость его продвижения по гелю должна быть заведомо больше, чем у наиболее быстро мигрирующего белка. В щелочных и нейтральных буферах, когда белки заряжены отрицательно и мигрируют к аноду, а также в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия (ДСН), используют отрицательно заряженные красители. Наиболее распространен для этих целей бромфеноловый синий (БФС). Иногда используют краситель ксиленцианол, электрофоретическая подвижность которого примерно вдвое ниже, чем БФС, поэтому его используют при фракционировании крупных белков и нуклеиновых кислот.

В качестве положительно заряженного красителя для электрофореза в кислой среде, когда белки мигрируют в направлении катода, используют метиловый зеленый или пиронин.

По окончании электрофореза пластины осторожно отделяют друг от друга, отслаивая от одной из них гель при помощи шпателя. Его вставляют между пластинами и слегка поворачивают. С пластины гель снимают руками (в резиновых перчатках!) и переносят в ванночку для фиксации или окраски.

1.7. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ПОЛИАКРИЛАМИДОМ

Работая с полиакриламидными гелями необходимо знать о токсичности препаратов, формирующих ПААГ и соблюдать определенные меры предосторожности при работе с ними.

Так, акриламид токсичен даже в разбавленных растворах (около 1 %), поэтому следует остерегаться попадания его на кожу и вдыхания распыленных частиц. Акриламид канцерогенен и может вызывать наследственные генетические заболевания. Подобным действием обладает и МБА.

(!) При работе с данными веществами важно соблюдать следующие меры безопасности:

- в случае попадания в глаза – промыть большим количеством воды и обратиться к врачу;
- работать в защитной одежде;
- работать в защитных перчатках;
- не вдыхать вещества в кристаллическом виде.

Глава 2

ВИДЫ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Существуют различные методы аналитического и препаративного разделения макромолекул в электрическом поле в зависимости от целей и задач исследования, поддерживающей среды, полимера, и т. п. К ним относятся:

Электрофорез с подвижной границей проводится в *U*-образной кювете с прямоугольным поперечным сечением. Метод разработан для разделения белков в буфере. Основной недостаток метода – наличие конвекционных потоков жидкости во время проведения электрофореза.

Зональный электрофорез (в свободной среде, в градиенте плотности, в поддерживающей среде с капиллярной структурой).

Электрофорез на фильтровальной бумаге проводится в поддерживающей среде, в качестве которой служат полоски фильтровальной бумаги. Бумажный электрофорез проводится для разделения аминокислот и пептидов, мононуклеотидов.

Электрофорез на нитроцеллюлозе, на ацетате целлюлозы использует в качестве поддерживающей среды полоски нитроцеллюлозы, ацетата целлюлозы.

Электрофорез в колонках и блоках гранулированной поддерживающей среды применяется для препаративного разделения белковых смесей. В качестве поддерживающей среды используются порошки из стекла или пластмассы (поливинилхлорида), гранулированный крахмал, целлюлозный порошок, а также сефадекс или агароза, приготовленные в виде колонок или блоков.

Электрофорез в агаровом, агарозном, крахмальном гелях использует в качестве поддерживающей среды пористые гели, картофельный и рисовый крахмал.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) – наиболее используемый в настоящее время вид аналитического и препаративного электрофореза. Этот метод использует в качестве поддерживающей среды сополимер акриламида и бисакриламида.

Изоэлектрическое фокусирование – как один из методов вытеснительного электрофореза.

Изотахорофрез – тип электрофореза, при котором все заряженные макромолекулы движутся в электрическом поле с одинаковыми (изо) скоростями (тахо). Одно- и двухмерное электрофоретическое разделение белков для решения современных задач протеомики.

Ниже мы остановимся на электрофорезе в ПААГ и его модификациях и сочетаниях с другими методами.

2.1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В НАТИВНЫХ УСЛОВИЯХ

Данная разновидность электрофореза разработана для разделения белков, находящихся в нативной неденатурированной форме, и разделение белков происходит в соответствии с их зарядом и размером. Условия разделения, включая рН буфера, подбираются в соответствии со свойствами белков, но в большинстве случаев используется рН в диапазоне 8,0–9,0, когда большинство белков имеют суммарный отрицательный заряд и движутся в электрическом поле по направлению к аноду. Гели могут быть крахмальными, агарозными или полиакриламидными. В случае использования ПААГ концентрация его мономеров чаще не превышает 7–10 %. Однако в зависимости от задачи эксперимента и предполагаемой молекулярной массы исследуемых белков концентрацией акриламида можно варьировать в широком диапазоне – от 5 до 24 %. Преимуществом этого метода является то, что разделяемые белки находятся в нативной форме, и многие ферменты сохраняют свою функциональную активность. К недостаткам следует отнести сложность анализа результатов разделения. Так как фракционирование белков происходит в соответствии с их размером и зарядом, белки с различными молекулярными массами могут иметь одинаковую подвижность и занимать на геле соответственно одно и то же положение, т. е. перекрываться.

2.2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В КИСЛОЙ СИСТЕМЕ

Электрофоретическое разделение в кислой системе проводится с целью изучения компонентного состава щелочных белков. Разделение белков, как и при нативном электрофорезе, происходит в соответствии с их зарядом и размером. Но в отличие от нативного электрофореза, во-первых, используется кислый буфер (ацетатный, калий-ацетатный или трис-ацетатный) с рН 3,0–4,5; во-вторых, белки в зависимости от цели исследования предварительно подвергаются частичной или полной денатурации с помощью определенных реагентов (этанол, хлорэтанол, мочевины, кислоты и др.). В такой системе разделения белки приобретают

суммарный положительный заряд и движутся в электрическом поле по направлению к катоду. В результате проведения кислого электрофореза исследуемых образцов получают электрофореграммы белковых компонентов, характеризующихся совокупностью определенного заряда и массы и являющихся в одних случаях маркерами экспрессии генома (например, запасные белки злаковых культур), в других случаях – специфическими группами белков (например, ферменты или гистоновые белки нуклеоидов растительных и животных тканей).

2.3. ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Диск-электрофорез (от англ. «discontinuous» – прерывистый) представляет собой метод разделения, в котором используется неоднородная (прерывистая) разделяющая система с полиакриламидным гелем в качестве носителя. При диск-электрофорезе используют пары буферов разного состава и с разными значениями pH, а носитель состоит из отдельных слоев геля, отличающихся друг от друга по размерам пор. Благодаря этому разделяемые вещества концентрируются сначала в очень узкой стартовой зоне, что имеет решающее значение для четкого разделения смеси (рис. 6). Высокая разрешающая способность диск-электрофореза позволяет не только разделять смеси, содержащие большое число разных видов макромолекул, но и характеризовать их по заряду, молекулярной массе и конформации. Разрешающая способность этого метода базируется на двух физических явлениях:

1. *Эффект концентрирования*, состоящий в том, что смеси перед их разделением на компоненты концентрируются в четко ограниченной зоне.

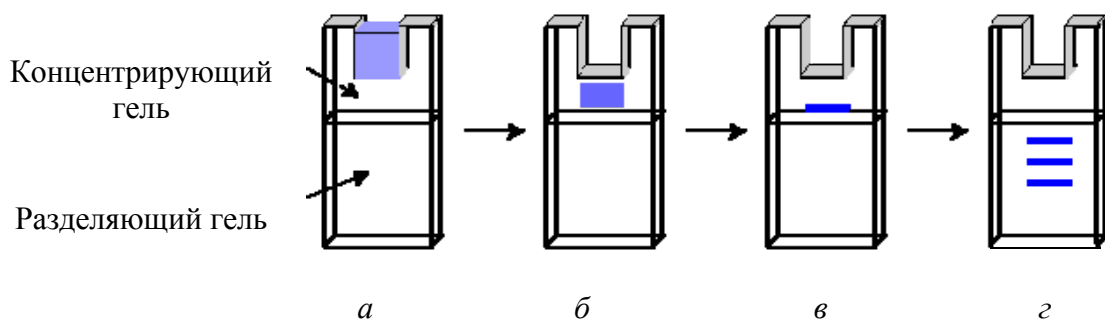


Рис. 6. Схема проведения ступенчатого (диск-) электрофореза: а) нанесение образца, начало электрофореза; б) вхождение смеси белков (образца) в концентрирующий гель; в) концентрация белковой смеси на границе двух гелей разной пористости; г) разделение компонентов образца по молекулярной массе

2. *Эффект концентрирования*, состоящий в том, что смеси перед их разделением на компоненты концентрируются в четко ограниченной зоне.

3. *Эффект молекулярного сита*, состоящий в том, что отдельные молекулы разделяются при электрофорезе не только по их общему электрическому заряду, но также и по величине (молекулярный вес), и по форме (третичная структура).

При разделении в такой системе компонентов исследуемых образцов сначала отмечается их концентрирование в узкой полосе крупнопористого полиакриламидного геля, а затем в мелкопористом геле ее компоненты распределяются по величине, по форме и заряду молекул.

2.4. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ЩЕЛОЧНОЙ СИСТЕМЕ, или ДСН-ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе бывает целесообразно распрямить полипептидную цепочку белка и придать ей жесткость. Именно такой прием используется при электрофорезе белков, обработанных ДСН. Анионный детергент ДСН прочно связывается с большинством белков в соотношении 1,4 мг ДСН /мг белка, при этом суммарный комплекс белок-(ДСН) n приобретает отрицательный заряд.

Предположительно этот комплекс образуется благодаря взаимодействиям между алкильными (гидрофобными) группами детергента и гидрофобными участками белковой поверхности, при этом отрицательно заряженная часть ДСН обращена наружу. Кроме того, ДСН приводит к разрушению нековалентных связей, приводя к денатурации белков. При обработке ДСН белки с четвертичной структурой диссоциируют на отдельные субъединицы, если последние не связаны между собой дисульфидными «мостиками». Для разрыва S-S-связей одновременно с ДСН добавляют β -меркаптоэтанол или дитиотрейтол (ДТТ), которые восстанавливают их до сульфгидрильных групп, что приводит к дальнейшей денатурации белков и разрушению белок-белковых комплексов. В этом случае единственным фактором, который влияет на подвижность белков в полиакриламидном геле, является размер белка, а точнее его молекулярная масса. Подвижность белок-(ДСН) n обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы: низкомолекулярные комплексы движутся быстрее, чем высокомолекулярные. Это означает, что молекулярная масса белков может быть определена по относительной подвижности белка в геле, а наличие одной полосы в такой геле является критерием чистоты препарата. Детальные исследования Weber и Osborn показали, что под-

вижность белков в большинстве случаев находится в четкой зависимости от их молекулярной массы. Это позволило применить метод электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН (в английском варианте – sodium dodecyl sulfate, или SDS) для достаточно точного определения молекулярной массы белков и пептидов [Weber, Osborn, 1969]. В зарубежной литературе этот метод был назван SDS-poliacrylamide gel electrophoresis или SDS-PAGE.

Расчет молекулярного веса исследуемых образцов

Для определения молекулярного веса, или молекулярной массы (М. м.), пептида или белка применяют специальные наборы белками-маркерами с известным молекулярным весом.

Сначала нужно построить стандартную кривую. Для этого необходимо рассчитать значения двух величин: 1) $Lg M. м.$ каждого белка-маркера; 2) отношение расстояния, пройденного маркером вдоль геля, к расстоянию, пройденному лидирующим красителем (R_f). После построения графика зависимости между этими величинами можно путем интерполяции рассчитать молекулярные веса неизвестных пептидов или белков (рис. 7). Это быстрый и экономичный метод, для которого нужны лишь микрограммовые количества образцов. Молекулярно-весовые маркеры для электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле представляют собой тщательно составленные смеси пептидов, нативных белков или серию олигомеров с поперечными сшивками. Они имеют определенные молекулярные веса и концентрации.

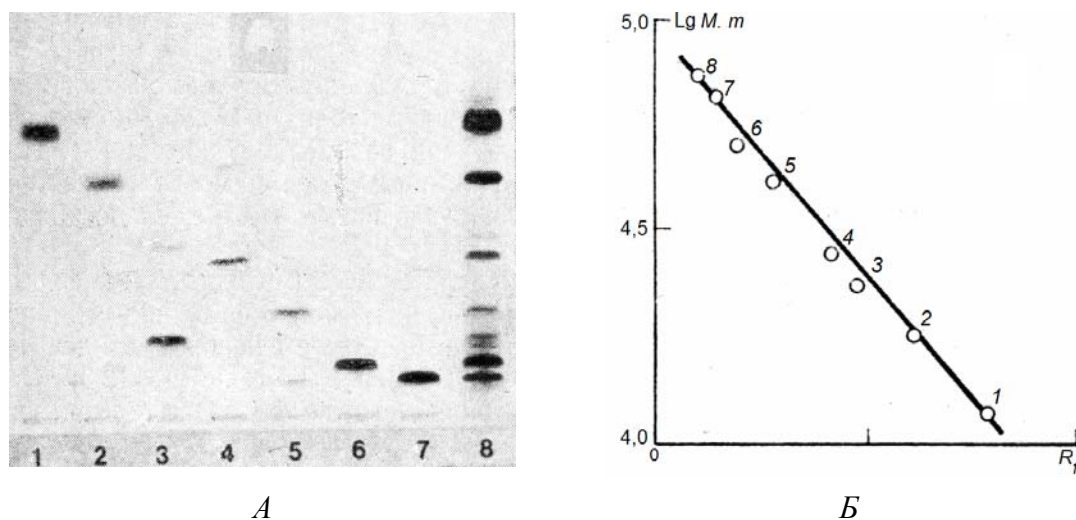


Рис. 7. Электрофореграмма (А) и график зависимости (Б) $lg M. м.$ от R_f белков-маркеров: 1 – цитохром с; 2 – миоглобин; 3 – γ -глобулин; 4 – карбоангидраза; 5 – овалбумин; 6 – человеческий альбумин; 7 – трансферрин; 8 – смесь всех маркеров

Существует несколько видов наборов маркеров. Один из них содержит семь различных белков, каждый из которых дает одиночную полосу. Набор охватывает диапазон молекулярных весов от 11 700 до 77 000 Da (табл. 3). В наборе маркерные компоненты присутствуют в равных по весу количествах, чтобы в результате электрофоретического разделения получались полосы с приблизительно одинаковой интенсивностью окраски.

Таблица 3

Набор белков-маркеров фирмы «Amersham Pharmacia Biotech»

Название	М. м., Da	Lg М. м.
Цитохром с	11 700	4,068
Миоглобин (лошадиный)	17 200	4,236
γ-Глобулин (L-цепь)	23 500	4,371
Карбоангидраза	29 000	4,462
Овальбумин (из куриных яиц)	43 000	4,634
γ-Глобулин (H-цепь)	50 000	4,699
Человеческий альбумин	68 000	4,832
Трансферрин	77 000	4,886

2.5. ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЕ

Электрофорез – один из наиболее распространенных методов в химии и биохимии полимеров, особенно белков и нуклеиновых кислот. Как было сказано выше, явление электрофореза было открыто русским ученым Ф. Ф. Рейсом в 1807 г. Работы Тизелиуса (30-е гг. XX в.) сделали электрофорез одним из основных методов белковой химии. Однако некоторые типы электрофореза принципиально отличаются от классических методов Рейса-Тизелиуса. Одна из таких разновидностей электрофореза – *изоэлектрофокусирование* (ИЭФ), впервые описанная японскими авторами в 1922 г.

Электрофорез в чистой форме осуществляется в гомогенной среде, которая играет пассивную роль. Белки разделяются вследствие различия скоростей миграции в электрическом поле, которые обусловлены суммарным зарядом белковой молекулы и их размерами. При ИЭФ основной параметр фракционирования – значение изоэлектрической точки (ИЭТ), pI. Среда – активный фактор фракционирования, что значительно увеличивает разрешающие возможности метода и повышает его специфичность. Это связано с влиянием среды внутри белковой молекулы на константу диссоциации (pK) составляющих ее аминокислотных остатков [Остерман, 1983; Isoelectric focusing: principles and methods, 1991].

Белковая молекула в процессе жизнедеятельности подвергается постоянному воздействию метаболитов. Вследствие этого различные функциональные группы белков часто модифицируются, при этом изменяется конформация белка, что приводит к изменению рК, а как следствие, изменяется ИЭТ белка. Высокая разрешающая сила и чувствительность ИЭФ позволяют отделять модифицированные формы белков и детально их изучать.

Изоэлектрическая точка – состояние белка, которое соответствует нулевому значению величины его заряда. Изоэлектрическое состояние определяется всеми видами зарядов: 1) составом боковых радикалов, т. е. наличием групп COO^- ; NH_3^+ ; тиразин- O^- ; имид- N^+ ; 2) конформацией белковой молекулы, т. е. количеством групп, находящихся на поверхности молекулы; 3) наличием ионогенных лигандов, которые прочно связываются с белковой молекулой.

ИЭТ белка соответствует значению рН его растворов, которое при дальнейшем увеличении концентрации белка не изменяется. На величину ИЭТ оказывают влияние и конформационные изменения белковой молекулы, например, изменение типа свертывания полипептидной цепи с сопутствующим укрытием или открытием ионогенных групп.

Для ИЭФ нужна система с естественным градиентом рН, который возникает в определенных смесях амфолитов при подаче напряжения. Такие градиенты называют самоорганизующимися. Основным условием для получения естественного градиента рН является применение амфолитов, свойства которых обеспечивают электропроводность в ИЭТ и одновременно неподвижность в электрическом поле. Они несимметричны, например, имеют две кислотные группы и одну основную. Хорошими амфолитами-носителями является смесь амфотерных молекул. Как правило, это искусственно синтезированные наборы цвиттер-ионов, представляющие собой полиамино–поликарбоксовые кислоты алифатического ряда разнообразного строения. Полученная смесь носит фирменное название «амфолины», «фармолиты», «биолиты», «сервалиты» в зависимости от фирмы производителя. Состав ее не всегда известен, она содержит вещества с разнообразными рК и высокорастворима в воде. Молекулярная масса амфолинов – 300–1000 Da, величины изоточек (рI) находятся в интервале от 2 до 11 рН. Разрешающая возможность ИЭФ зависит от наличия двух близко расположенных амфолитов, ограничивающих изоэлектрическую зону, необходимую для прекращения движения изоэлектрической формы белка.

Наилучшие результаты таких исследований получаются при работе с готовыми пластинами или в сверхтонких слоях полиакриламидных гелей

в горизонтальной системе. Преимущества использования для ИЭФ тонких горизонтальных пластин:

- препарат можно вносить в любое место открытой поверхности геля;
- можно одновременно вести ИЭФ многих препаратов в идентичных условиях;
- лабильные белки можно вносить в любой участок градиента рН уже после его формирования;
- обеспечивается интенсивный и равномерный теплоотвод;
- удобство фиксации, окраски, фотографирования материала в геле;
- объемы электродных буферов сведены до минимума.

На рис. 8 представлена схема электрокинетических процессов, протекающих в ходе изоэлектрофокусирования. Сначала образцы белков помещают на гель, содержащий амфолиты-носители (рис. 8, А). При подаче напряжения амфолиты-носители быстро мигрируют к своим изоэлектрическим точкам, более крупные белковые молекулы образца медленно мигрируют в соответствии с рН среды, в которой находятся (рис. 8, Б). После того, как градиент рН установился, каждая молекула белка продолжает передвигаться к той точке, где ее суммарный заряд будет равен нулю, т. е. к своей изоэлектрической точке (рис. 8, С).

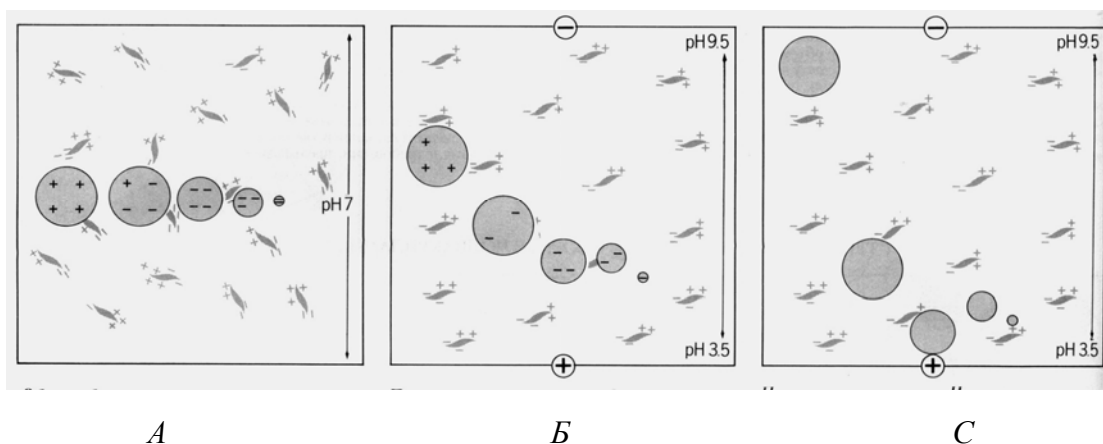


Рис. 8. Схема электрокинетических процессов при изоэлектрофокусировании

Существуют и другие варианты изоэлектрофокусирования: ИЭФ в трубочках ПААГ (рис. 9), ИЭФ в горизонтальных пластинах агарозы и т. д. Сфера применения методов ИЭФ широка: это анализ, выделение и очистка белков, определение их изоэлектрических точек, получение кривых кислотно-щелочного титрования, последующий расчет рК различных ионогенных групп.

Особый интерес представляет использование этого метода в биотехнологии для промышленного получения и очистки белков, а также для

изучения микрогетерогенности биополимеров и белков при патологии. ИЭФ открывает большие возможности для разделения белков, близких по физико-химическим свойствам. Высокая разрешающая возможность и чувствительность ИЭФ позволяют отделять модифицированные формы белков и детально их изучать.

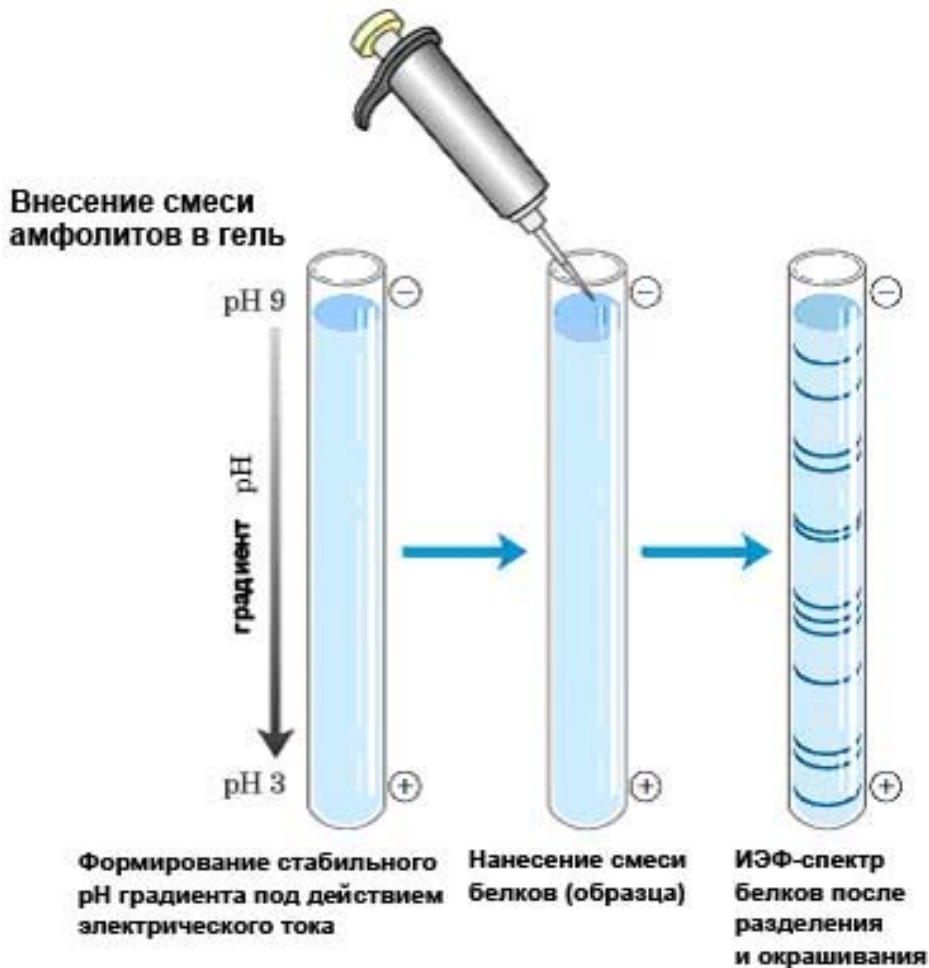


Рис. 9. Схема проведения изоэлектрофокусирования белков в пробирках

2.5.1. Технические приемы проведения ИЭФ

Большинство методов электрофокусирования предусматривает применение плоских горизонтальных систем, которые имеют ряд преимуществ, а именно: наличие подложки, что упрощает фиксирование гелей и обеспечивает надежную основу для гелей низкой концентрации и сверхтонких гелей; возможность выбора геля произвольного размера; эффективное охлаждение.

Для проведения электрофокусировочного исследования молекул возможно использование готовых пластин или стрипов полиакриламидных

гелей, производимых различными фирмами, а также приборы для изоэлектрофокусирования в трубочках, которые заливают непосредственно перед проведением анализа (рис. 9, приложение 4 (Б)).

Однако если гели приходится готовить самим, то все операции – подготовка, сборка формы для пластины с гелем, деаэрация смеси мономеров акриламида, амфолитов и других добавок, добавление персульфата аммония, заливка в форму, полимеризация и извлечение геля – производятся аналогично подготовке гелей при электрофорезе в пластинах или трубочках ПААГ. Для большинства смесей рекомендуется 2 %-ная конечная концентрация амфолитов в растворе. Следует избегать внесения избытка персульфата аммония, так как он может окислять амфолиты. Из-за снижения растворимости белков вблизи изоэлектрической точки и опасности их осаждения иногда в состав геля вводят мочевины. Для слаборастворимых и склонных к агрегации белков это необходимо с самого начала на стадии приготовления препарата. Многие гидрофобные белки для своего растворения нуждаются в добавлении неионных детергентов типа тритон X-100 или nonidet P-40. Иногда надежное растворение белков удается обеспечить только совместным воздействием мочевины и детергентов.

С процессом фракционирования молекул в геле под действием электрического поля связано физическое явление, которое может играть отрицательную роль – эндоосмос. Суть его заключается в том, что с неподвижной матрицей геля всегда связано некоторое количество заряженных ионогенных групп. Соответствующие им противоионы находятся в растворе. Под действием электрического поля они мигрируют к катоду, увлекая за собой жидкость, находящуюся внутри геля. На смену им приходят катионы из анодного электролита. Вместе с жидкостью в направлении катода «дрейфует» весь градиент рН, в результате чего картина распределения белков может быть существенно смещена, а ближайшие к катоду полосы утрачены. Для подавления остаточных явлений эндоосмоса следует увеличить вязкость жидкой среды в геле путем введения в нее до 10 % глицерина. Увеличение вязкости не сильно замедляет электрофоретическую миграцию белков, но очень существенно уменьшает степень катодного дрейфа градиента рН.

Для проведения ИЭФ используют прибор «Мультифор II» или другие приборы аналогичной конструкции (приложение 3(А)). Разделение ведут на охлажденном до +4 °С столике. Надежный контакт между пластиной-подложкой, на которой находится гель (стрип), и охлажденным столиком обеспечивается с помощью керосина. Поверхность подложки, как бы на-

катывая, начинают накладывать с одного конца так, чтобы керосин между поверхностями ложился сплошным слоем без воздушных пузырей.

Отсутствие пузырей должно быть и между электродными полосками фильтровальной бумаги и поверхностью геля (стрипа). Полоски фильтровальной бумаги шириной 1 см накладываются прямо на гель, по краям его, параллельно друг другу. Пропитывающая их жидкость служит электродным электролитом. Платиновые электроды прижимают к полоскам влажной бумаги по всей длине, обеспечивая равномерный контакт.

Препарат в небольшом объеме жидкости (10–20 мкл) можно наносить в виде капли или на квадратике фильтровальной бумаги непосредственно на поверхность геля. Белки будут постепенно диффундировать с поверхности геля в глубину. Через час после начала ИЭФ полоски снимают. Желательно, чтобы белковый препарат не содержал нерастворенных частиц, которые обуславливают появление характерных «хвостов» у полос белка при фокусировании.

После проведения ИЭФ белки фиксируют осаждением в растворе 10,5 % ТХУ и 3,5 % сульфосалициловой кислоты. Кроме фиксации, данный раствор способствует удалению из геля амфолитов, которые могут образовывать с красителем нерастворимые комплексы. Окрашивают гели теми же красителями и способами, что и при электрофорезе. Для хранения окрашенного геля его высушивают.

Весьма полезным для повышения разрешения картины изофокусирования и дальнейшего двумерного разделения является проведение предфокусировки образца, т. е. предварительное более тонкое разделение компонентов белковой смеси по их изоэлектрическим точкам. Существует возможность проводить предфокусировку образца непосредственно в жидкой фазе. В результате можно получить до 20 фракций белков, разделенных по pI , которые далее можно использовать для 2-D-электрофореза (приложение 4(A)).

2.5.2. Расчет изоэлектрических точек исследуемых образцов

Определение ИЭТ исследуемых образцов можно выполнять с помощью белков-маркеров. Так как изоэлектрические точки каждого маркера известны заранее, то pI исследуемого белка можно определить путем линейной интерполяции.

Маркеры pI представляют собой ряд стабильных высокоочищенных лиофилизированных белков. Точные величины pI маркеров измерены при +4 °С и позволяют проводить регулируемую и точную калибровку компонентов образца при этой же температуре.

2.6. ДВУХМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Полное разделение сложной смеси белков далеко не всегда удается осуществить в ходе одного опыта. Всегда достаточно высока вероятность того, что в данной системе электрофореза различные белки мигрируют в одной зоне либо в силу близости их размеров, либо ввиду совпадения значений их электрофоретических подвижностей при выбранном значении pH, либо в результате неблагоприятной для разделения комбинации этих параметров. Классический метод двухмерного электрофореза по О'Фарреллу [O'Farrell, 1975] применяется для разделения сложных смесей белков по двум независимым параметрам. Обычно сначала проводят электрофокусирование исследуемых образцов в одном направлении, а затем электрофорез в ДСН-геле в другом направлении (приложение 3 (Г)). В процессе электрофокусирования белки разделяются в зависимости от величины pI, в ходе ДСН-электрофореза разделение субъединиц происходит по молекулярным массам. В результате получают белковую карту, имеющую более высокое разрешение, чем любой из этих методов в отдельности. Схема проведения двухмерного разделения белков представлена на рис. 10. Двухмерное разделение в горизонтальной системе имеет два определенных преимущества: удобство использования образцов после разделения в первом направлении и возможность сведения к минимуму термического градиента в геле.

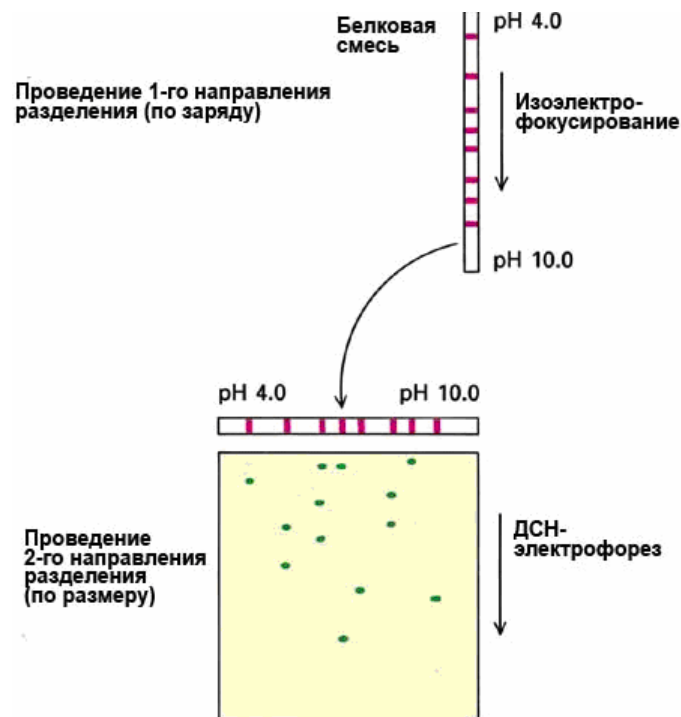


Рис. 10. Схема проведения двухмерного электрофореза

Для получения максимально возможного разрешения применяют окрашивание серебром, что обеспечивает гораздо более высокую чувствительность, чем красителем Кумасси голубой R-250, и позволяет работать с образцами меньшей концентрации.

После двухмерного разделения белков можно проводить исследования различных модификаций белков, в том числе посттрансляционных изменений.

К посттрансляционным модификациям белков относят процессы их фосфорилирования и гликозилирования. Такие протеомные анализы проводят с использованием специфических красителей или флуоресцентных зондов. Анализ полученных данных проводят с использованием специализированного оборудования. Обсчет полученных в результате проведения двухмерного электрофореза белков данных – довольно сложный процесс, требующий навыков и аккуратности.

2.7. ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

В настоящее время иммунохимические методы заняли прочное положение в научных исследованиях при изучении биополимеров и клеток, а также в клинической биохимии, диагностике различных заболеваний и биотехнологии. Все иммунохимические методы основаны на взаимодействии антигенов с антителами, что позволяет выявлять и количественно оценивать содержание антигенов в сложных биологических смесях и в клетках. Кроме этого, иммунохимические методы позволяют изучать структуру и функции белков, взаимодействие лигандов с рецепторами, роль отдельных эпитопов в функционировании белков и ферментов и т. д. В последнее время наблюдается бурное развитие иммунохимических методов и расширение сферы их применения. Это связано с тем, что эти методы вбирают в себя последние достижения клеточной биологии (гибридная технология получения моноклональных антител), молекулярной биологии (синтез белков методами рекомбинантных ДНК для использования в качестве антигенов), биоорганической химии (синтез пептидов, соответствующих последовательностям различных доменов белков), химии (синтез новых флуоресцентных зондов и субстратов ферментов и т. д. Помимо этого, наблюдается выраженная тенденция комбинации иммунохимических методов с другими методами биохимии, молекулярной биологии, биофизики и клеточной биологии, что привело к разработке, например, методов иммуноблоттинга, проточной иммуноцитофлуориметрии и т. д. Усложнение иммунохимических методов, разработка новых вариантов, расширение их возможностей предъявляет высокие требования к исследователям, использующим эти методы.

Иммуноблоттинг (или Western-блоттинг) дает возможность идентифицировать определенные белки, предварительно разделенные методом электрофореза в ПААГ-ДСН, и перенесенные на нитроцеллюлозную мембрану (блоттированные). Высокую точность метода определяет высокоспецифичное связывание искомого белка со специфическими антителами. Визуализация специфичности связывания может происходить различными способами, в зависимости от того, какой фермент «пришит» ко II антителу (пероксидаза хрена, фосфатаза, флуоресцентная метка и др.). Также различают несколько типов блоттинга от последовательности «посадки» антител на носитель. Наиболее распространенным является «сэндвич»-вариант Western-блоттинга, когда перенесенные белки (антигены) специфически связываются со специфическими антителами (I-антитела). При последующем добавлении меченых II-антител, а затем субстрата для хромогенного фермента, ковалентно пришитых к II-антителам, развивается реакция, которую можно оценить визуально (иммунохимическое окрашивание) и спектрофотометрически. Размер белков оценивается на основе стандартов молекулярных масс [Burnette, 1981]. Приборы, используемые для проведения Western-блоттинга, представлены в приложении 2.

Глава 3

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ

Электрофоретический анализ любых биологических образцов требует соблюдения определенных условий и требований. Прежде чем приступить непосредственно к анализу материала, следует провести кропотливую и безошибочную подготовительную работу. Это позволит избежать траты химических реактивов и повторных попыток проведения электрофоретического анализа.

Подготовительная работа к проведению электрофоретического анализа включает в себя следующие этапы:

- приготовление растворов;
- подготовка пластин для заливки геля;
- приготовление и заливка геля;
- сборка электрофоретической камеры;
- приготовление образцов биологического материала для анализа;
- нанесение образцов на гель.

После последнего этапа непосредственно проводится электрофорез, по окончании которого гель следует окрасить и проанализировать.

Занятие 1

Приготовление сток-растворов для ПААГ-геля и проведения ДСН-электрофореза

Цель работы: подготовить растворы для приготовления ПААГ геля и растворы для проведения ДСН-электрофореза.

Материалы и оборудование: магнитная мешалка, рН-метр, электрическая плитка, пипетки, колбы объемом 100 мл (4 шт.), 25 мл (1 шт.), 50 мл (1 шт.), 1000 мл (1 шт.), химические стаканы, стеклянная палочка, акриламид, метилен-бис-акриламид, трис(оксиметил)-аминометан, додецил сульфат натрия, персульфат аммония, меркаптоэтанол, бромфеноловый синий, глицерин, натриевая соль этилендиамина терефталевой кислоты, глицин, дистиллированная вода.

1. Раствор акриламид/метилен-бис-акриламид (раствор № 1) (Т = 60 %, С = 3 %), где Т – процентное отношение суммарной массы

обоих мономеров к объему их раствора, С – процентное отношение массы метилен-бис-акриламида к общей массе обоих мономеров.

Приготовить навеску, содержащую 58,2 г акриламида и 1,8 г МБА. Смочить дистиллированной водой с учетом того, что объем раствора не должен превышать 100 мл, и, периодически помешивая, нагреть до 40–60 °С. После полного растворения объем раствора довести до 100 мл и профильтровать. Хранить не более 3 месяцев при 4 °С в темноте.

2. 4-кратный буфер для разделяющего геля – 1,5 М трис-НСl, рН 8.8 (№ 2).

Приготовить навеску 18,3 г трис(оксиметил)-аминометана и растворить ее в 60 мл дистиллированной воды. Довести рН полученного раствора с помощью концентрированной соляной кислоты до значения 8.8. После этого довести объем полученного раствора до 100 мл и профильтровать. Хранить не более 3 месяцев при 4 °С в темноте.

3. 4-кратный буфер для концентрирующего геля – 0,5 М трис-НСl, рН 6.8 (№ 3).

Приготовить навеску 6,1 г трис(оксиметил)-аминометана и растворить ее в 60 мл дистиллированной воды. Довести рН полученного раствора с помощью концентрированной соляной кислоты до значения 6.8. После этого довести объем полученного раствора до 100 мл и профильтровать. Хранить не более 3 месяцев при 4 °С в темноте.

4. 10 %-ный ДСН (№ 4).

Приготовить навеску 10 г ДСН и растворить ее в дистиллированной воде, довести объем полученного раствора до 100 мл и профильтровать. Полученный раствор хранить не более 6-ти месяцев при комнатной температуре.

5. 40 % раствор ПСА (№ 5).

Приготовить навеску 100 мг персульфата аммония и, растворяя в дистиллированной воде, довести конечный объем до 250 мкл. Полученный раствор хранить не более одних суток в темноте.

6. 2-кратный буфер для подготовки образцов к электрофорезу – 0,125М трис-НСl рН 6.8, 4 %-ный ДСН, 10 %-ный меркаптоэтанол (№ 6).

Приготовить раствор, содержащий:

- а) 2,5 мл раствора № 3;
- б) 4 мл раствора № 4;
- в) 1 мл меркаптоэтанола.

Довести объем полученной смеси дистиллированной водой до 10 мл. Хранить при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев.

7. Раствор для окрашивания образцов перед электрофорезом – 0,01 %-ный БФС (лидирующий краситель), 70 %-ный глицерин, 0,1М натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА•Na₂) (№ 7).

Приготовить навеску, содержащую 1,88 г ЭДТА•Na₂ (•2H₂O), 5 мг БФС, растворить в дистиллированной воде при помешивании и умеренном подогреве с учетом того, что конечный объем данной смеси должен быть 22,2 мл. После полного растворения добавить 27,8 мл глицерина. Хранить при комнатной температуре.

8. Электродный буфер – 0,025 М трис-HCl, 0,192 М глицин, 0,1 %-ный ДСН, рН 8,3 (№ 8).

Приготовить навеску, содержащую 3 г трис(оксиметил)-аминометана, 14 г глицина и 1 г ДСН. Растворяя в дистиллированной воде, довести объем до 1 л. Полученный раствор хранить не более одного месяца при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Все приготовленные растворы должны храниться согласно рекомендаций, в подписанной посуде, на которой указывается наименование раствора, дата его приготовления и другие необходимые сведения.

Занятие 2

Подготовка стеклянных пластин для заливки геля, приготовление и заливка геля, сборка электрофоретической камеры

Цель работы: подготовить стеклянные пластины, залить гель и собрать электрофоретическую камеру.

Материалы и оборудование: стеклянные пластины, электрофоретическая камера в наборе, магнитная мешалка, химические стаканы, стеклянные палочки, растворы, приготовленные на занятии 1, *n*-бутанол, тетраметилэтилендиамин, дистиллированная вода.

1. Подготовка стеклянных пластин для заливки геля

В зависимости от используемой модели электрофоретической камеры существуют разные подходы к сборке стеклянных пластин для заливки электрофоретического геля. Рассмотрим два из них.

1) Сборка стеклянных пластин отдельно от электрофоретической камеры.

Возьмите две стеклянные пластины – с вырезом для гребенки и без выреза. Положите стеклянную пластину без выреза на ровную горизонтальную поверхность и разместите по ее краям два спейсера, промазанных тонким слоем вазелина, параллельно друг другу. Сверху положите на спейсеры стеклянную пластину с вырезом. Аккуратно зафиксируйте полученную конструкцию с помощью зажимов с тех сторон, где находятся спейсеры. Со стороны, противоположной вырезу стекла, щель между стеклами можно закрыть при помощи резиновой нити необходимой толщины и обработанной вазелином. Затем зафиксировать эту сторону с помощью зажимов. В вертикальном положении стеклянные пластины поставить на горизонтальную поверхность (вырез стекла должен находиться в верхней части конструкции).

2) Сборка стеклянных пластин в составе электрофоретической камеры.

Возьмите две одинаковые стеклянные пластины без выреза. Положите одну из них на ровную горизонтальную поверхность и разместите по ее краям два спейсера параллельно друг другу. Сверху положите на спейсеры вторую стеклянную пластину. Осторожно переместите стеклянные пластинки в вертикальное положение и поставьте на горизонтальную поверхность так, чтобы спейсеры были ориентированы вертикально. Обратите внимание, чтобы отсутствовал зазор между спейсерами и горизонтальной поверхностью. С помощью специальных зажимов зафиксируйте стеклянные пластины с находящимися между ними спейсерами и поместите полученную конструкцию в вертикальном положении в систему электрофоретической камеры так, чтобы щель между стеклами снизу была герметично закрыта.

2. Приготовление и заливка геля

Электрофоретический гель, как правило, состоит из двух составных частей – концентрирующего геля (небольшая часть геля с кармашками для нанесения образца, позволяющая исследуемым образцам плавно войти в гель и сконцентрироваться на одной прямой перед разделением в основной части геля) и разделяющего геля (основная часть геля, в которой происходит разделение белковых компонентов по определенным параметрам – молекулярным массам и (или) зарядам).

Для разделения белковых компонентов можно использовать однородные пластины ПААГ с концентрацией мономеров от 8 до 24 %, а также пластины ПААГ с линейным градиентом концентрации мономеров 8–24 %. В заранее приготовленные формы из стеклянных пластин сначала заливается разделяющий гель (в случае градиентного геля – с

помощью смесителя). Для получения четкой и ровной границы полимеризации сверху раствора разделяющего геля наслаивают насыщенный водой *n*-бутанол (или дистиллированную H₂O), который удаляется после полимеризации. Затем заливают концентрирующий гель, в который вставляют гребенку для формирования кармашков необходимых размеров. В качестве концентрирующего геля используется 5 % или 6 % ПААГ (табл. 4 и 5).

Таблица 4

Состав разделяющих гелей различной концентрации

Компонент	Г, %								
	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1,5 М трис-НСl бу- фер, рН 8.8, мл	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
АА:МБА (Г= 60 %, С=3 %), мл	4	5	6,	7	8	9	10	11,0	12
10 % ДСН, мл	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
ТЕМЕД, мкл	10	10	10	10	10	10	10	10	10
H ₂ O, мл	18,2	17,2	16,2	15,2	14,2	8,2	7,2	6,2	5,2
60 % глицерин, мл	–	–	–	–	–	5	5	5	5
Деаэрирование (3–5 мин)									
40 % ПСА, мкл	40	40	40	40	40	40	40	40	40
Общий объем, мл	30	30	30	30	30	30	30	30	30

Таблица 5

Состав концентрирующих гелей различной концентрации

Компонент	Г, %	
	5 %	6 %
0,5 М трис-НСl буфер, рН 6.8, мл	5	5
АА:МБА (Г=60 %, С=3 %), мл	1,7	2,0
10 % ДСН, мл	0,2	0,2
ТЕМЕД, мкл	15	15
H ₂ O, мл	13,1	12,8
Деаэрирование (3–5 мин)		
40 % ПСА, мкл	30	30
Общий объем, мл	20	20

1) Для приготовления разделяющего геля смешайте компоненты (за исключением 40 %-ного ПСА) в соответствии с приведенными в табл. 4 данными. Полученную смесь тщательно перемешайте.

2) Добавьте ПСА и тщательно перемешайте полученный раствор (важно, чтобы в процессе перемешивания не образовывались пузырьки с газом).

3) Полученный раствор разделяющего геля залейте между стеклянными пластинами так, чтобы уровень заливаемого геля был на расстоянии 2,5–3 см от верхнего края стеклянных пластин.

4) Осторожно наслоите на раствор разделяющего геля тонкий слой *n*-бутанола или дистиллированной воды и оставьте гель для полимеризации (20–30 мин).

5) Приготовьте раствор концентрирующего геля как указано в табл. 5.

6) Удалите слой *n*-бутанола или воды с поверхности заполимеризованного разделяющего геля.

7) Наслоите поверх разделяющего геля раствор концентрирующего геля и немедленно после этого вставьте гребенку между стеклянными пластинами.

8) Оставьте гель для полимеризации (30–40 мин).

9) Для проведения электрофореза гребенку необходимо удалить и промыть сформированные кармашки дистиллированной водой (при необходимости полученный гель можно оставить на ночь в холодильнике, не вынимая гребенку и поместив стеклянные пластины с гелем в полиэтиленовый пакет).

3. Сборка электрофоретической камеры

1) Поставьте нижнюю часть электрофоретической камеры на ровную горизонтальную поверхность. Налейте в нее необходимое количество электрофоретического буфера (раствор № 8).

2) Перенесите пластины с гелем в электрофоретическую камеру (в случае герметизации щели между стеклами резиновой нитью – ее необходимо удалить).

3) Заполните электродным буфером кармашки геля. В таком состоянии электрофоретический прибор можно оставить на ночь в холодильнике.

Занятие 3

Приготовление образцов.

Нанесение образцов и проведение электрофореза

Цель работы: выделить щелочерастворимую фракцию белков из листьев и клубней картофеля, провести электрофоретическое разделение выделенных белков.

Материалы и оборудование: растительный материал, ступки с пестиком, электрофоретическая камера, источник тока, магнитная мешалка, рН-метр, водяная баня, центрифуга с охлаждением, пробирки типа Eppendorf, химические стаканы, стеклянные палочки, растворы, приготовленные на занятии 1, фенилметилсульфонилфлуорид (PMSF), этилендиаминтетрауксусная кислота, N-этиленмалеимид, аскорбиновая кислота, соляная кислота, трис(оксиметил)-аминометан, трихлоруксусная кислота, дистиллированная вода.

Выделение щелочерастворимой фракции белков из листьев и клубней картофеля для электрофоретического анализа

Среда для экстракции: 0,001 М аскорбиновая кислота, 0,0375 М трис-НСl, рН 8,8:

1) Взвесьте 0,453 г трис(оксиметил)-аминометана и 0,017 г аскорбиновой кислоты. Добавьте дистиллированную воду, доведите объем раствора до 80 мл. При помощи 1М НСl доведите рН буфера до значения 8,8. Доведите объем до 100 мл. Хранить буфер при 4 °С.

Для выделения щелочерастворимой фракции белков используют зеленые листья 14-суточных проростков картофеля или клубни картофеля в стадии покоя [Сафонов В. И., Сафонова М. П., 1971]. У последних отдельно исследуют фракции хлорофиллсодержащего слоя (0,7–1 мм от поверхности) и низлежащей паренхимной зоны. Все операции проводят при 4 °С. Навеску паренхимы, или хлорофиллсодержащего слоя клубня, или зеленых листьев 200–300 мг помещают в керамические ступки и измельчают пестиком до получения гомогената. Измельченный материал залить средой для экстракции в объемном соотношении навеска: среда = 1:3 и оставить в холодильнике на 30–60 мин. Для подавления активности протеиназ в среду для выделения желательно добавить ингибитор сериновых протеиназ PMSF в концентрации 10 мкг/мл, ингибитор металлозависимых протеиназ ЭДТА в концентрации 5мМ и ингибитор цистеиновых протеиназ N-этиленмалеимид в концентрации 0,1мМ. Гомогенат профильтровать через капроновую ткань и отцентрифугировать при 6500 g в течение 30 мин на холоде.

2) Подготовленные образцы перенесите в пробирки типа Eppendorf и смешайте с 2-кратным буфером для электрофореза (раствор № 6) в соотношении 1:1. Добавьте в каждый образец 1/5 часть от полученного объема окрашивающий раствор (№ 7). Тщательно встряхните.

3) Прокипятите полученные образцы на водяной бане в течение 2–5 мин.

4) Проведите центрифугирование образцов в течение 5 мин при 6000–8000 *g*.

5) С помощью дозатора нанесите по 10–30 мкл каждого образца в кармашки концентрирующего геля, образованные с помощью гребенки.

6) Долейте электрофоретический буфер (раствор № 8) в камеру так, чтобы он полностью покрыл кармашки концентрирующего геля.

7) Подключите электрофоретическую камеру к источнику тока.

8) Первые 30–60 мин электрофорез проводится при постоянном токе 20 мА на один гель. После этого силу тока можно увеличить до 30–40 мА на один гель. В этих условиях электрофорез в однородном геле проходит за 1,5–2 часа, а в градиентном геле – за 3,5–4 часа.

9) По достижению лидирующим красителем (БФС) нижнего края геля отключите ток.

10) Удалите пластины с гелем из электрофоретической камеры.

11) Осторожно достаньте спейсеры, находящиеся между стеклянными пластинами, после чего аккуратно разнимите стекла с помощью шпателя или специального ножа.

12) Для фиксирования разделившихся белковых компонентов поместите гель в 15–20 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) на 1–2 часа (или более).

Занятие 4

Окрашивание ПААГ и его анализ

Цель работы: окрасить ПААГ с помощью Кумасси голубого R-250 и проанализировать на наличие белковых фракций.

Материалы и оборудование: магнитная мешалка, химические стаканы, колбы объемом 300 мл (2 шт.), ванночки с плоским дном, шейкер (качалка), трансиллюминатор или прозрачный столик с подсветкой, резиновые перчатки, этиловый спирт, Кумасси R-250, ледяная уксусная кислота, дистиллированная вода.

Окрашивание ПААГ с помощью Кумасси R-250

Чувствительность данного метода – 0,3–1,0 мкг белка/мл.

Раствор для окрашивания: 0,1 %-ный Кумасси R-250, 25 %-ный этанол, 10 %-ная ледяная уксусная кислота (ЛУК).

Подготовьте навеску 0,3 г Кумасси R-250. Растворите ее в 75 мл этанола. Добавьте к полученному раствору 30 мл ЛУК и доведите объем смеси до 300 мл дистиллированной водой. Раствор можно использовать для покраски 3–4 гелей.

Раствор для отмывания гелей после окраски: 10–15 %-ный этанол, 10 %-ный ЛУК.

Раствор хранится при комнатной температуре под тягой.

Окрашивание проводится в ванночках с плоским дном (необходимо работать в резиновых перчатках!!!):

1) Поместите гель в раствор для окрашивания. Окрашивание проводится в течение 1,5–2 часов при медленном перемешивании на шейкере (качалке).

2) Слейте раствор для окрашивания, промойте гель дистиллированной водой и залейте отмывающим раствором на 2 часа и более. Отмывание происходит быстрее и равномернее при медленном перемешивании на шейкере (качалке).

3) Для просмотра электрофоретического разделения исследуемых образцов гели выкладывают на горизонтальный столик с подсветкой. Гели документируют фотографированием цифровой фотокамерой или сканированием.

4) Полученные электронные изображения гелей обрабатывают с помощью специализированного программного обеспечения «Sigma gel» или «Phoretix 1D». Проводят денситометрический анализ и рассчитывают относительную электрофоретическую подвижность (R_f) и молекулярную массу (M_r) всех интересующих зон (полос) на электрофореграмме.

Глава 4

КОНТРОЛИРУЕМАЯ САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА ПО ТЕМЕ «ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА»

Темы рефератов и эссе

Принципы классификации методов электрофореза белков.

История развития метода электрофореза.

Электрофорез белков как метод изучения биоразнообразия растений.

Двухмерный электрофорез белков. Принципы изоэлектрофокусирования. Преимущества двухмерного электрофореза.

Способы последующей идентификации белков: окрашивание различными красителями и флуоресцентными зондами.

Масс-спектрометрия как способ идентификации белков.

Протеомика. Основные задачи протеомики.

Western-блоттинг. Принципы и особенности метода, цели и задачи, область применения метода.

Вопросы и задачи

Какие характеристики белковых молекул (размер, форма, заряд, pI) лежат в основе их разделения с использованием следующих вариантов электрофореза: нативный, кислый, ПААГ-ДСН, изоэлектрофокусирование?

Какие факторы необходимо учитывать при выборе буфера для электрофореза (его природы, pH и концентрации)?

Какие компоненты используются для приготовления полиакриламидного геля, и какова функция каждого из них?

Какие преимущества имеет электрофорез в градиентном полиакриламидном геле?

В чем суть двухмерного электрофореза, для каких целей его используют?

К какому электроду стремится буфер в большинстве вариантов электрофореза?

Назовите преимущества и недостатки полиакриламида как среды для электрофореза по сравнению с крахмалом.

Каким будет pH раствора чистого белка в чистой воде?

Каковы функции концентрирующего и разделяющего гелей при постановке диск-электрофореза?

В каких координатах наиболее целесообразно строить калибровочную кривую для электрофореграмм, полученных при разделении образцов в ПААГ-ДСН?

Какова цель использования неоднородного геля и буфера при постановке диск-электрофореза в ПААГ?

Перечислите трудности, с которыми приходится сталкиваться при создании ИЭФ-системы.

Может ли вода проходить через гель под действием силы тяжести?

Может ли вода проходить через гель под действием электрического поля?

Каким образом можно варьировать размер пор геля?

Представьте себе электрофорез в ПААГ со следующими параметрами: гель толщиной 1 мм имеет длину 10 см, к нему приложено напряжение 300 В, при этом возникает ток силой 30 мА:

а) Каков градиент напряжения на геле?

б) Каким станет градиент напряжения, если два таких геля подключить параллельно к одному источнику тока, а значение силы тока оставить прежним (30 мА)?

в) Как изменится градиент напряжения, если использовать буфер с меньшим размером ионов?

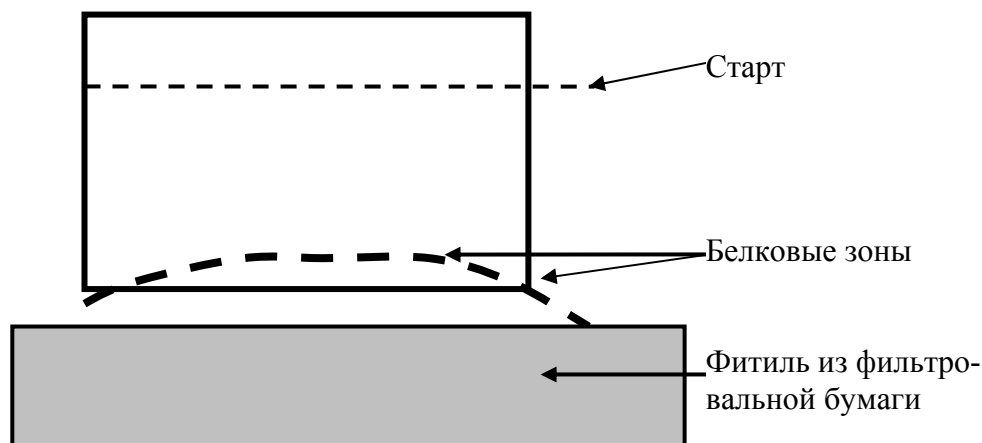
Вы поставили ДСН-электрофорез в ПААГ. В предыдущем эксперименте при разности потенциалов 90 В бромфеноловый синий прошел 35 мм за 1 час. Сейчас к такому же гелю вы приложили напряжение 150 В. Красителю бромфеноловому синему осталось пройти 50 мм до конца геля. Вы хотите сходить перекусить: как долго Вы можете отсутствовать?

Студент поставил электрофорез в горизонтальной системе, причем концы геля соединялись с электродными буферами при помощи фитилей из фильтровальной бумаги. Студент решил, что это не будет иметь особого значения и сделал фитили шире, чем сам гель, как показано на рисунке (показан лишь один край геля). Проанализировав расположение линий напряженности поля и изопотенциальных контуров, объясните, почему белковые зоны образуют кривую линию, как показано на рисунке.

ке. Стандартная белковая смесь, состоящая из 6 компонентов известной молекулярной массы (12,9; 16,6; 21,6; 31,2; 40,5; 59,4 кДа) и бромфенолового синего, была подвергнута ДСН-электрофорезу в ПААГ параллельно с очищенным препаратом неизвестного белка. В невозстанавливающих условиях стандартная смесь дала 6 окрашиваемых полос (зон) на расстоянии 1,1; 1,8; 2,6; 3,8; 4,4 и 5,0 см от старта, в то время как неизвестный образец образовал зону на расстоянии 1,5 см от старта. Бромфеноловый синий прошел 6,1 см. В восстанавливающих условиях стандартная смесь дала семь зон с пробегом 1,2; 2,7; 3,5; 4,0; 4,6; 4,8; 5,2 см, а неизвестный белок дал две полосы на расстоянии 3,1 и 3,7 см. Бромфеноловый синий прошел 6,4 см в каждом геле.

а) Дайте объяснение полученным результатам (в том числе рассчитайте молекулярную массу неизвестного белка).

б) Объясните, что вы понимаете под восстанавливающими и невозстанавливающими условиями.



Тестовые задания

1. Какие факторы влияют на проведение электрофореза белков?

- | | | | |
|---|-------------------------------------|---|-----------------|
| А | Увеличение градиента напряжения (В) | В | Размер пор геля |
| Б | Увеличение заряда белка | Г | Все факторы |

2. Каким образом можно варьировать размер пор ковалентно-сшитого геля?

- | | | | |
|---|---|---|---|
| А | Изменением концентрации полимера | В | Созданием градиента концентрации полимера |
| Б | Изменением концентрации поперечно сшивающего агента | Г | Все утверждения ложны |

3. Какие вещества используют в качестве гелеобразующих при проведении электрофореза?

- | | | | |
|---|------------|---|----------|
| А | Агароза | В | Сефароза |
| Б | Полиэтилен | Г | Крахмал |

4. Какие вещества образуют градиент pI в геле для изоэлектрофокусирования?

- | | | | |
|---|----------|---|-------------------|
| А | Амфолиты | В | Сервалиты |
| Б | Амфолины | Г | Все перечисленные |

5. Как влияет увеличение поперечного сечения геля на его электрическое сопротивление?

- | | | | |
|---|---|---|---|
| А | Электрическое сопротивление геля уменьшится | В | Градиент напряжения сильно увеличится и белки будут мигрировать быстрее |
| Б | Электрическое сопротивление геля увеличится | Г | Градиент напряжения уменьшится и белки будут мигрировать медленнее |

6. Как будут отличаться молекулярные массы, определенные методом ДСН-электрофореза в ПААГ от масс, определенных с помощью гель-фильтрационной хроматографии?

- | | | | |
|---|----------------------------|---|----------------------------|
| А | Будут меньшими | В | Будут большими |
| Б | Будут меньшими или равными | Г | Будут большими или равными |

7. При одинаковой ионной силе раствора проводимость электролитической системы с меньшим размером ионов будет:

- | | | | |
|---|---|---|---|
| А | Большой, чем у системы с большим размером ионов | Б | Меньшей, чем у системы с большим размером ионов |
|---|---|---|---|

В связи с этим ионы белков будут иметь:

- | | | | |
|---|---------------------|---|---------------------|
| В | Меньшую подвижность | Г | Большую подвижность |
|---|---------------------|---|---------------------|

8. Отметьте, что из нижеприведенного является правильными утверждениями:

- | | | | |
|---|---|---|---|
| А | Вода может проходить через агарозный гель | В | При постановке диск-электрофореза в ПААГ анод должен находиться в нижнем сосуде |
|---|---|---|---|

- Б ДСН-электрофорез в ПААГ является удобной препаративной методикой
- Г Все утверждения ложны

9. В процессе электрофореза белок движется через буфер, не содержащий сахарозу. Что произойдет, если белок достигнет зоны, содержащей 20 % сахарозы?

- А Сопротивление продвижению белка уменьшится, и скорость миграции белка увеличится
- Б Увеличится сопротивление к скорости миграции белка из-за повышенной концентрации раствора сахарозы
- В Сопротивление продвижению белка увеличится и скорость миграции белка уменьшится
- Г Не повлияет ни на какие процессы

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

ПРИБОРЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



А. Градиент-мэйкер (смеситель) для создания гелей с градиентом концентрации ПАА

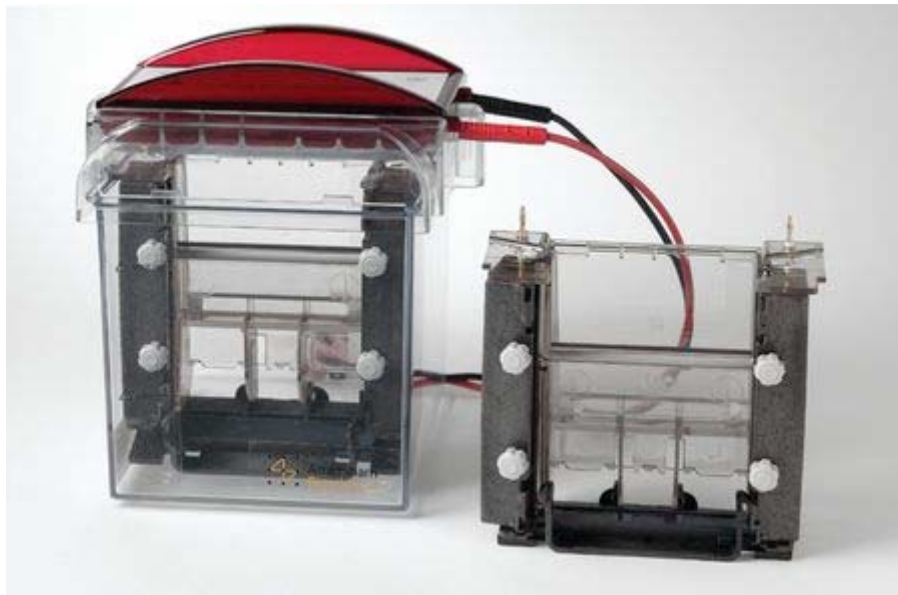


Б. SE 400 – прибор для вертикального электрофореза белков обеспечивает качественное и экономичное разделение в гелях длиной 16 см



В. Электрофореграмма гистоновых белков из ядер проростков галеги (1, 5, 6) получена методом кислого электрофореза в АУТ-среде (уксусная кислота, мочеви́на, тритон Х-100) с использованием прибора SE 400. 2, 7 – H3, 3, 8 – H2A и 4 – H4 (маркерные гистоны тимуса теля́нка, Roche, Германия) [Гончарова, 2006]

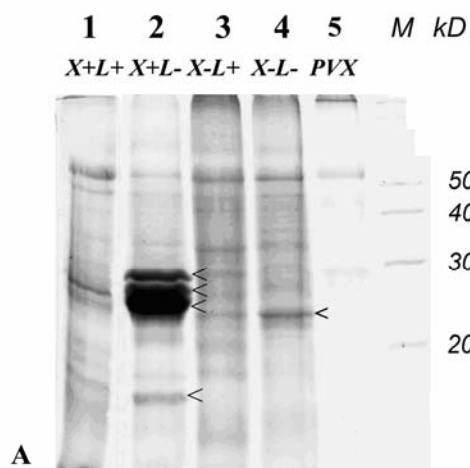
ПРИБОРЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ



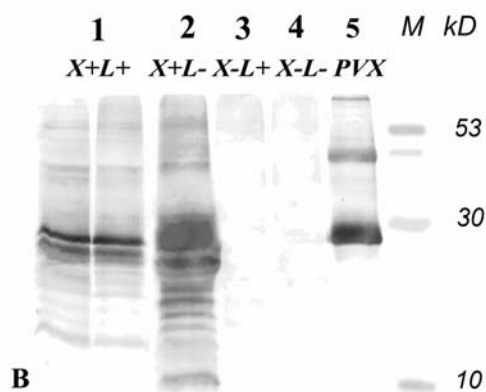
А. *MiniVE*-система позволяет выполнять электрофорез, а также последовательный электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану для последующего специфического выявления белков антителами



Б. *Mini VE System* для *Western*-блоттинга включает кассету для переноса белков на мембрану одновременно с двух гелей



A



B

В. Кислоторастворимые белки листьев родственных клонов картофеля (с. Аксамит) разделены в 12,5 % ПААГ-ДСН на приборе mini VE. Гель окрашен Кумасси голубым (А). Иммуноблоттинг с антителами против *X*-вируса картофеля (В) разделенных выше белковых фракций. Белки были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану с использованием блотт-модуля mini VE. Белки *X*-вируса картофеля выявляли инкубацией с антителами anti-*PVX* и последующей специфической окраской [А. Б. Власова, 2002]:

- 1(*X+L+*) – клон, восприимчивый к *X*- и *L*-вирусам;
- 2(*X+L-*) – клон, восприимчивый к *X*- и устойчивый к *L*- ВК;
- 3(*X-L+*) – клон, устойчивый к *X*- и восприимчивый к *L*- ВК;
- 4(*X-L-*) – клон, устойчивый к обоим ВК.
- 5 (*PVX*) –*X*-вирус картофеля; *M* – маркерные белки.

ПРИБОРЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



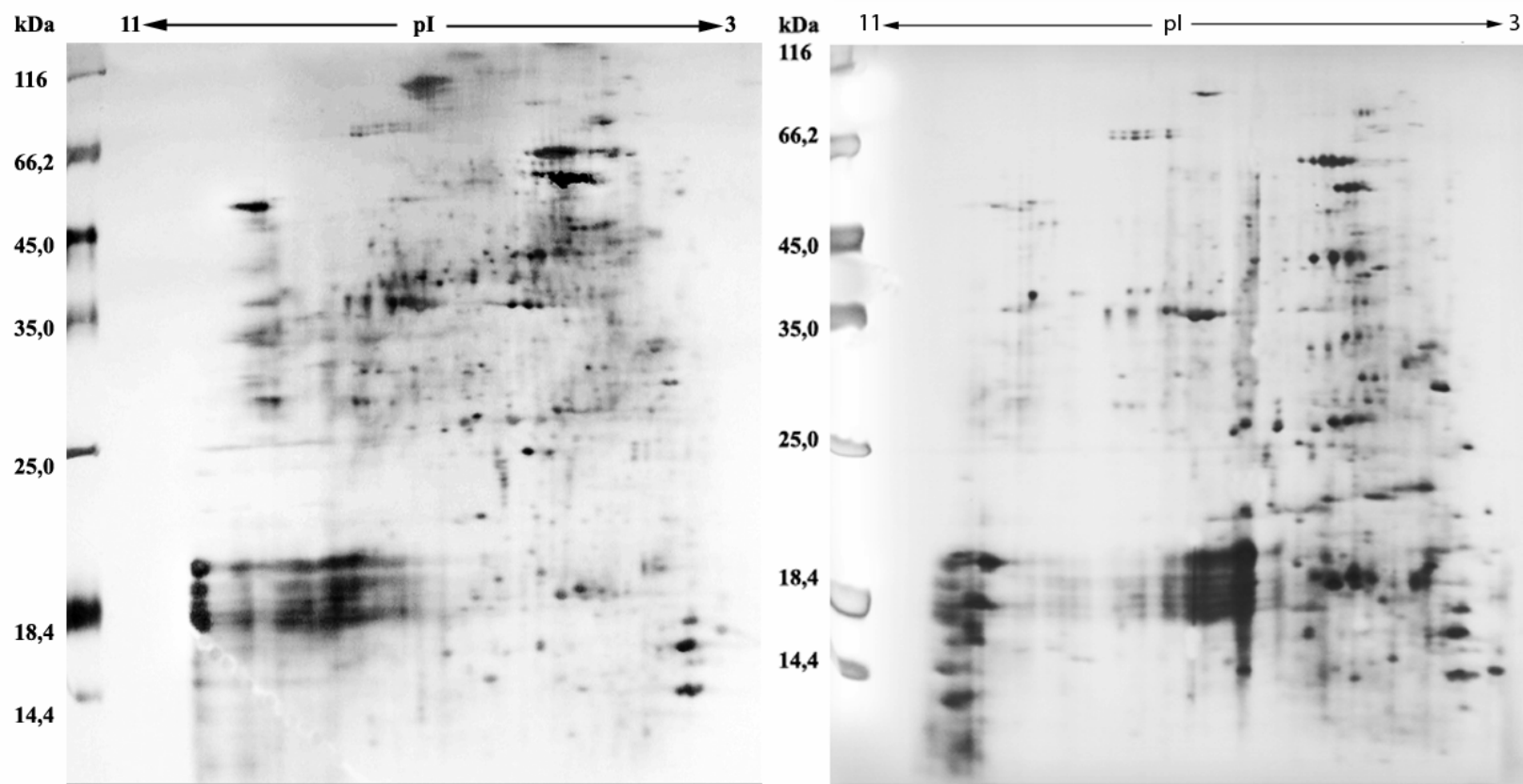
А. Многофункциональная система для проведения изоэлектрофокусирования, электрофореза в денатурирующих и нативных условиях, двухмерного (2-D) белкового электрофореза (источник питания, Мультифор и охлаждающая система, система для заливки гелей)



Б. SE 600 Ruby-система идеальна для проведения второго направления 2-D электрофореза (позволяет заливать гели длиной от 8 до 16 см)



В. Компоненты SE 600 Ruby системы для вертикального электрофореза: А – крышка; В – резервуар для нижнего буфера; С – камера для верхнего буфера; D – смазка для изоляции геля; Е – гребенка; F – замок; G – спейсеры; H – зажимы; I – стеклянные пластины; J – устройство для заливки; K – охлаждающее устройство; L – уровень; M – линейка толщины спейсеров и гребенок; N – вспомогательный спейсер; O – ограничитель буфера; P – ламинированная резиновая прокладка; Q – резиновая прокладка с прорезью



А

Б

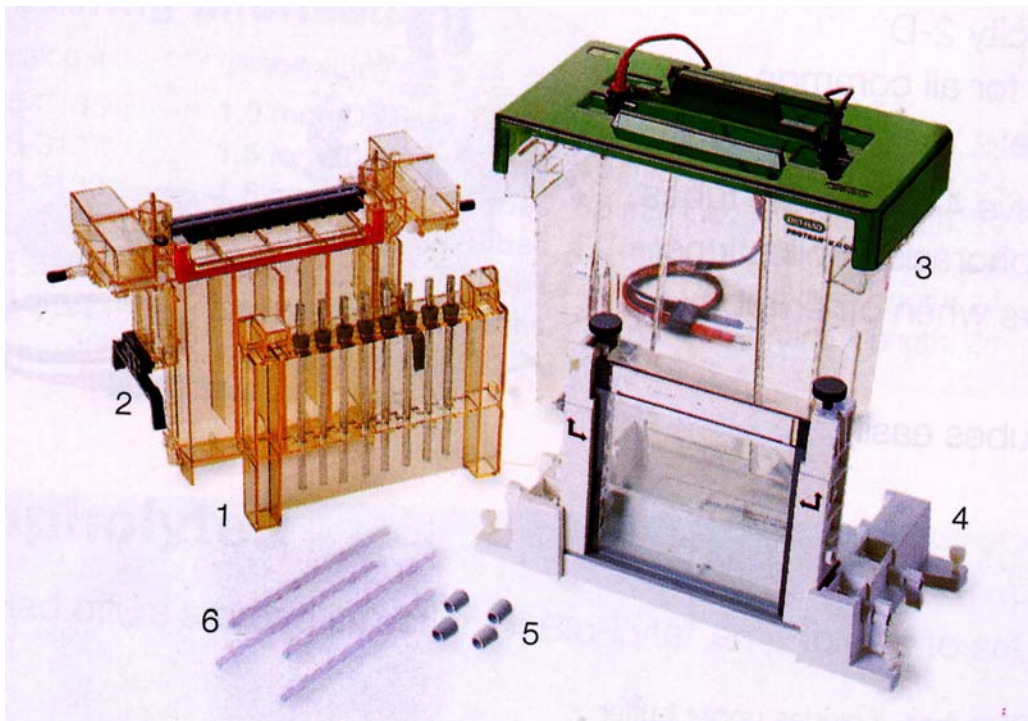
Г. 2-D-карта получена при разделении белков ДНК-связанной фракции контрольных (*А*) и опытных (*Б*) проростков ржи сорта Верасень с использованием прибора SE 600 после изофокусирования на приборе «Multiphor II» на стрипах pI 3–11.

Второе направление осуществлено в ПААГ-пластинах 12 %. Гели окрашены серебром [Спиридович, Власова, 2009]

**ПРИБОРЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ПРЕДФОКУСИРОВКИ,
ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ,
И ДВУХМЕРНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ**



А. Rotofor cell позволяет проводить предфокусировку белков в жидкой фазе

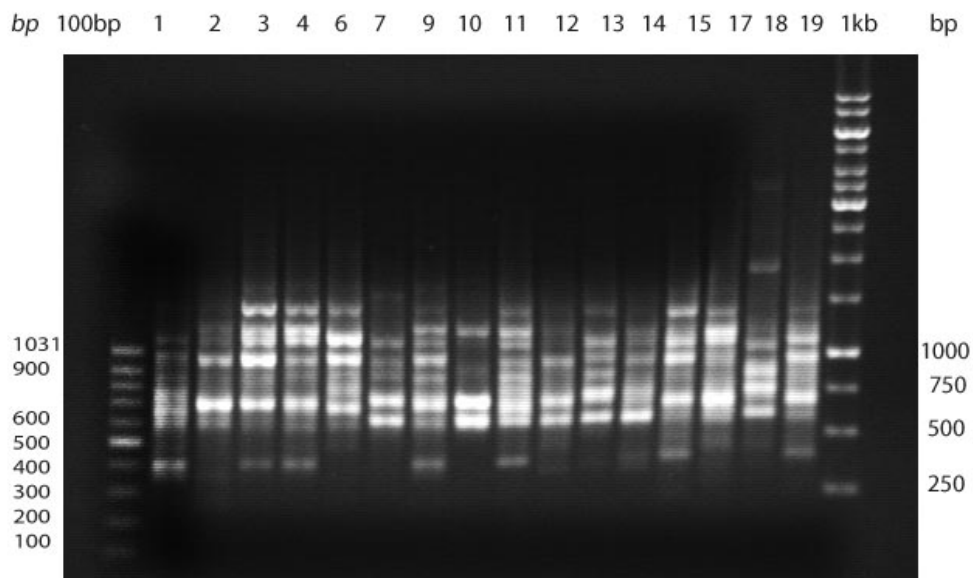


Б. Protein 2-D Electrophoresis Cell позволяет проводить в первом направлении изоэлектрофокусирование в трубочках, а во втором – ДСН-электрофорез в ПААГ

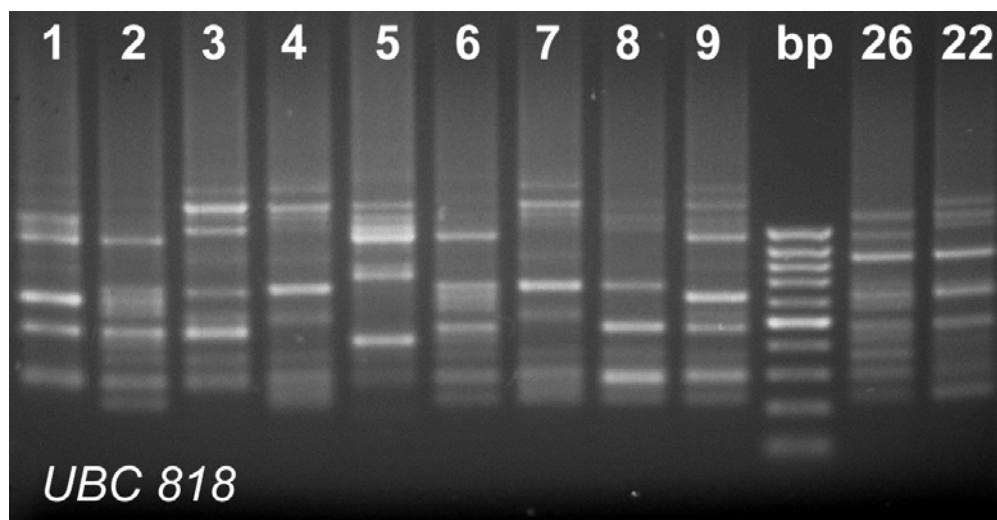
ПРИБОРЫ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ



А. HE 33 Mini Submarine-система обеспечивает пассивное охлаждение, быстрое и качественное разделение нуклеиновых кислот в агарозных гелях



Б. Электрофорез ампликонов RAPD-ПЦР геномной ДНК из листьев сортообразцов Курильского чая с праймером ОРА-05. Образцы были разделены в течение 60 мин при 70 V в 1 % агарозном геле, окрашены в растворе бромистого этидия и визуализированы в ультрафиолетовом свете; 1–19 – сортообразцы; 100 bp и 1kb – стандарты размеров фрагментов ДНК, bp [Власова, Панкратов, Спиридович, 2009]



В. Электрофорез ампликонов ISSR-ПЦР геномной ДНК из листьев голубики с праймером UBC 818. Образцы были разделены в течение 60 мин при 70 V в 1 %-ном агарозном геле, окрашены в растворе бромистого этидия и визуализированы в ультрафиолетовом свете; 1–9, 26, 22 – сорта; bp – стандарты размеров фрагментов ДНК [Гончарова, 2007]

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бикчентаева, А. Г.* Поверхностные явления и дисперсные системы / А.Г. Бикчентаева . – Уфа, 1998.
2. Биофизика: учебник для студентов биологических специальностей университетов / под ред. Б. Н. Тарусова, О. Р. Кольс. – М: Высш. шк., 1968.
3. *Галь, Э.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Галь, Г. Медьеши, Л. Верецкеи; пер. с англ. – М.: Мир, 1982.
4. *Кантор, Ч.* Биофизическая химия / Ч. Кантор, П. Шиммел. – М.: Мир, 1984. – Т. 2. – С. 299–306.
5. *Маурер, Г.* Диск-электрофорез / Г. Маурер. – М.: Мир, 1971.
6. *Остерман, Л. А.* Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1983.
7. *Остерман, Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практ. пособие) / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1981.
8. *Ригетти, П.* Изоэлектрическое фокусирование / П. Ригетти – М.: Мир, 1986.
9. *Скоупс, Р.* Методы очистки белков / Р. Скоупс; пер. с англ. – М.: Мир, 1985.
10. *Уильямс, В.* Физическая химия для биологов / В. Уильямс, Х. Уильямс. – М.: Мир, 1976.
11. Физико-химические методы исследования биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов: сб. под ред. В. Т. Иванова.– М.: Наука, 1992.
12. *Bothe, D.* A Sodium Dodecyl sulfate-Gradient Gel Electrophoresis System That separates polypeptides in the Molecular weight range 1500 to 100000 / D. Bothe, M. Simonis, Hans von Dohren // Analytical biochemistry. – 1985. Vol. 151. – P. 49–54.
13. *Coyne, V. E.* SDS polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) / V. E. Coyne, M. D. James, S. J. Reid, E. P. Rybisky // Molecular biology Techniques Manual. – 1996. – P. 105–110.
14. *Davis, B. J.* Ann. N.Y. Acad. Sci / B. J. Davis. – 1964. – Vol. 121. – P. 404.
15. *Galleschi, L.* Specific detection of α -amylase activity in crude plant extracts after isoelectric focusing / L. Galleschi, J. Chapman // Phytochemistry. – 1985. –

- Vol. 24, № 2. – P. 352–354.
16. *Garnett, P. J.* Implications of research on students' understanding of electrochemistry for improving science curricula and classroom practice / P. J. Garnett, P. J. Garnett, D. F. Treagust // Intern. J. of Sci. Edu. – 1990. – Vol. 12, № 2. – P. 147–156.
 17. *Henkel, A.* Qiantification of proteins dissolved in an electrophoresis sample buffer / A. Henkel, S. Bieger // Analytical biochemistry. – 1994. – Vol. 223, № 2. – P. 329–331.
 18. *Huang, D. Y.* Characterization and quantification of native glutenin aggregates by multistacking sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedures / D.Y. Huang, K. Khan // Cereal-chemistry (USA). – 1997. – Vol. 74, № 3. – P. 229–234.
 19. Isoelectric focusing: principles and methods / Pharmacea Fine Chemicals; practical manual. – 1991.
 20. *Mirault, M. E.* / Europ. J. Biochem / M. E. Mirault, K. Scherrer, L. Hansen. – 1971. – Vol. 23.
 21. *Nelson, D. L.* Lehninger Principles of Biochemistry / D. L. Nelson, David L. Michael M. Cox. – Worth Publishers, 2000. – 460 с.
 22. *O'Farrell, P. H.* High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins / P.H. O'Farrell. – Journal of Biological Chemistry. – 1975. – Vol. 250, № 10. – P. 4007–4021.
 23. *Righetti, P. G.* New developments in isoelectric focucing / P. G. Righetti, E. K. Gianazzae. // J. Chromatography. – 1980. – Vol. 184. – P. 415–456.
 24. *Thorun, W.* // Biochim. Biophys. Acta (Amst.) / W. Thorun, E. Mehl. – 1968. – Vol. 160. – P. 132.
 25. *Weber, K.* The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis / K. Weber, M. Osborn // J Biol Chem. – 1969. – Vol. 244, № 16. – P. 4406–4412.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

26. Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 113–119.
27. *Кочетов, Г. А.* Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М., 1980.
28. *Троицкий, Г. В.* Изоэлектрическое фокусирование белков в самоорганизующихся и искусственных рН-градиентах / Г. В. Троицкий, Г. Ю. Ажицкий. – Киев: Наук. думка, 1984.

29. *Гавриленко, В. Ф.* Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина; под ред. Б. А. Рубина. – М: Высш. шк., 1975. – С. 194–200.
30. *Фрайфелдер, Д.* Физическая биохимия / Д. Фрайфелдер. – М. Мир, 1980.
31. *Ройт, А.* Основы иммунологии / А. Ройт. – М.: Мир, –1991. – С. 94.
32. Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина и Г. А Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989.
33. *Сафонов, В. И.* Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле / В. И. Сафонов, М. П. Сафонова // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – С. 113–119.
34. *Baxevanis, A. D.* Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins / A. D. Baxevanis, B. F. Ouellette // John Wiley & Sons, Inc. – 2001. – P. 354.
35. *Bradford, M. M.* A rapid sensitive method for the action of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976.– Vol. 72.– P. 248–254.
36. *Burnette, W. H.* «Western blotting»: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A / W. H Burnette // Anal Biochem. – 1981.– Vol. 12, № 2.– P. 195–203.
37. *Kreigler, M.* Gene Transfer and Expression: a laboratory manual / M. Kreigler. – N. Y.: Stokton Press, 1990. – 242 p.
38. *Laemmli, U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature (Lond).– 1970.– Vol. 227.– P. 680–685.
39. Guide to Isoelectric Focusing, Amersham Science. – Mode of access: <http://bionmr.ustc.edu.cn/links/GE%20Healthcare/Guide%20to%20isoelectric%20focusing.pdf>.
40. Isoelectric focusing and staining of the isozymes PGI and PGM. Principles of isoelectric focusing. – Mode of access: <http://folk.ntnu.no/vmbossaa/moscou.htm>

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
Глава 1. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ	5
1.1. Принцип и общая теория электрофореза	5
1.2. Свойства белковых молекул, обуславливающие их подвижность в электрическом поле	9
1.3. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	11
1.4. Принципы приготовления ПААГ и аппаратура	12
1.5. Основные условия успешного проведения электрофореза белков	15
1.6. Технические приемы организации электрофореза.....	19
1.7. Техника безопасности при работе с полиакриламидом	21
Глава 2. ВИДЫ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ	22
2.1. Электрофорез в нативных условиях	23
2.2. Электрофорез в кислой системе.....	23
2.3. Диск-электрофорез	24
2.4. Электрофорез в щелочной системе, или ДСН-ПААГ-электрофорез	25
2.5. Изоэлектрофокусирование	27
2.5.1. Технические приемы проведения ИЭФ.....	30
2.5.2. Расчет изоэлектрических точек исследуемых образцов.....	32
2.6. Двухмерный электрофорез	33
2.7. Иммуноэлектрофорез белков	34
Глава 3. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАНЯТИЯ	36
Глава 4. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ «ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА»	45
ПРИЛОЖЕНИЯ	50
ЛИТЕРАТУРА	60

Учебное издание

**Спиридович Елена Владимировна,
Гончарова Людмила Владимировна,
Власова Анастасия Борисовна,
Смолич Игорь Иванович**

Электрокинетические явления: теория и методы

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Е. А. Логвинович*

Художник обложки *Т. Ю. Таран*
Технический редактор *Г. М. Романчук*
Компьютерная верстка *Е. В. Ковалева*
Корректор *Н. П. Ракитская*

Электронный ресурс 2,01 Мб
Режим доступа: <http://www.elib.bsu.by>, ограниченный

Белорусский государственный университет.
ЛИ № 02330/0494425 от 08.04.2009.
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск