



Электрофорез белков в геле

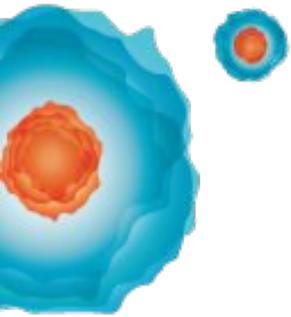
Колобов Александр
ООО «Компания Хеликон»
Санкт-Петербург
2018 г.

Один геном – разные протеомы

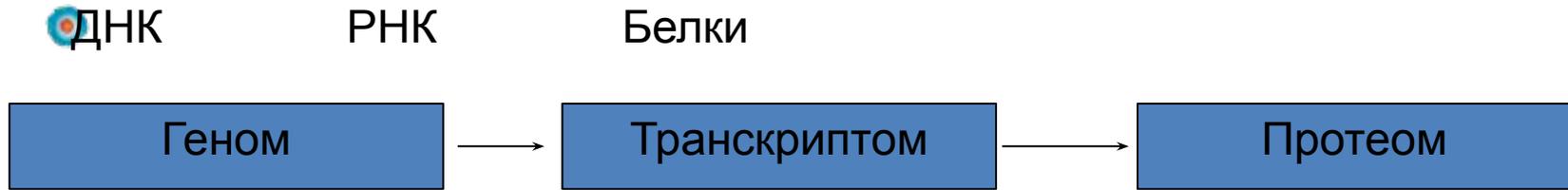


Основа жизни – это
белки и их
взаимодействия



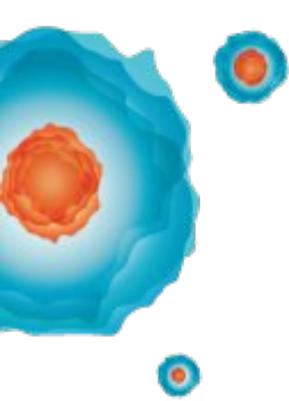


От генома к протеому



ПРОТЕОМ – все белки (**PROTEin**),
экспрессированные геномом (**genOME**) клетки или
организма

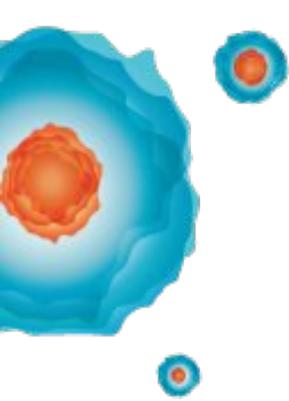
Keith Williams, 1994



Задачи и функции протеомики

Характеристика и анализ совокупности белков (протеома) клетки, ткани, организма. Изучение структуры белков, их функций, количества и взаимодействий друг с другом

- Белки выполняют почти все биологические функции
- Белок-белковые взаимодействия – основа большинства клеточных процессов
- Фармацевтические препараты, такие как инсулин, гормон роста, КСФ и эритропоэтин, ферменты и рецепторы, биомаркеры (тропонин, ПСА и др.) - белки



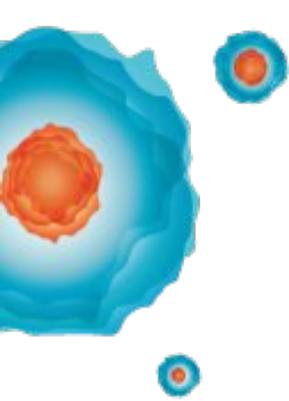
Что изучает протеомика?

Системная биология – понимание клеточных путей, комплексных белковых взаимодействий

Биологические процессы – характеристика субпротеомов, белков органелл и других белковых комплексов

Биомаркеры – исследование заболеваний, диагностика, лечение, терапия

Таргетная терапия – оценка токсичности и других биологических и фармацевтических параметров, ассоциированных с действием лекарственных препаратов



Масштабы протеомики

Два направления – глобальная и таргетная протеомика

Глобальная – попытка проанализировать все белки клетки, ткани или организма

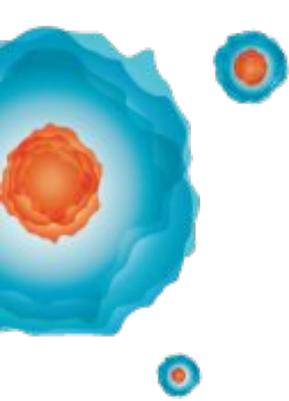
- для прокариот и дрожжей
- у высших эукариот анализируют небольшую часть белковых компонентов

Основная сложность – различия будут ВСЕГДА. Но главное – это заметить и интерпретировать биологически-значимые изменения

Таргетная – попытка охарактеризовать субпротеом, отвечая на четко поставленные вопросы

- клетки и ткани млекопитающих – на пределе аналитических возможностей
- органеллы, макромолекулярные комплексы и клеточные машины, у высших эукариот анализируют небольшую часть белковых компонентов
- группы/классы белков: фосфопротеины, гликопротеины, белки клеточной поверхности, протеазы

Основная сложность – выделение белков субпротеома, получение воспроизводимых результатов, очистка от специфических и неспецифических загрязнений

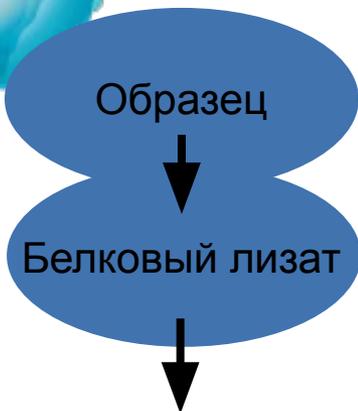


Виды исследований

Какие белки? Где? Когда? С чем?

- **Белковый состав** — идентификация всех компонентов макромолекулярного комплекса органеллы, клетки, организма
- **Белковое профилирование** — количественный анализ двух и более образцов
- **Субклеточная локализация/секреция** — изоляция субклеточных фракций и визуализация локализации с использованием антител или fusion-белков
- **Межбелковые взаимодействия**

2D-электрофорез: рабочий процесс

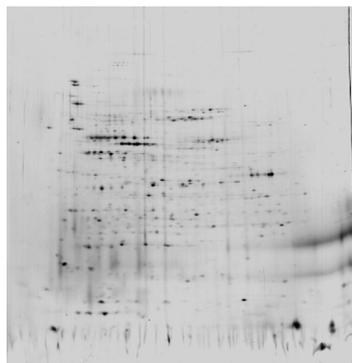


Пробоподготовка

- экстракция белков
- очистка
- префракционирование

2D-гель-электрофорез

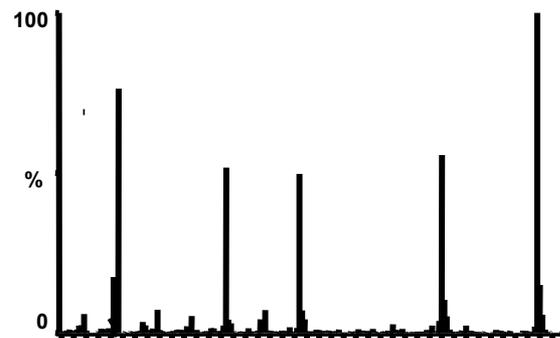
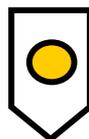
- ИЭФ
- СДС-ПААГ
- окрашивание



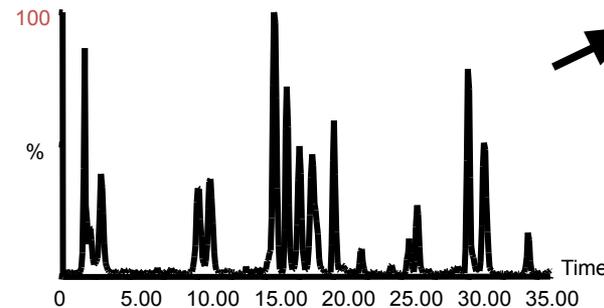
Визуализация

- получение изображения
- анализ изображения

Вырезание пятен



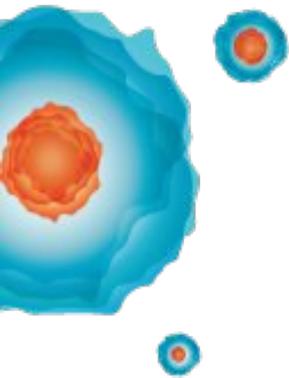
MALDI



LC-MS/MS

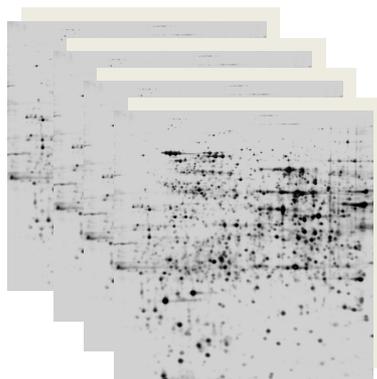
- выделение образца
- MS-подготовка

Библиотеки данных

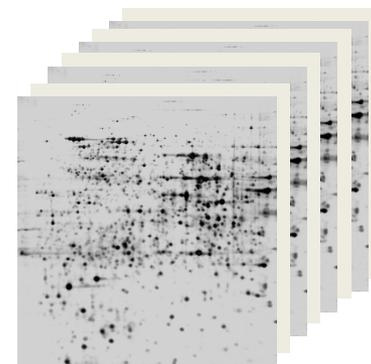


Классический дифференциальный 2D-электрофорез

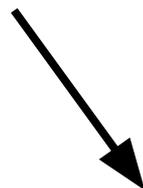
Контроль



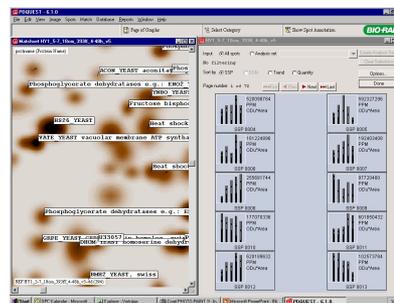
Образец



~3 повтора
для каждого
образца

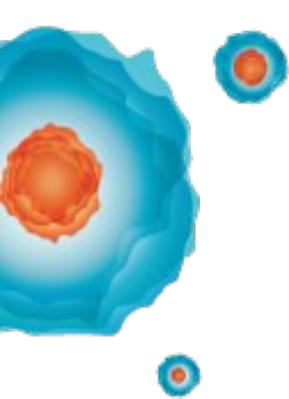


Сравнение



Статистическая обработка

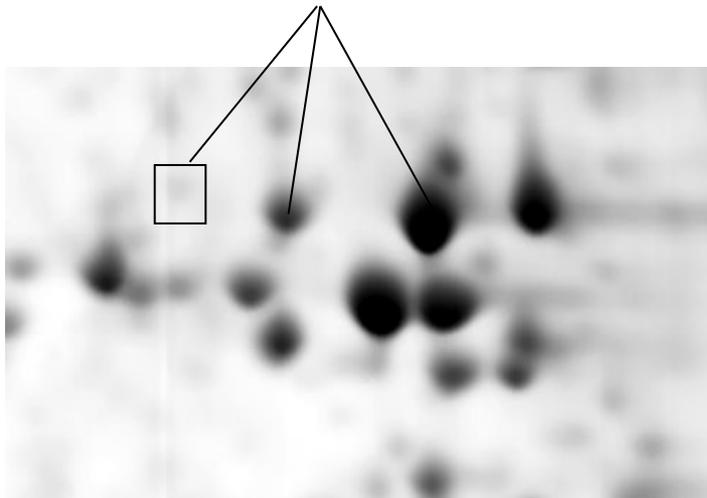
2D карта



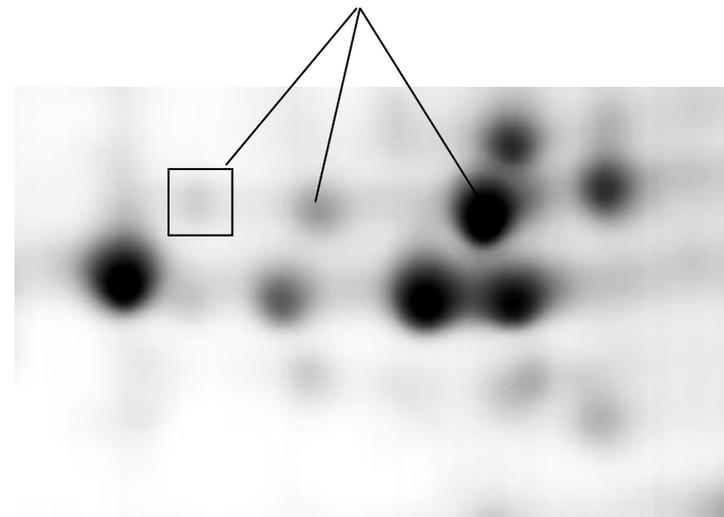
Белки мозга человека

Различия в уровне экспрессии фосфоглицератмутаза в таламусе

Контроль



Болезнь Альцгеймера

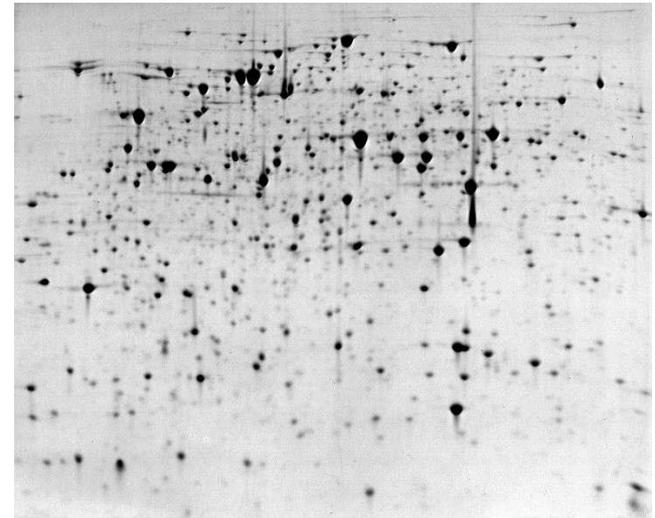


Вклад пробоподготовки образцов

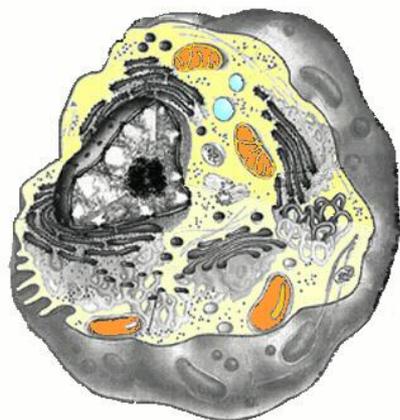
- Хороший образец
- Подготовка

=

Отличный 2D гель



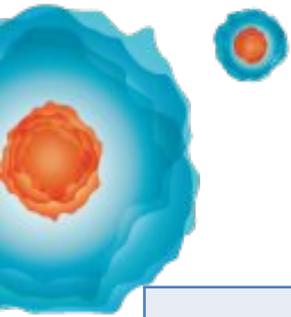
Этапы пробоподготовки образцов



- Разрушение клеток/лизис
- Солюбилизация
- Очистка образцов
- Фракционирование

1D (IEF)

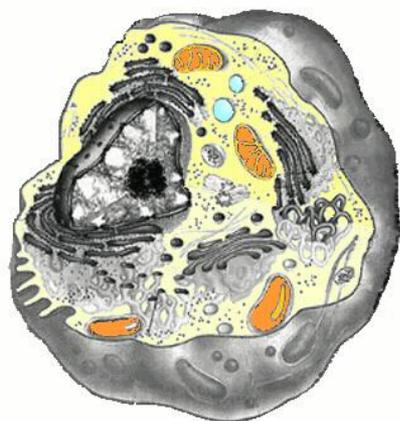
NB! Порядок может быть иной. Некоторые из этапов могут отсутствовать или наоборот – повторяться, например, очистка образцов.



Методы лизиса клеток

Метод ↓	Бактерии	Дрожжи водоросли грибы	Семена	Растения	Мягкие ткани	Клетки млекопитающих
Осмотический лизис	—	—	—	—	—	•
Замораживание-оттаивание	—	—	—	—	—	•
Лизис детергентом	•	—	—	—	—	•
Энзиматический лизис	•	•	—	•	—	—
Сонификация	•	•	—	—	—	•
Французский пресс	•	—	—	•	—	•
Измельчение	•	•	•	•	•	•
Блендер	—	—	—	•	•	—
Лизис шариками	•	•	•	—	—	•

Этапы пробоподготовки образцов

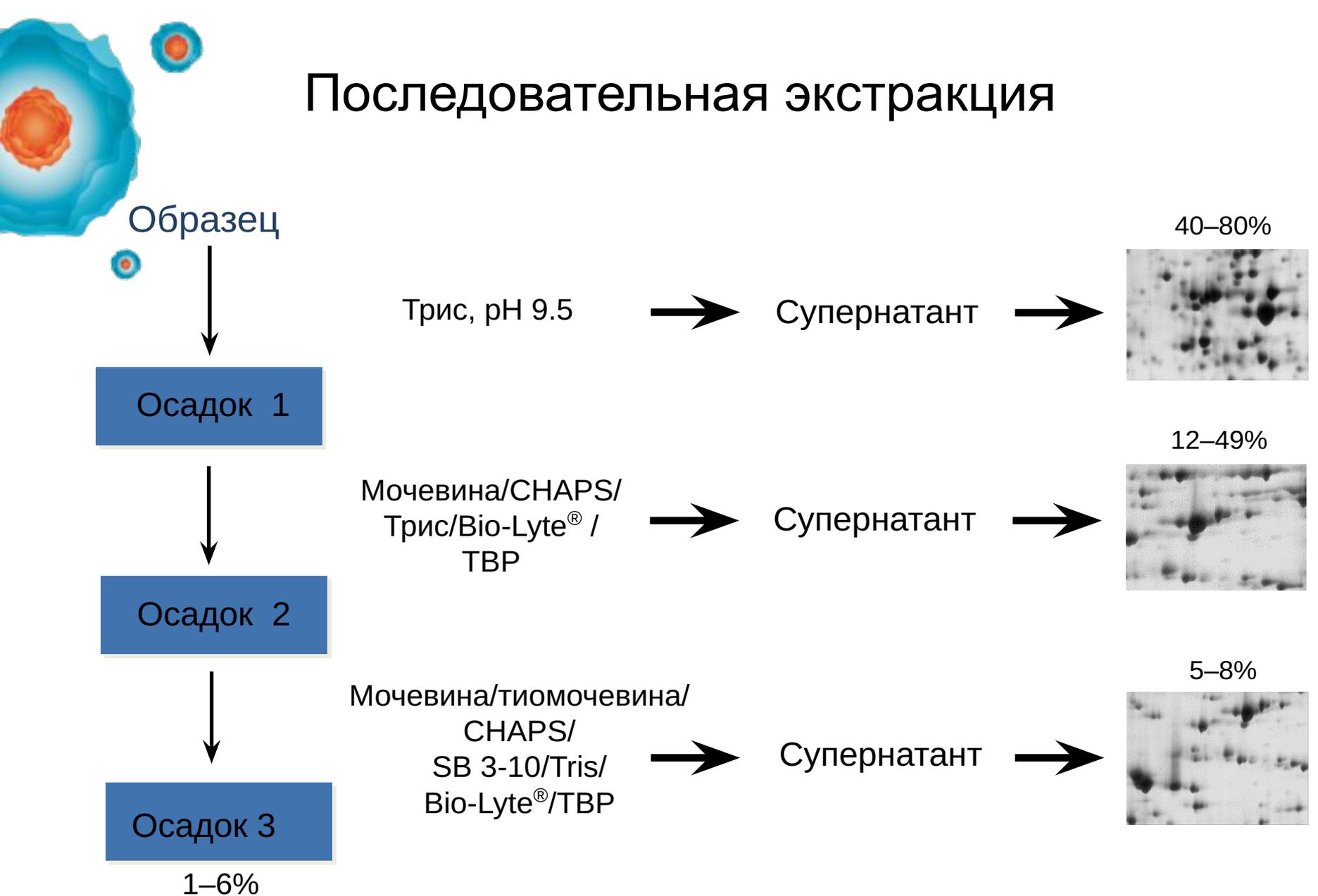


- Разрушение клеток/лизис
- Солюбилизация
- Очистка образцов
- Фракционирование

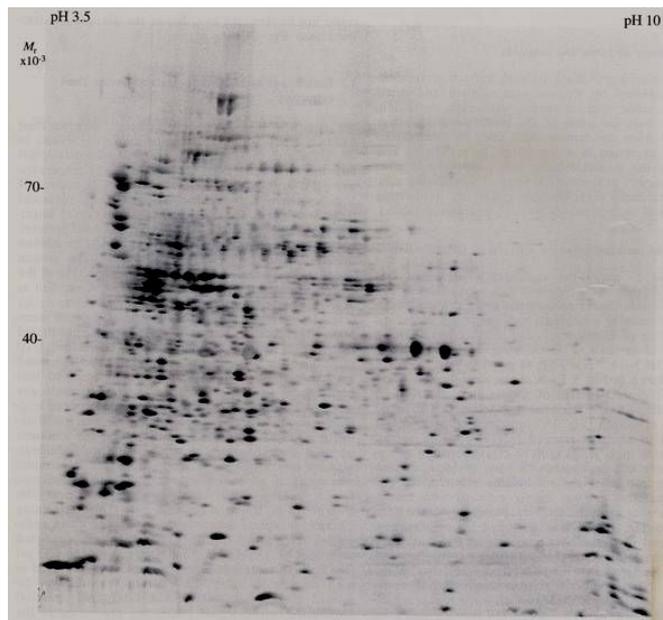
1D (IEF)

NB! Порядок может быть иной. Некоторые из этапов могут отсутствовать или наоборот – повторяться, например, очистка образцов.

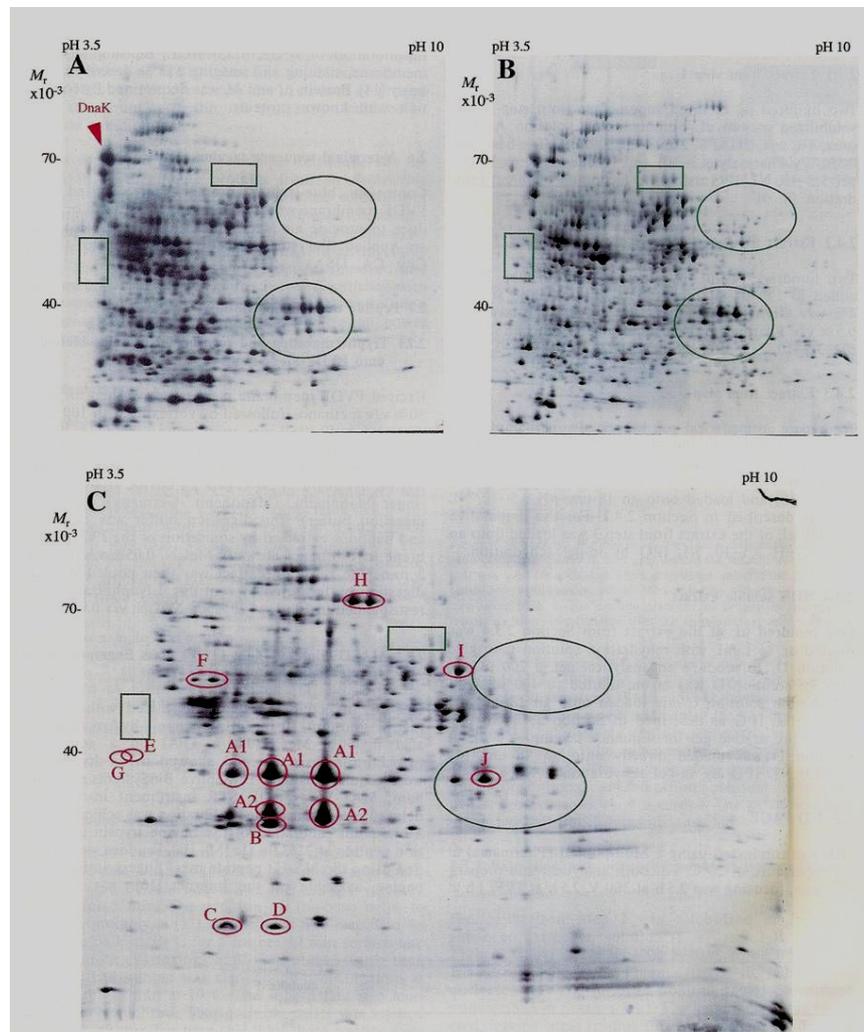
Последовательная экстракция



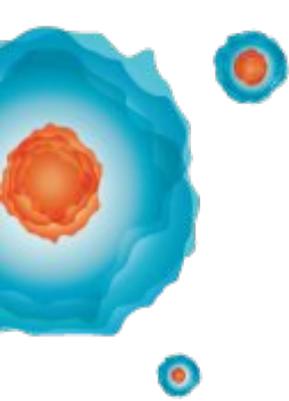
Последовательная экстракция



E. coli (весь лизат)



На каждом геле - 200 мкг лизата *E. coli*. Есть уникальные белки, а также некоторые совпадения



Компоненты солюбилизирующего буфера для 2D

Хаотропные/денатурирующие агенты: 9M мочеви́на или 7M мочеви́на/2M тиомочеви́на

Детергенты: 2-4% CHAPS (1% ASB-14; 2% SB 3-10)

Редуцирующий агент: 50 мМ ДТТ или 2 мМ трибутилфосфин (TBP)

Амфолиты: 2% (v/v), pH 3-10

Ингибиторы протеаз

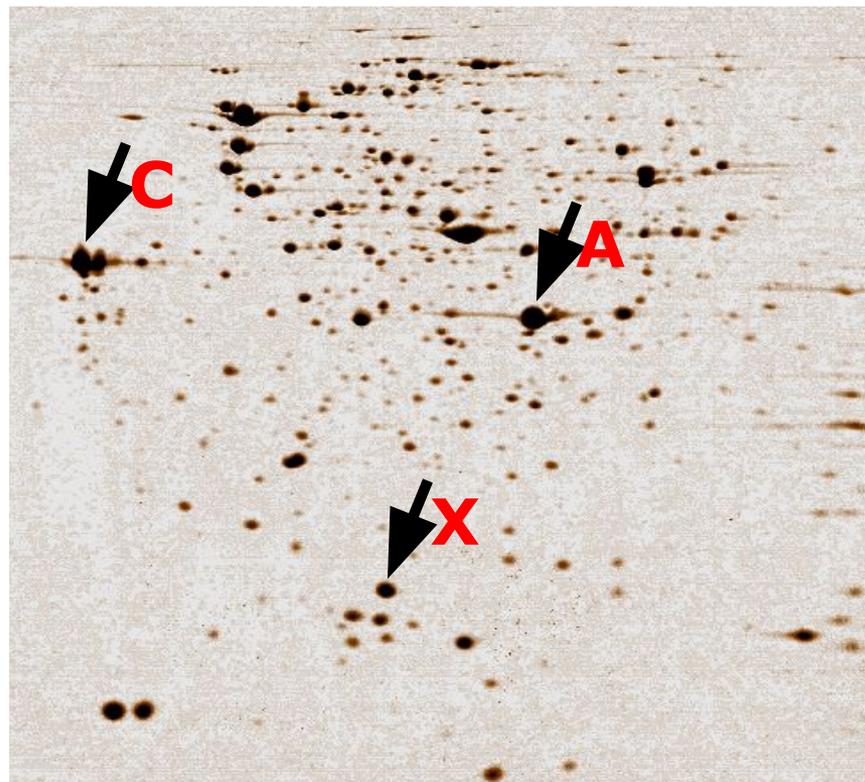
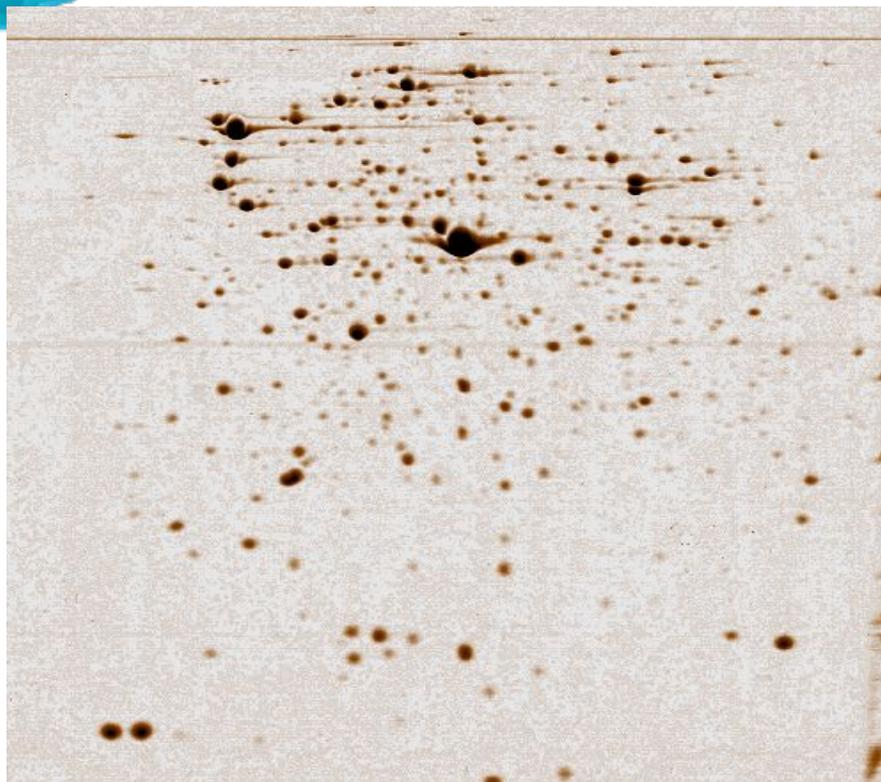
NB! Для двумерного электрофореза концентрация белка в образце должна быть порядка 1-5 мг/мл



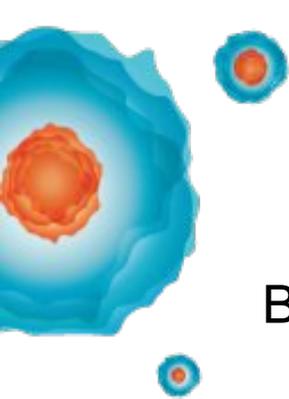
Солубилизирующая сила тиомочевины

9M мочевина

7M мочевина, 2M тиомочевина



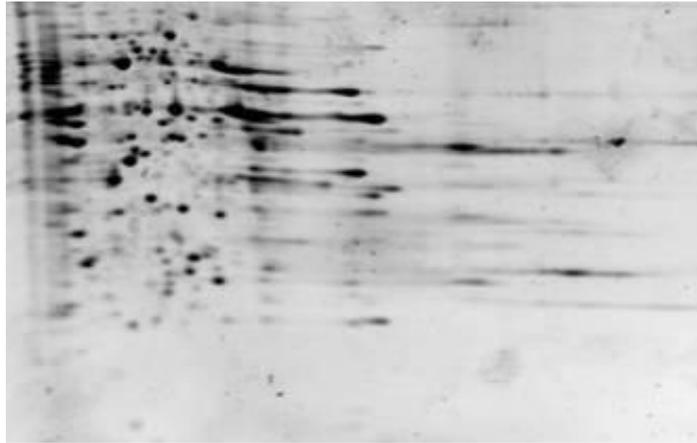
E. coli; pH 4-7 IPG; стрелками показаны мембранные белки (OMP)



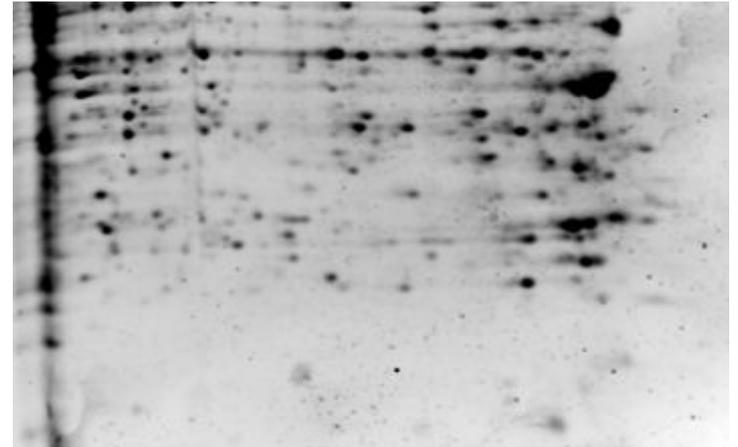
Альтернативы ДТТ

Восстановление и алкилирование образцов до ИЭФ улучшает 2D результаты, особенно для основных белков

pH 3 Неалкилированный (ДТТ) pH 10



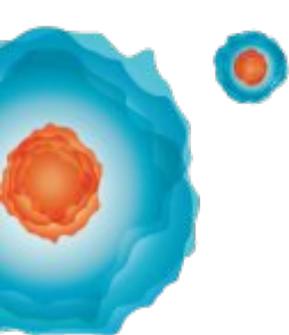
pH 7 Алкилированный pH 10



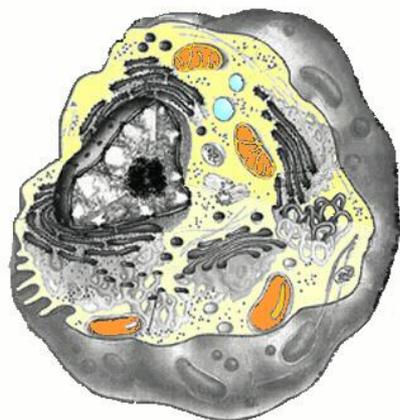
TBP – редуцирующий агент, йодацетамид – алкилирующий*

Ben Herbert, Pier G. Righetti et al., Electrophoresis 2001, 22, 2046-57

*The ReadyPrep Reduction-Alkylation kit



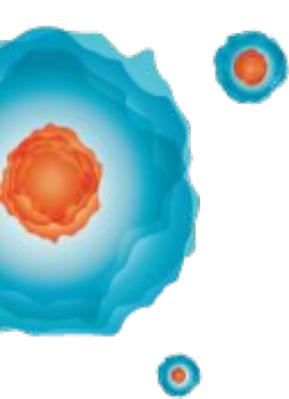
Этапы пробоподготовки образцов



- Разрушение клеток/лизис
- Солюбилизация
- Очистка образцов
- Фракционирование

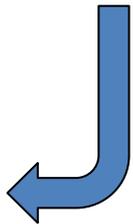
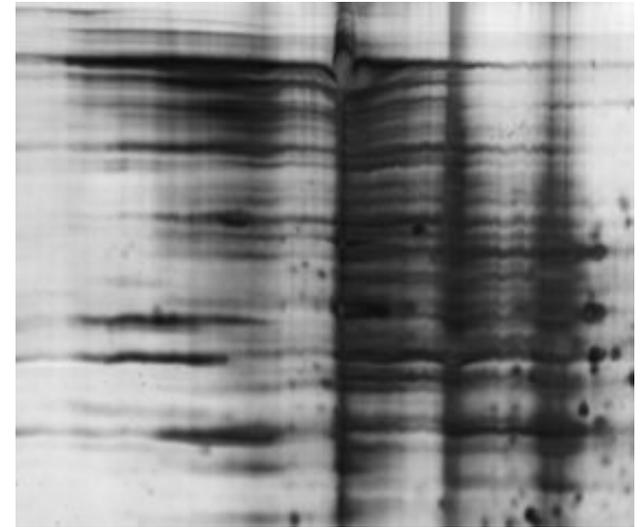
1D (IEF)

NB! Порядок может быть иной. Некоторые из этапов могут отсутствовать или наоборот – повторяться, например, очистка образцов.

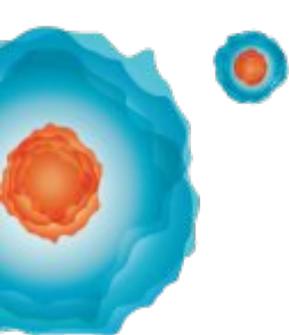


Что ещё влияет на результат?

- Соли
- Буферы
- Ионные детергенты (СДС)
- Нуклеиновые кислоты, липиды и полисахариды
- Полифенолы



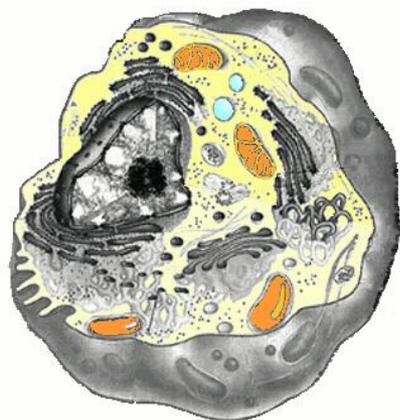
необходимо очистить образец!



Варианты очистки образцов

- Преципитация
 - ReadyPrep Cleanup kit
 - SureBeads
- Гель-фильтрация
 - Bio-Gel spin columns
- Диализ
- Ультрафильтрация

Этапы пробоподготовки образцов

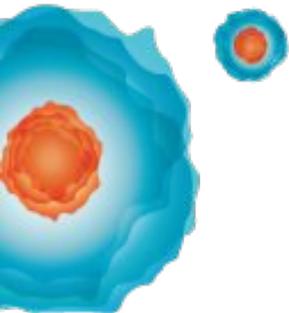


- Разрушение клеток/лизис
- Солюбилизация
- Очистка образцов
- Фракционирование

1D (IEF)

NB! Порядок может быть иной. Некоторые из этапов могут отсутствовать или наоборот – повторяться, например, очистка образцов.

Основные методы фракционирования



Используется при солюбилизации

Фракционирование химическими агентами

например, последовательная или специфическая экстракция различными буферами

Фракционирование хроматографией

ионообменная, аффинная и другие

Фракционирование электрофорезом

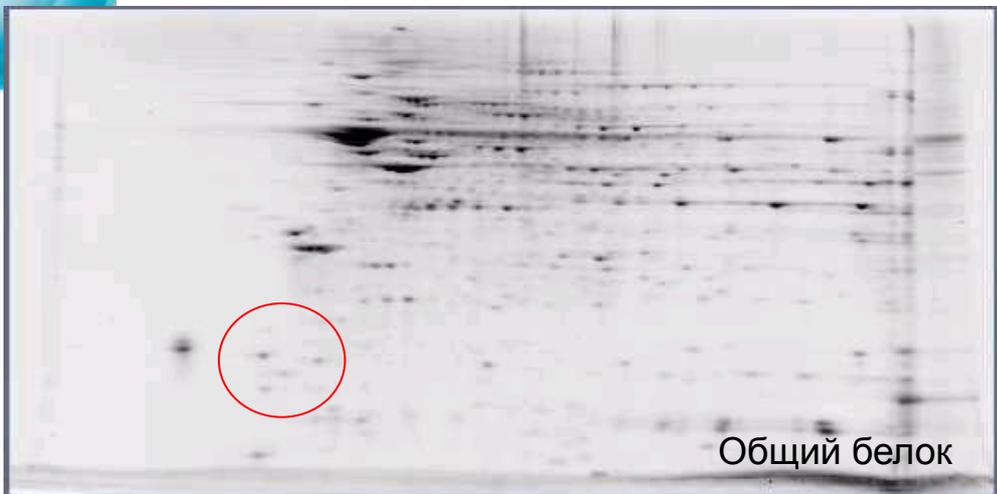
по ИЭТ, Mw

Фракционирование/обогащение с ProteoMiner

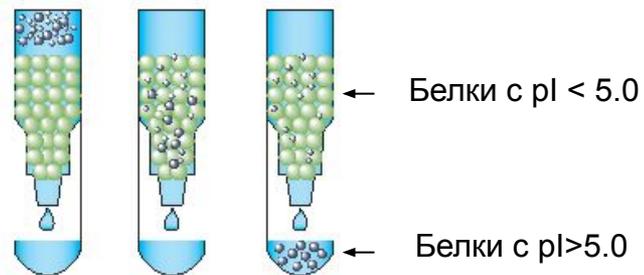
белков

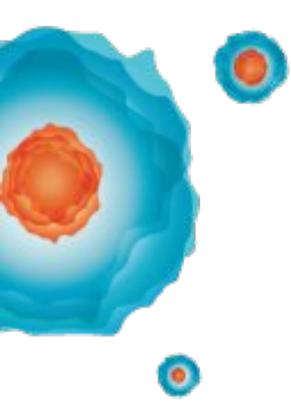


Фракционирование ионообменной хроматографией



Aurum™ Bio-Spin® AEX or CEX mini columns



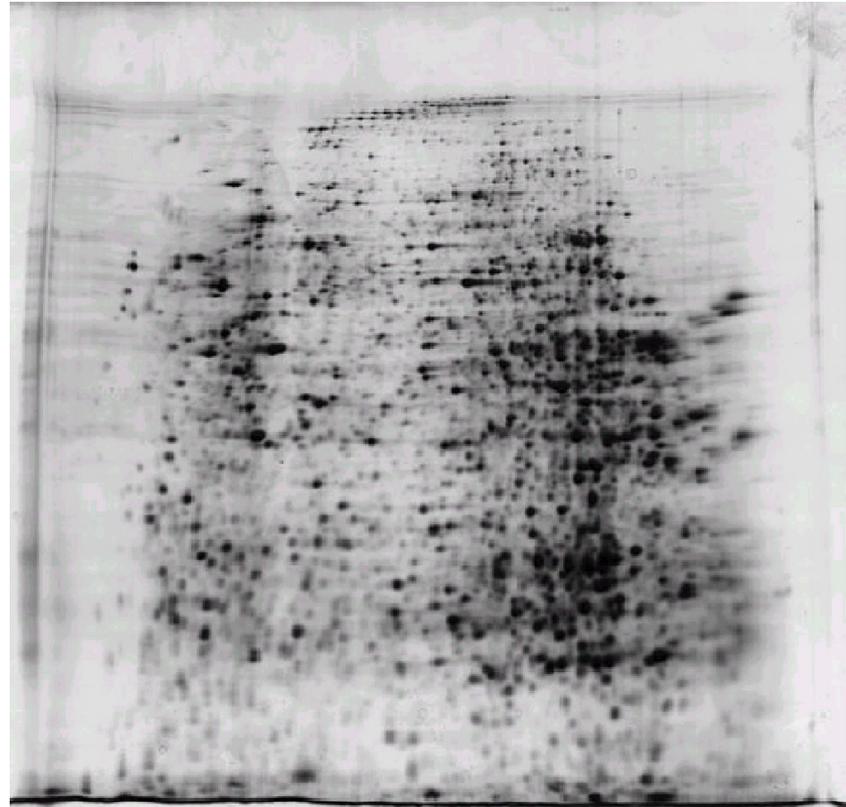


2D электрофорез: 1-й и 2-й этап разделения

Что такое 2D-электрофорез?

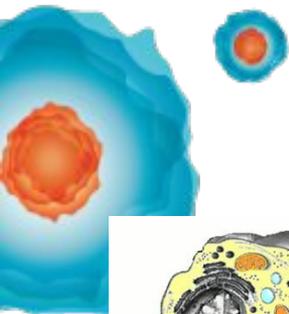
2D-электрофорез – это метод разделения тысячи белковых компонентов в одном геле.

Это многоступенчатая техника, основанная на разделении белков в двух измерениях, основанный на таких свойствах белков, как изоэлектрическая точка (ИЭТ) и молекулярная масса.



Образец печени крысы, рН 3-10NL
Окрашивание серебром

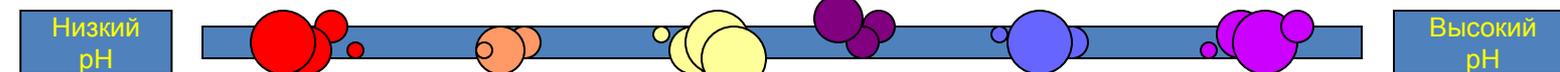
Как протекает 2D-электрофорез?



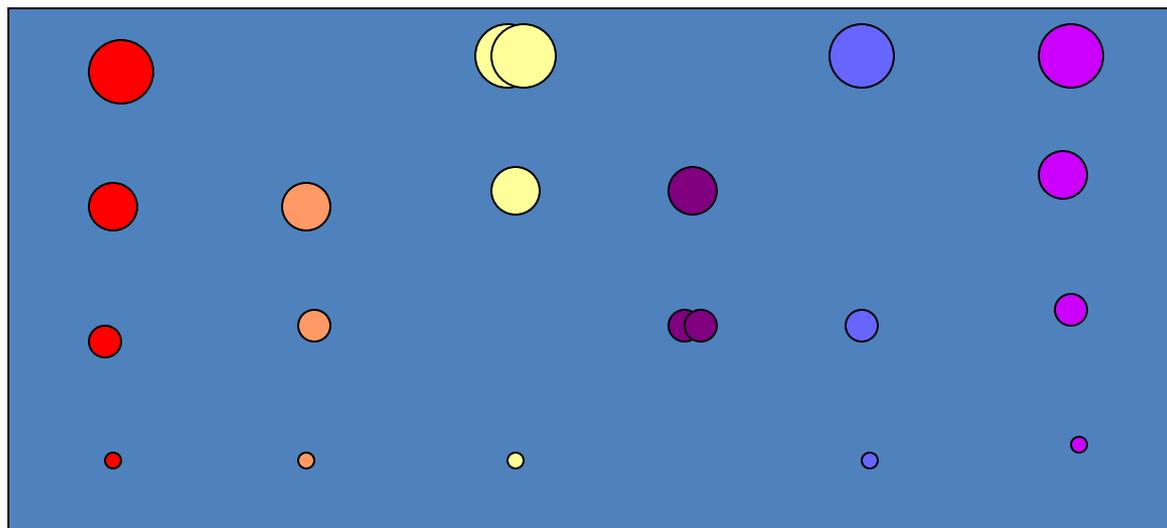
Пробоподготовка



1-й этап разделения:
изоэлектрофокусирование (ИЭФ)



Большие
MW



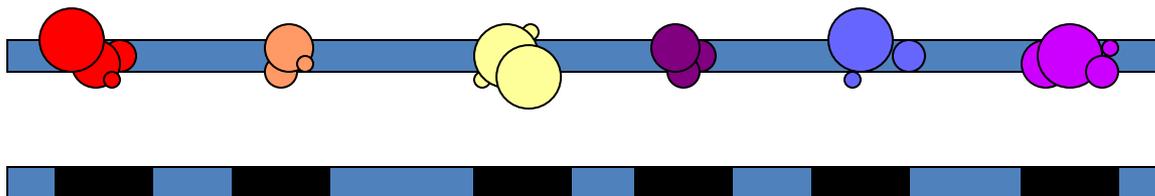
Малые
MW

2-й этап
разделения:
СДС-ПААГ

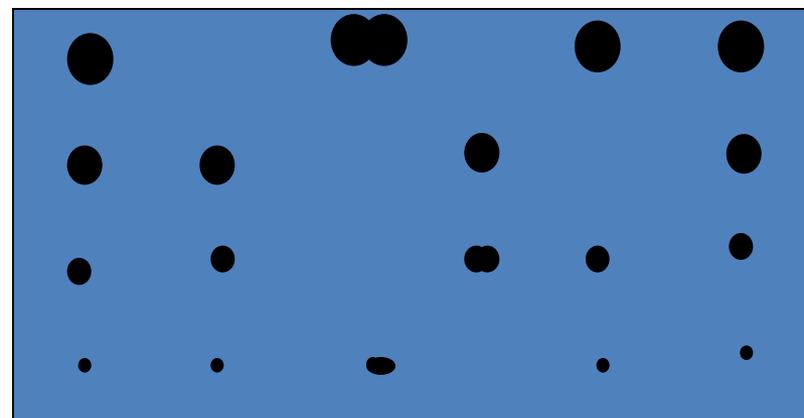
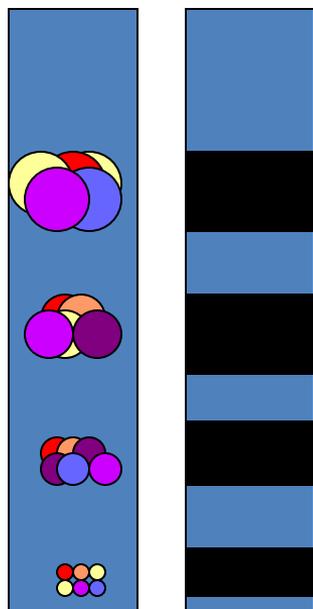
В чем преимущества 2D-электрофореза?



Только ИЭФ,
6 полос



Только СДС-
ПААГ,
4 полосы



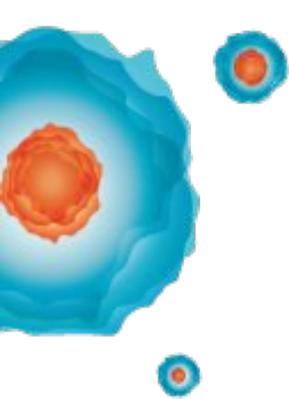
2D-электрофорез,
21 пятно



Почему многие выбирают 2D-электрофорез?

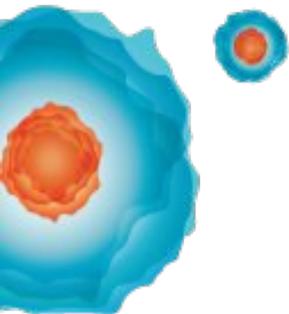
Чтобы визуализировать комплекс белков для:

- Профилирования белков
 - Сравнение образцов с контролями
 - Открытие биомаркеров
 - Мониторинг различных процессов
 - Посттрансляционные модификации
- Идентификации белков
 - Вырезание пятен, масс-спектрометрия
 - Вестерн-блоттинг, детекция антителами



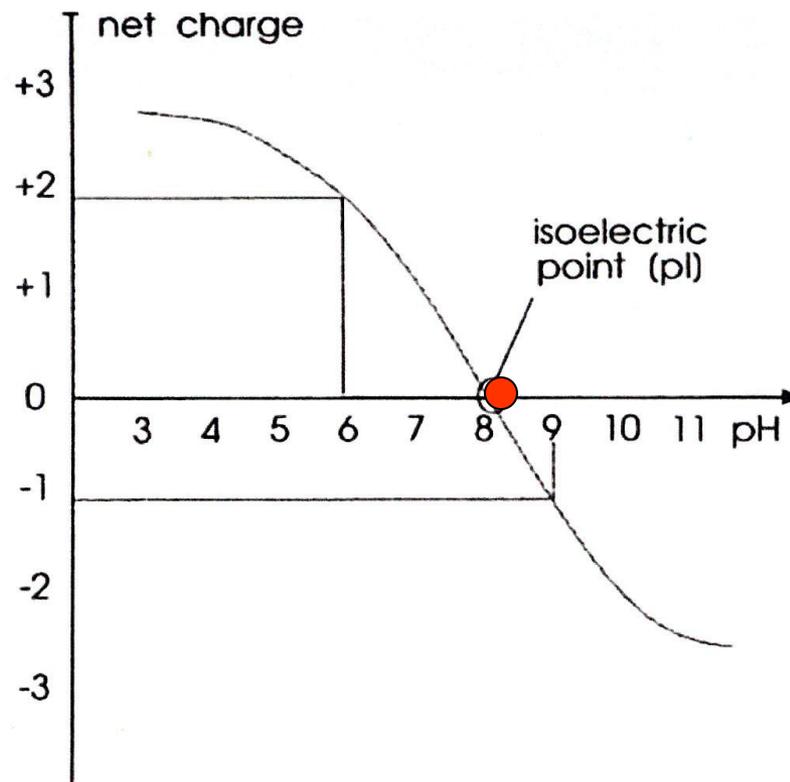
Этапы 2D-электрофореза

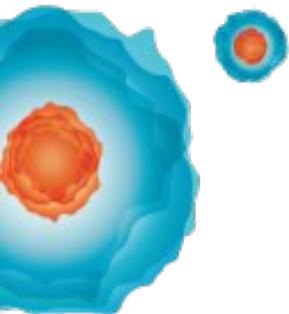




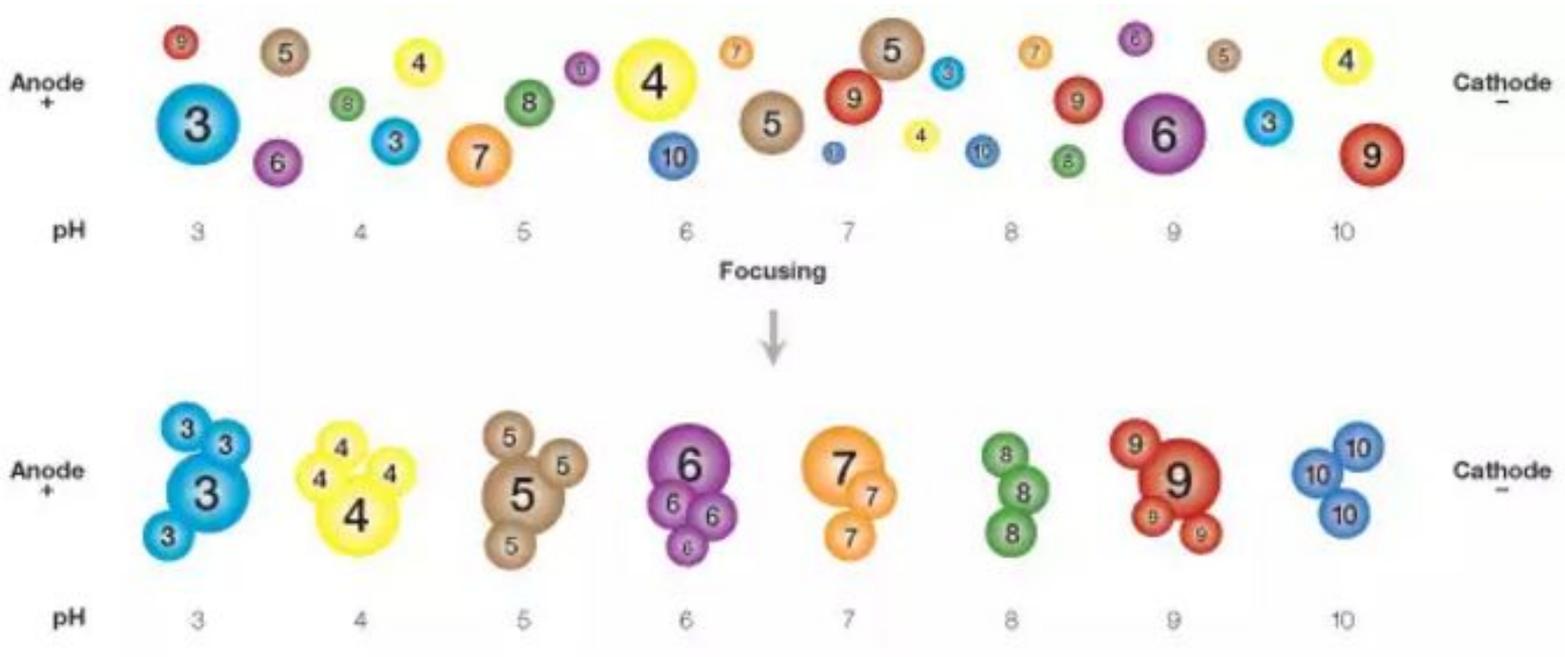
1-й этап разделения. Что такое ИЭТ?

- Белки амфотерны: они содержат позитивно- и негативно заряженные группы
- Заряд определяется аминокислотным составом и рН среды
- Для каждого белка есть уникальный рН, при котором общий заряд равен нулю. Это ИЭТ или pI
- ИЭФ – это электрофорез в градиенте рН. Заряженные белки двигаются в электрическом поле, пока общий заряд не станет равным нулю

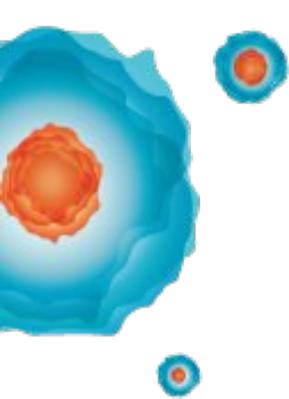




1-й этап разделения. Что такое ИЭТ?



Белки движутся в градиенте рН пока их общий заряд не станет равен нулю (ИЭТ).



Инструменты для ИЭФ

- Среда для ИЭФ: IPG стрипы

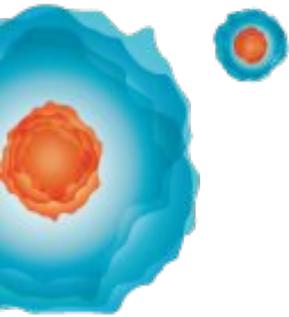


+3-10
+5-8
+4.7-5.0
DZ + 3-10

ReadyStrip IPG strips are preprinted to indicate anode end (+) and pH range; in addition, a bar code is printed on the 24 cm strip.

- Инструмент: ИЭФ ячейка





IPG стрипы

- Имеют иммобилизованный градиент pH
- Пластиковую подложку заполняют акриламидным гелем с градиентом pH, нарезают стрипы и дегидратируют
- pH градиенты формируются акриламидными буферами, содержащими реакционноспособные двойные связи и буферные группы
- Градиент pH фиксирован и не меняется в процессе
- IPG стрипы – это высокая степень воспроизводимости и простота в обращении

IPG стрипы

IPG стрипы доступны с различным градиентом pH и длиной

ReadyStrip™ IPG strips

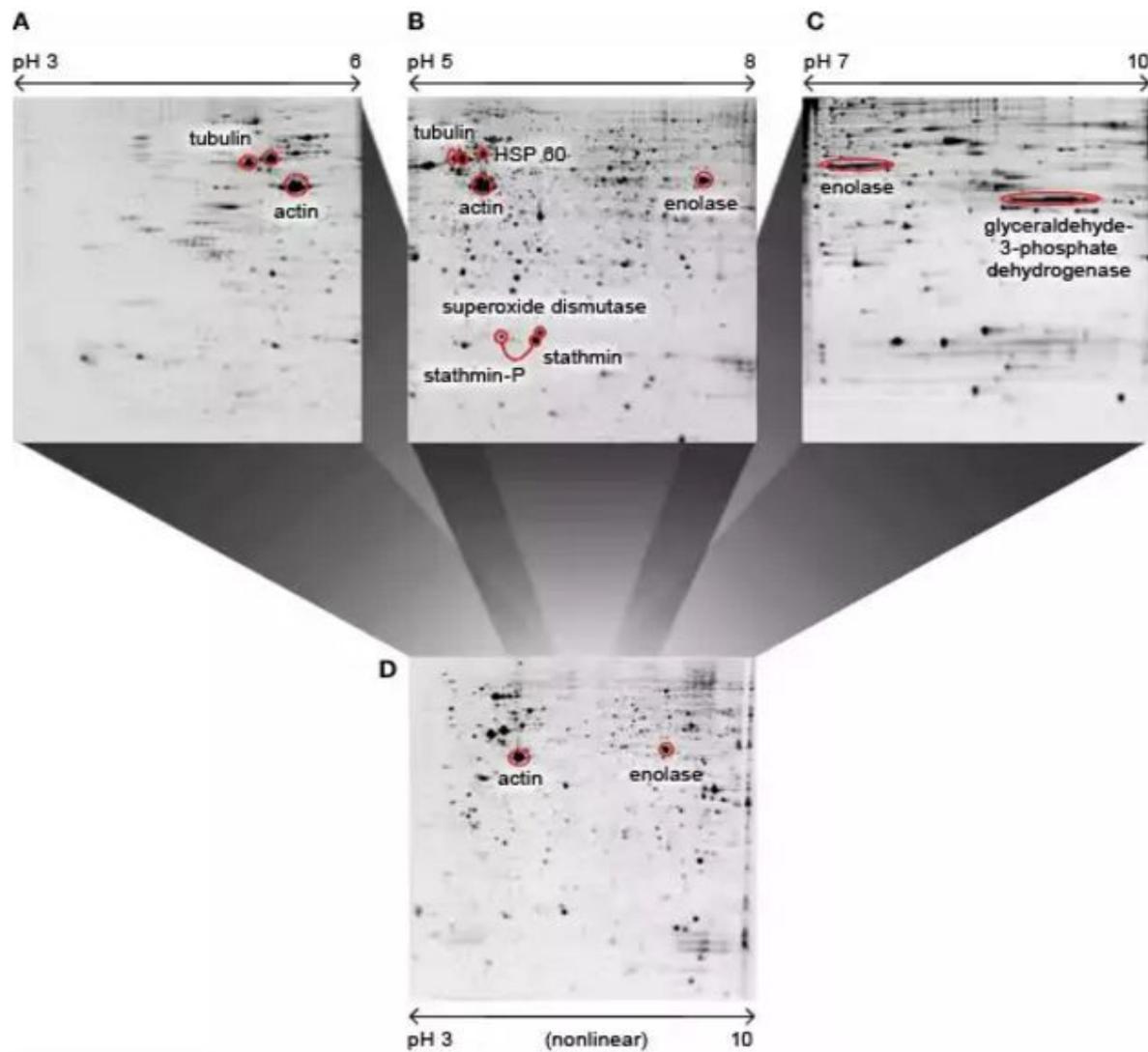


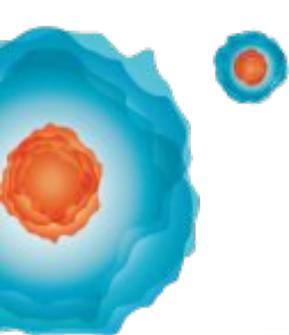
+3-10
+5-8
+4.7-5.9
DZ + 3-10

ReadyStrip IPG strips are preprinted to indicate anode end (+) and pH range; in addition, a bar code is printed on the 24 cm strip.

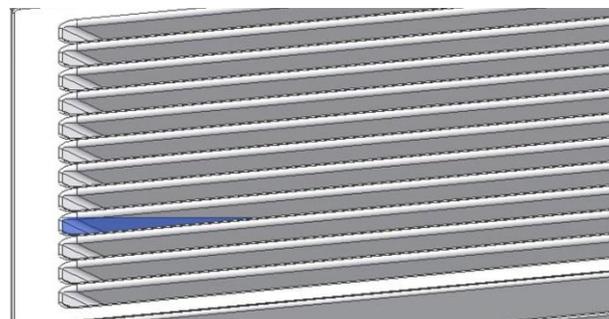
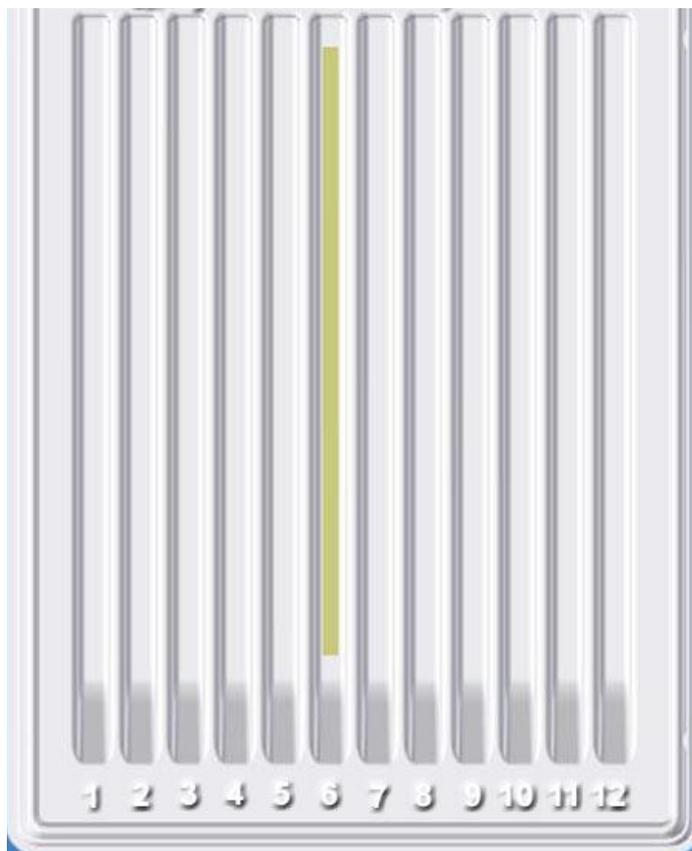
Strip Range*	pH							Relative Focusing Power					ReadyStrip IEF Buffer							
	3	4	5	6	7	8	9	10	7 cm	11 cm	17 cm	18 cm	24 cm	3-10	7-10	3.9-5.1	4.7-5.9	5.5-6.7	6.3-8.3	
Broad Range	[Green bars from pH 3 to 10]																			
3-10	[Green bars from pH 3 to 10]							1x	1.6x	2.4x	2.6x	3.4x	•							
3-10 nonlinear (NL)	[Green bars from pH 3 to 10]							1x	1.6x	2.4x	2.6x	3.4x	•							
Narrow Range	[Green bars from pH 3 to 10]																			
3-6	[Green bars from pH 3 to 6]							2.3x	3.7x	5.7x	6.0x	8.0x	•							
5-8	[Green bars from pH 5 to 8]							2.3x	3.7x	5.7x	6.0x	8.0x	•							
7-10	[Green bars from pH 7 to 10]							2.3x	3.7x	5.7x	6.0x	8.0x		•						
4-7	[Green bars from pH 4 to 7]							2.3x	3.7x	5.7x	6.0x	8.0x	•							
Micro Range	[Green bars from pH 3 to 10]																			
3.9-5.1	[Green bars from pH 3.9 to 5.1]							5.8x	9.2x	14.2x	15.0x	20.0x			•					
4.7-5.9	[Green bars from pH 4.7 to 5.9]							5.8x	9.2x	14.2x	15.0x	20.0x				•				
5.5-6.7	[Green bars from pH 5.5 to 6.7]							5.8x	9.2x	14.2x	15.0x	20.0x					•			
6.3-8.3	[Green bars from pH 6.3 to 8.3]							3.5x	5.5x	8.5x	9.0x	12.0x						•		

Выбор IPG стрипа





Первый этап ИЭФ: регидратация стрипа



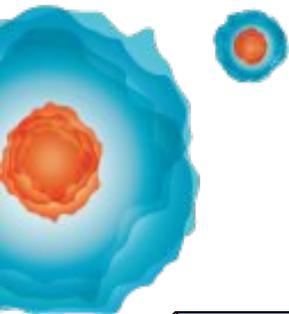
IPG стрипы поставляются в регидратированном виде на гибкой пластиковой подложке

Они должны быть регидратированы до их первоначального объема (толщина 0,5 мм, ширина 3,3 мм)

Регидратация может быть выполнена в трее для регидратации или в фокусировочном трее в ИЭФ ячейке

Буфер для регидратации образцов

Компонент	Задача
Мочевина	Хаотропный агент. Разрушает водородные связи, предотвращает агрегацию и образование вторичной структуры белков, помогает сольubilизировать образец
ДТТ	Редуцирующий агент. Предотвращает образование двойных связей; белки остаются в виде отдельных субъединиц
CHAPS	Детергент. Разрушает гидрофобные взаимодействия
Амфолиты	Помогает нейтрализовать соли в образце
Бромфеноловый синий	Мониторинг разделения



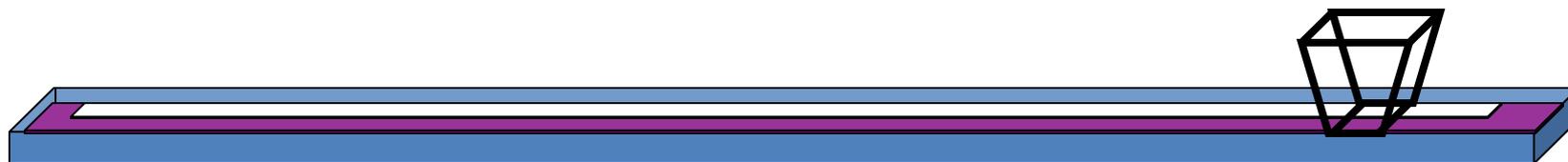
Регидратация IPG стрипов и нагрузка образцов



Пассивная регидратация: без напряжения, образец в буфере для регидратации



Активная регидратация: низкое напряжение, образец в буфере для регидратации



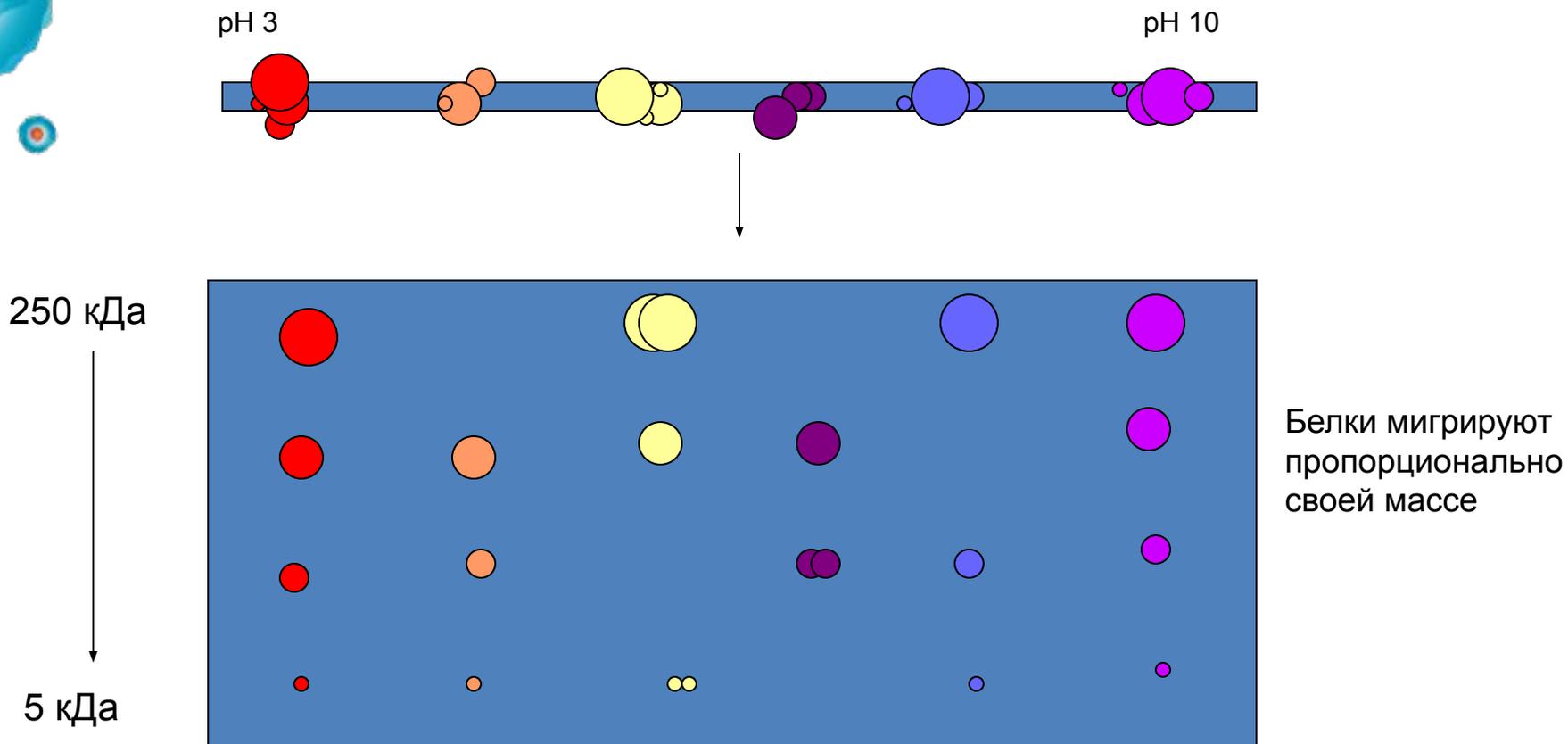
Загрузка с чашечками: низкое напряжение, образец в буфере загружается через чашечку



Регидратация IPG стрипов и нагрузка образцов: плюсы и минусы

Метод	Достоинства	Недостатки
Пассивная регидратация	<ul style="list-style-type: none">• Просто• Нет опасности осаждения образца• Время ИЭФ может быть короче, потому что белки уже в стрипе• Могут быть загружены большие количества белков• Трей для ИЭФ свободен для других задач	<ul style="list-style-type: none">• Большие белки могут не войти в стрип
Активная регидратация	<ul style="list-style-type: none">• Просто• Белки поступают в гель в результате абсорбции и под действием электрического поля• Нет опасности осаждения образца• Время ИЭФ может быть короче, потому что белки уже в стрипе• Могут быть загружены большие количества белков	<ul style="list-style-type: none">• Малые белки с высокой степенью мобильности склонны к диффузии и могут покинуть стрип
Загрузка чашечкой	<ul style="list-style-type: none">• Отличный вариант для образцов с высоким уровнем ДНК, РНК и др.• Для сыворотки нет необходимости удалять альбумин• Идеально для основных стрипов (например, pH 7-10)• Для образцов с высоким содержанием гликопротеинов	<ul style="list-style-type: none">• Может возникнуть преципитация образцов• Сложно. Чаша должна быть полностью герметична на поверхности регидратированного IPG стрипа• Сложно для высоких концентраций белков• IPG стрип регидратирован до нагрузки образцов

2-й этап 2D-электрофореза





Электрофорез

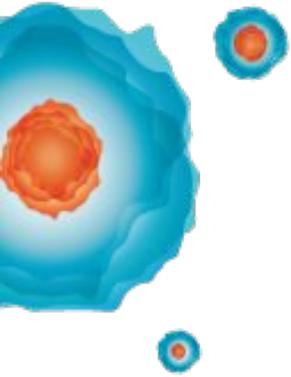
Электрофорез (от электро- и греч. φορέω — переносить) — электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых частиц) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые было открыто профессором Московского университета Ф. Ф. Рейссом в 1807 году.

- Электрофорез в свободных средах (без поддерживающей среды)
 - Электрофорез с подвижной границей (МВЕ)
 - Зональный электрофорез без поддерживающей среды
- Капиллярный электрофорез
 - Зональный электрофорез в поддерживающей среде с капиллярной структурой
 - Электрофорез на фильтровальной бумаге
 - Электрофорез белков на ацетат-целлюлозной мембране
 - Электрофорез в колонках и блоках гранулированной поддерживающей среды
 - Электрофорез белков в ПААГ
 - Электрофорез белков в крахмальном геле
 - Электрофорез белков в агарозном геле

Виды белкового электрофореза

<i>По сложности</i>	<i>По назначению</i>	<i>По состоянию молекул</i>	<i>По принципу разделения</i>
Одномерный	Препаративный	Нативный	Изоэлектрическое фокусирование
Двумерный	Аналитический	В денатурирующих условиях	Ихотахофорез
			Зональный электрофорез

История электрофореза



Ф.Ф. Рейсс, 1807

Движение коллоидных частиц в электрическом поле

A.Tizelius, 1937

«A New Apparatus for Electrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures»

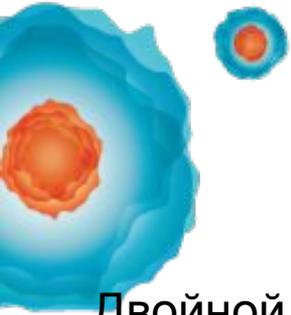
Oliver Smithies, 1955

Электрофорез в крахмальном геле

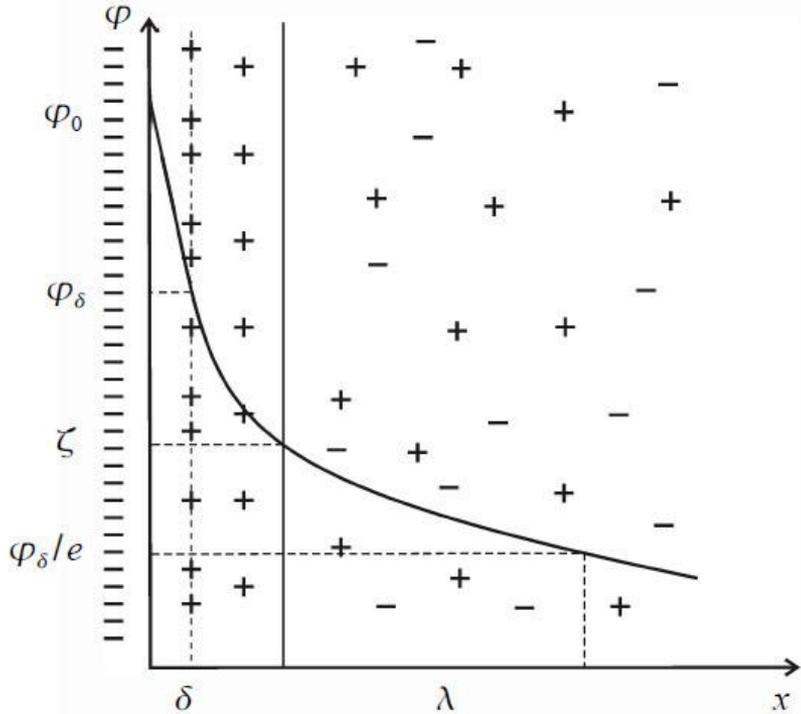


Arne Tizelius

Теория электрофореза



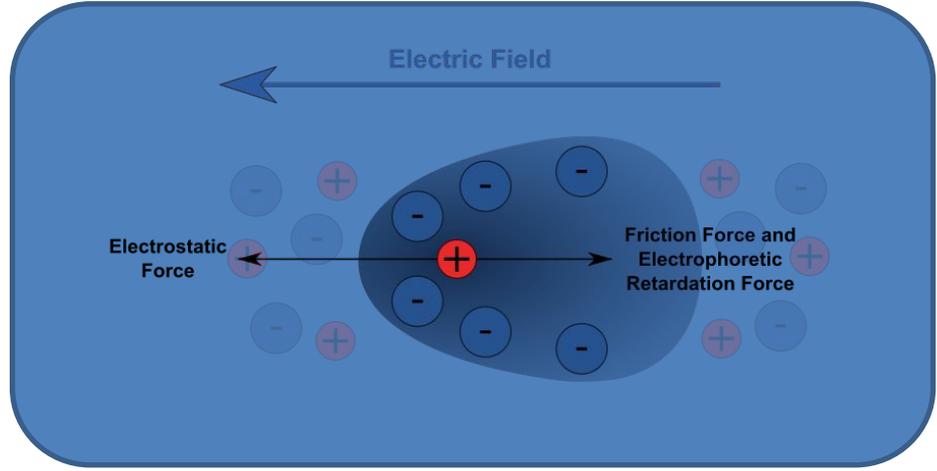
Двойной электрический слой (ДЭС)



Характеристические потенциалы ДЭС:

- потенциал диффузного слоя
- дзета-потенциал

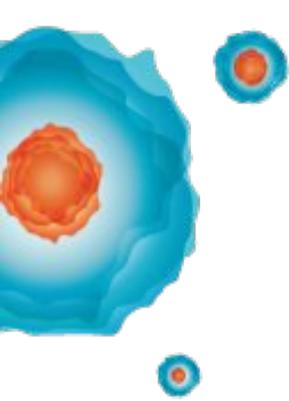
Движение частицы в электрическом поле



Строение ДЭС:

- Слой Гельмгольца (*адсорбционный*)
- Слой Гуи (*диффузный*)

$$F = F_{el} + F_f + F_{ret} = 0$$



Виды электрофореза

Зональный электрофорез

Гомогенная буферная система

Изотахорофорез

Негомогенная буферная система

Изоэлектрическое фокусирование

Градиентная буферная система



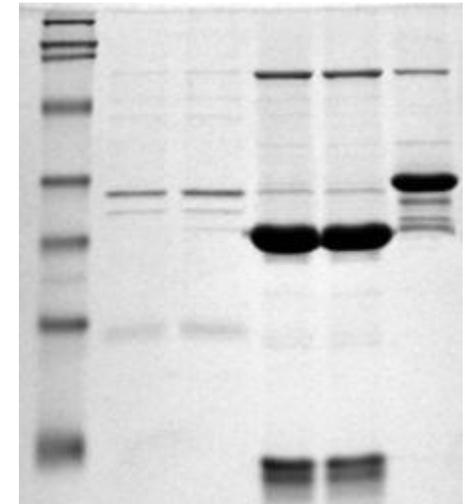
SDS-PAGE

Лэмбли,

изучение процесса сборки капсида
1970
бактериофага T4

Электрофорез белков в полиакриламидном геле — метод разделения смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их *электрофоретической подвижностью* (функцией длины полипептидной цепочки или *молекулярной массы*, а также *укладки* белковой молекулы, *посттрансляционных модификаций* и других факторов).

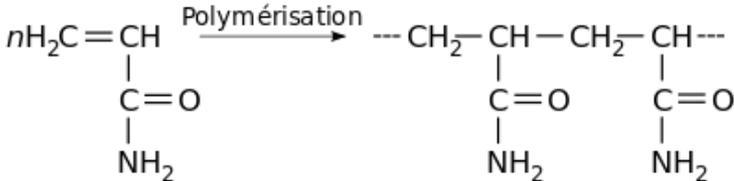
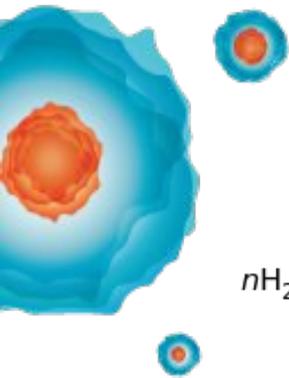
- обработка додецилсульфатом натрия – разворачивание молекулы
- обработка 2-меркаптоэтанолом – восстановление дисульфидных связей
- ✓ белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;
- ✓ количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;
- ✓ собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS.



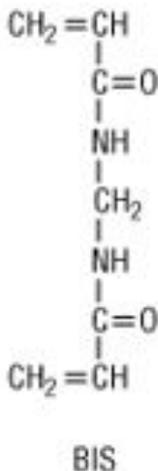
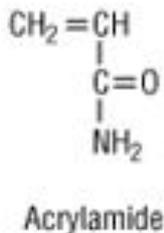
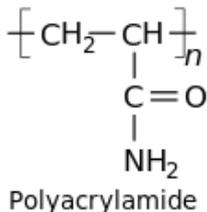
Решаемые задачи:

- определение молекулярной массы
- определение состава смеси белков
- определение чистоты ферментных/белковых препаратов
- препаративное выделение белка

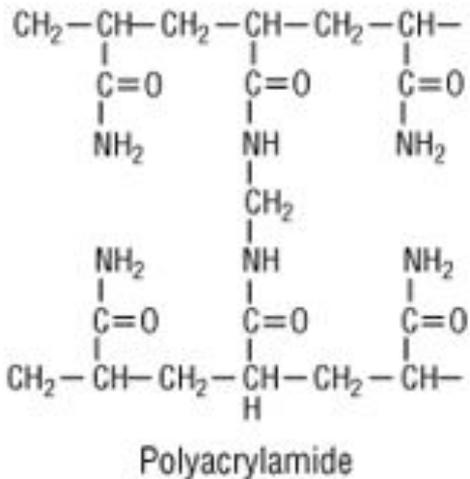
Структура геля (ПААГ)



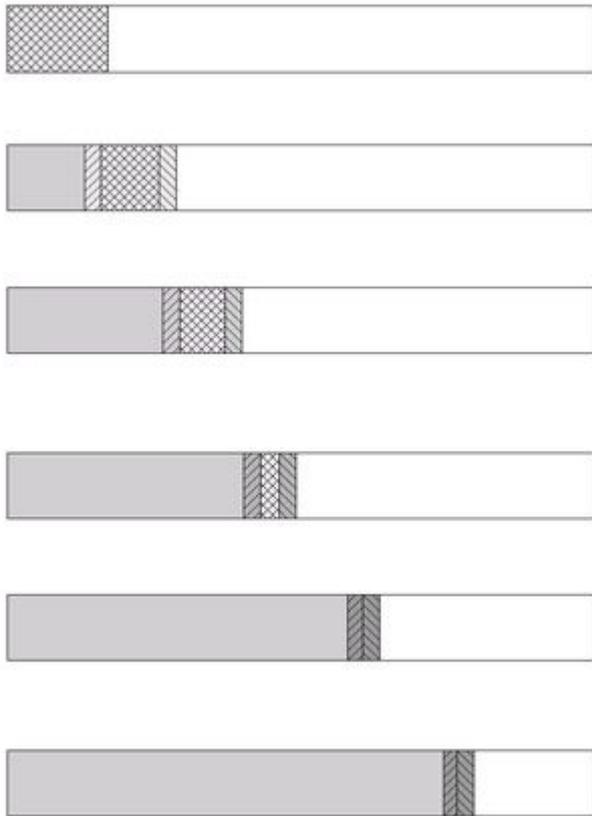
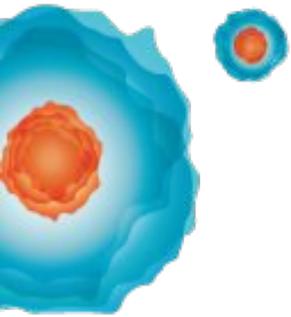
Acrylamide



Persulfate
→
TEMED



Изотахорофрез



Основные термины

Ведущий электролит

Замыкающий
электролит

Анализируемая смесь

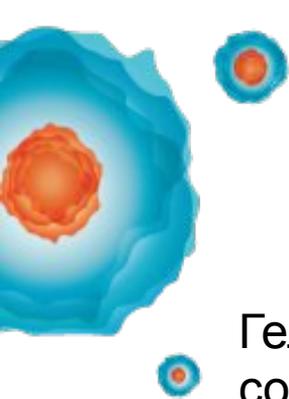
Электрофоретическая
подвижность

и разделение ионов

$$u_p = \mu_p E$$

$$\mu_p = \frac{z}{6\pi\eta r}$$

Диск-электрофорез



Гель, состоит из двух частей. Все буферы не содержат неорганических солей, основным переносчиком тока в них является глицин.

1. Концентрирующий гель имеет рН 6,5 и концентрацию полиакриламида около 4 %.

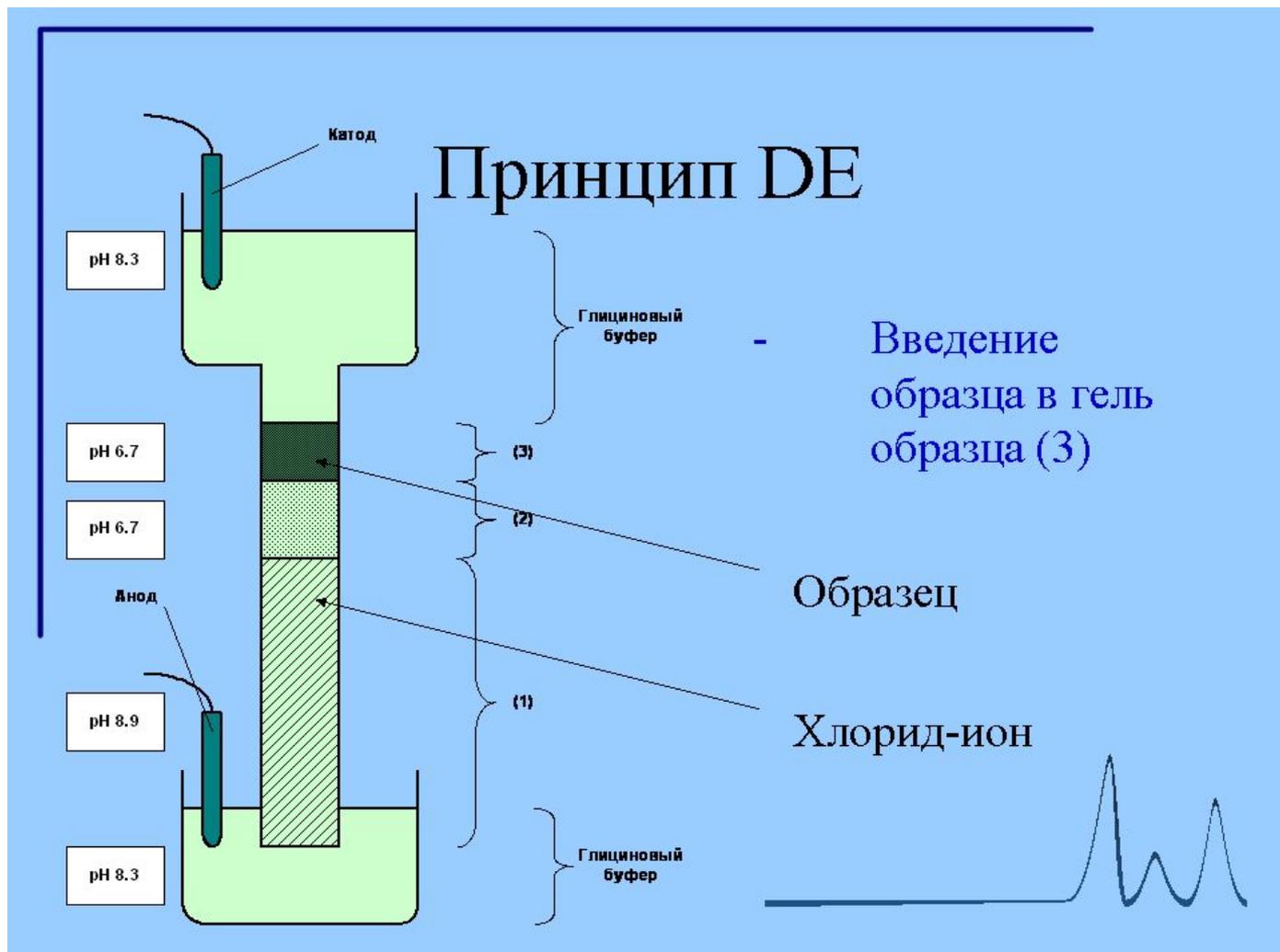
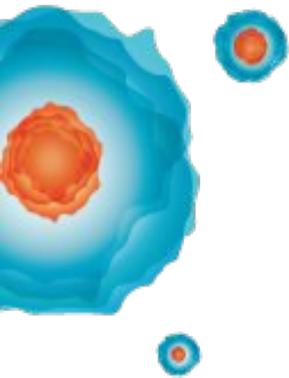
При рН 6,5 суммарный заряд молекулы глицина близок к нулю. Вследствие этого для переноса определенного заряда (который определяется силой тока в электрофоретической ячейке), отрицательно заряженные комплексы полипептидов с SDS должны двигаться с большой скоростью.

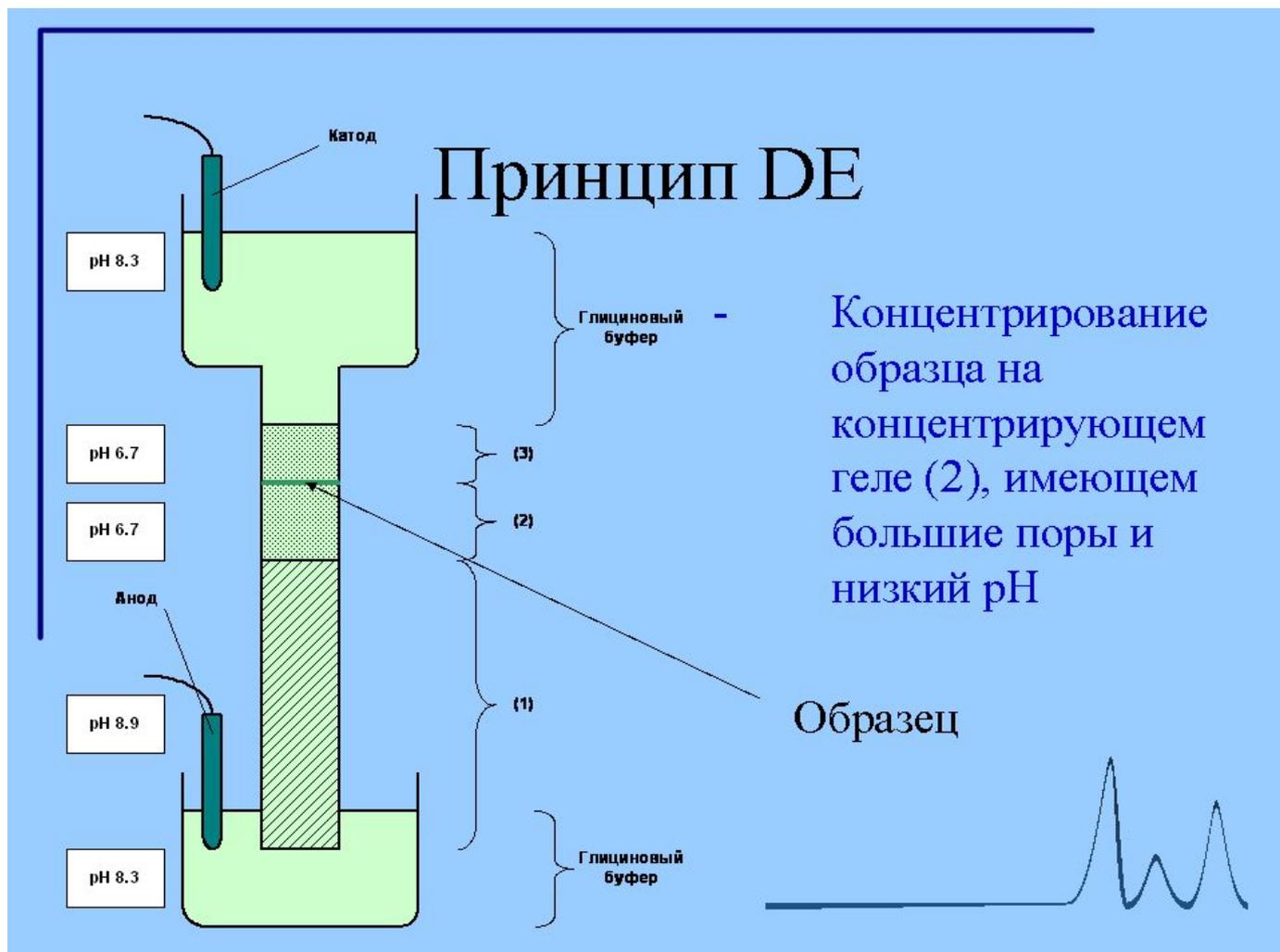
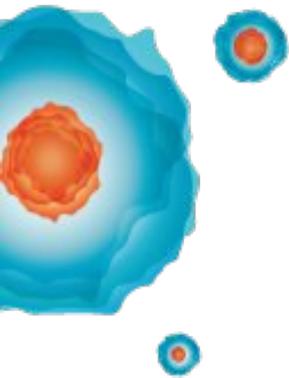
2. Разделяющий гель имеет рН в районе 8,5-9 и концентрацию полиакриламида 10-20 %.

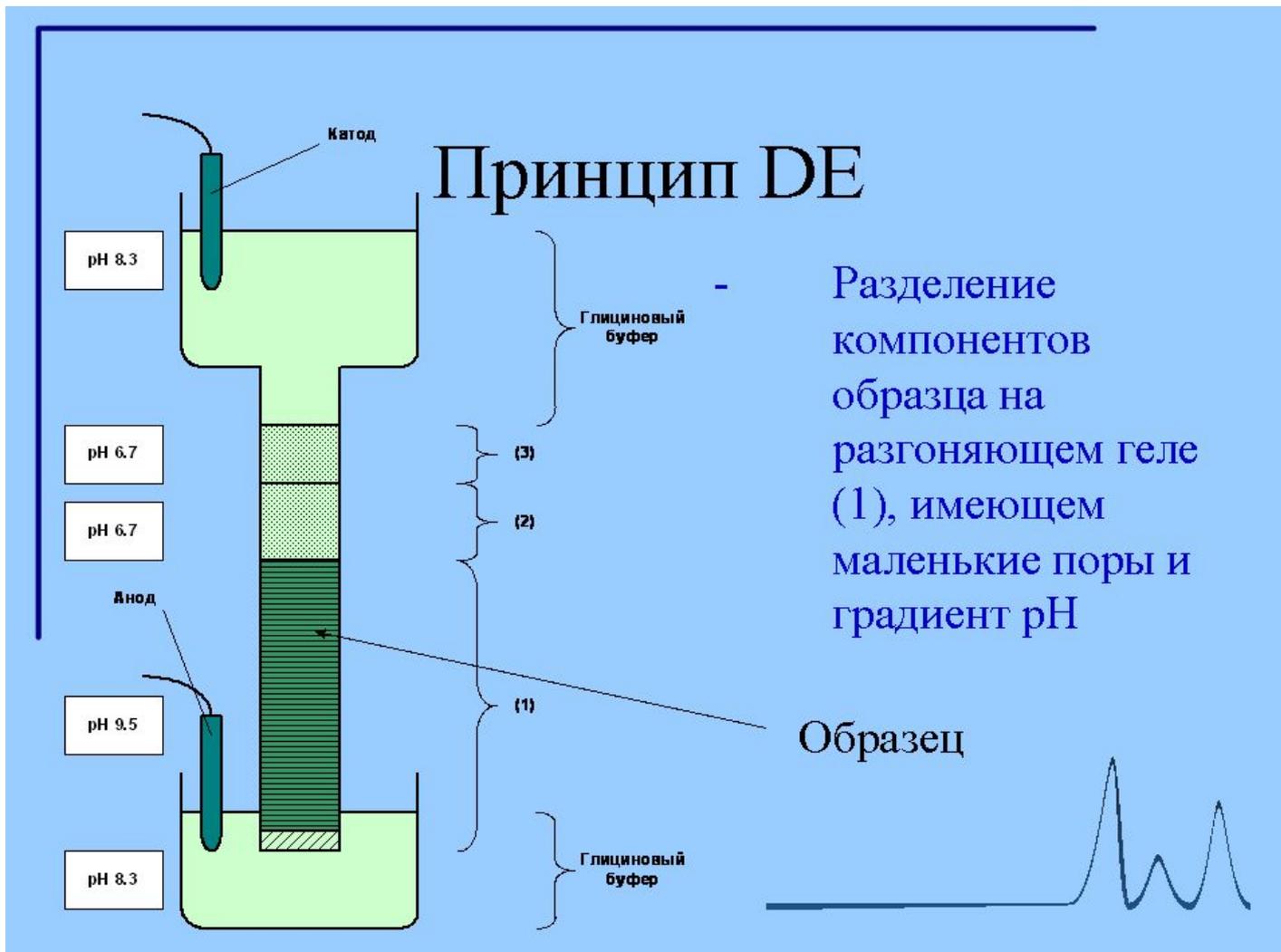
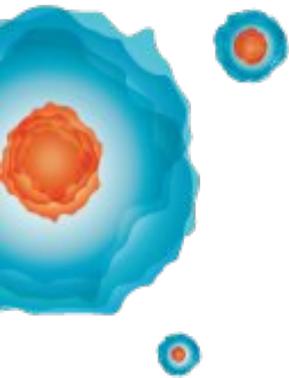
При рН 8,8 глицин приобретает отрицательный заряд, на границе концентрирующего и разделяющего гелей белки резко тормозятся (в переносе одинакового заряда через единицу площади теперь участвует гораздо больше заряженных молекул, следовательно, они двигаются с меньшей скоростью).

Концентрирование белков на границе гелей - повышает разрешающую способность метода.

В разделяющем геле белки мигрируют в зависимости от длины полипептидной цепи, то есть обратно пропорционально молекулярной массе.







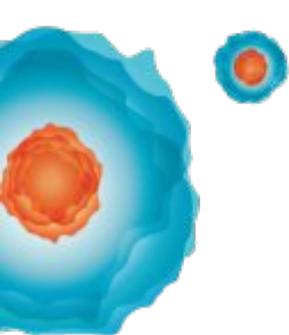
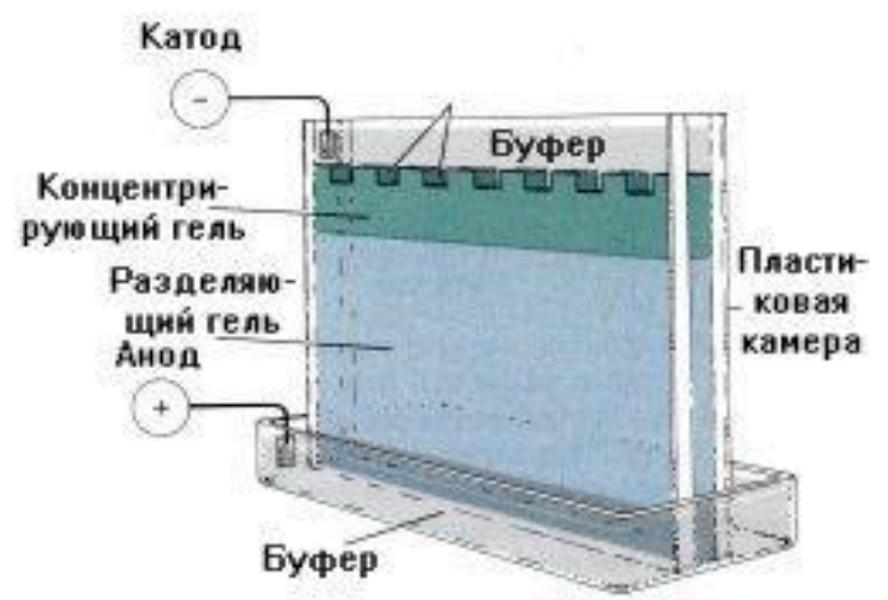
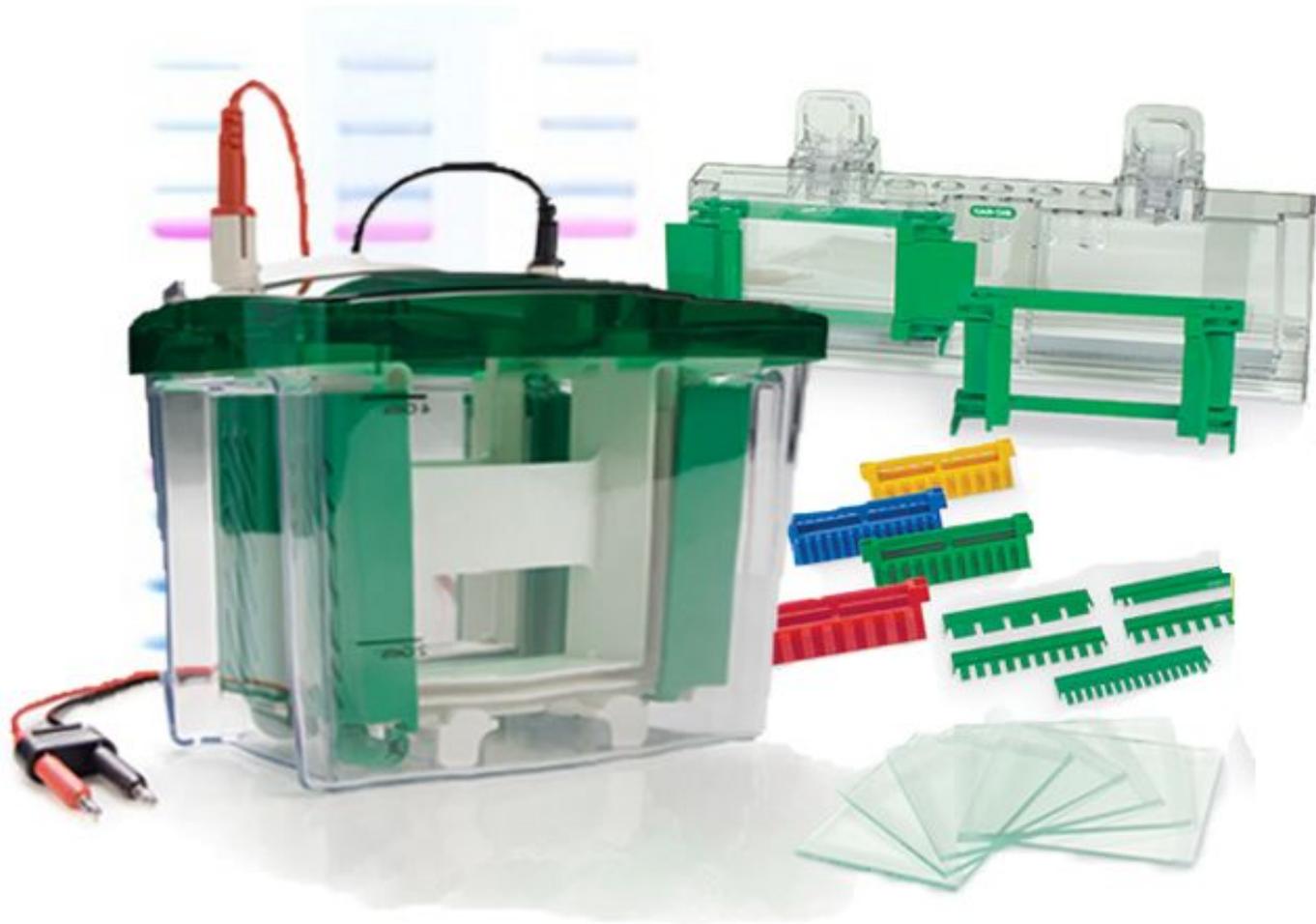


Схема аппарата для электрофореза

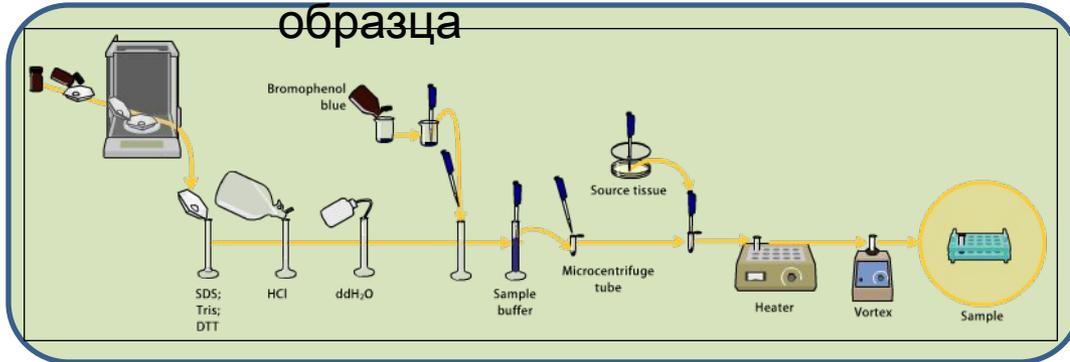


Аппараты для электрофореза

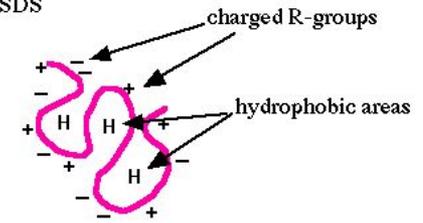


Процедура SDS-PAAG

1. Подготовка образца



BEFORE SDS

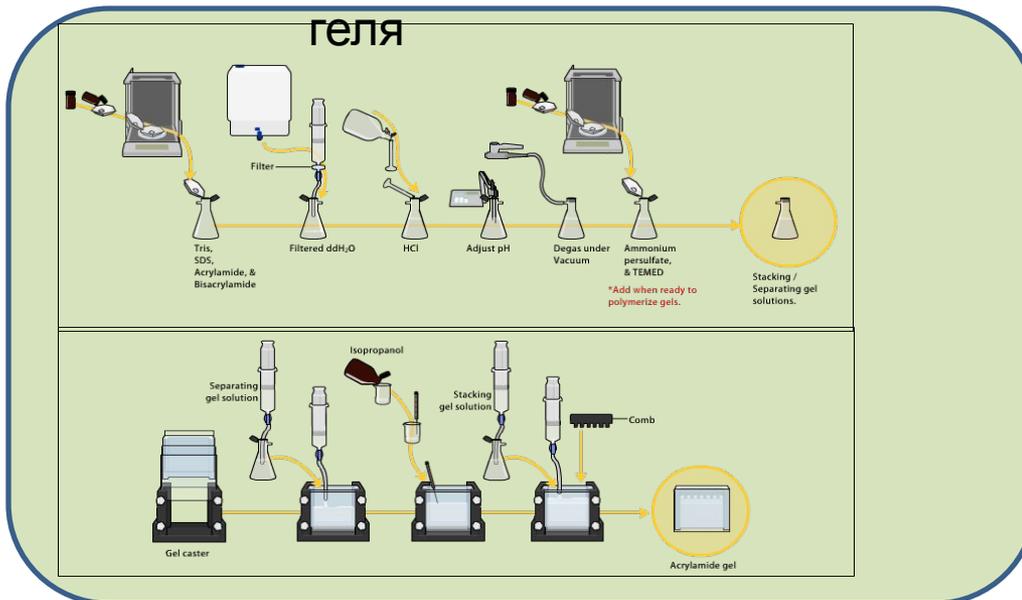


AFTER SDS

1.4 г ДСН – 1 г белка

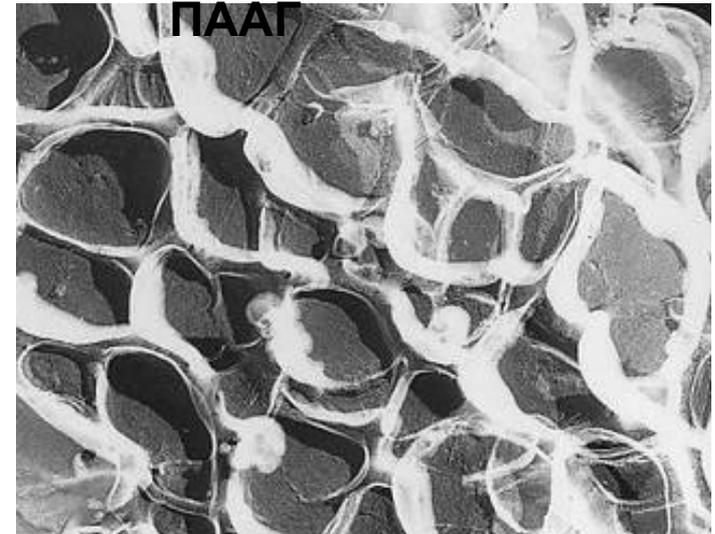


2. Подготовка геля



Структура

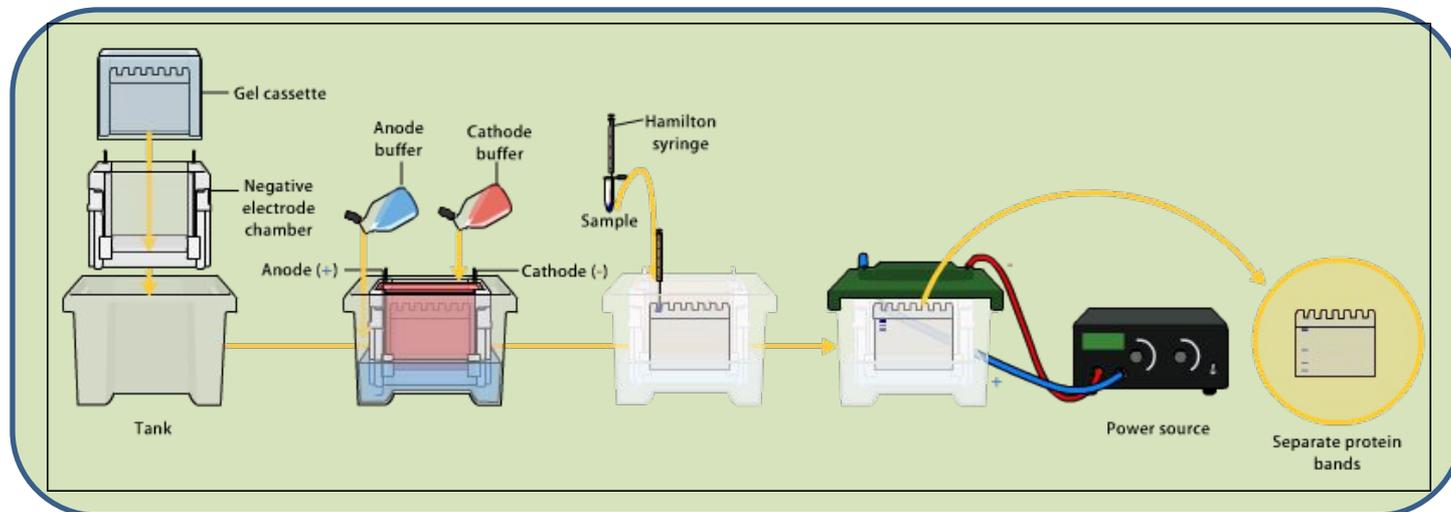
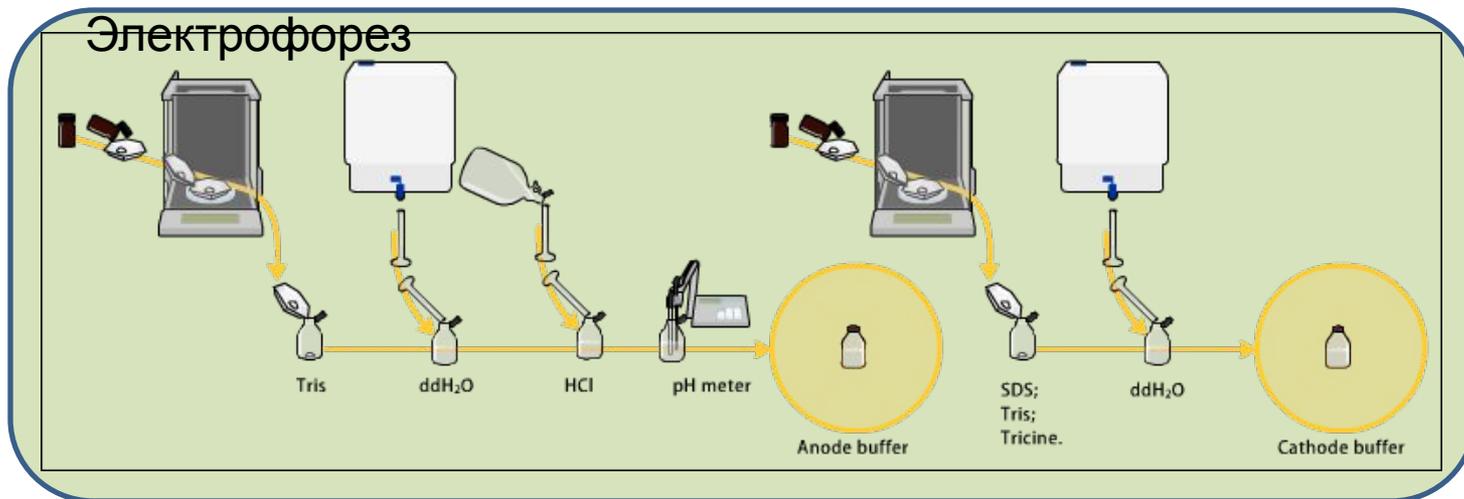
ПААГ

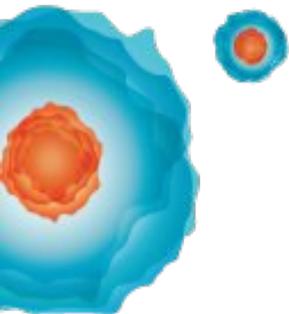


Процедура SDS-PAAG

3.

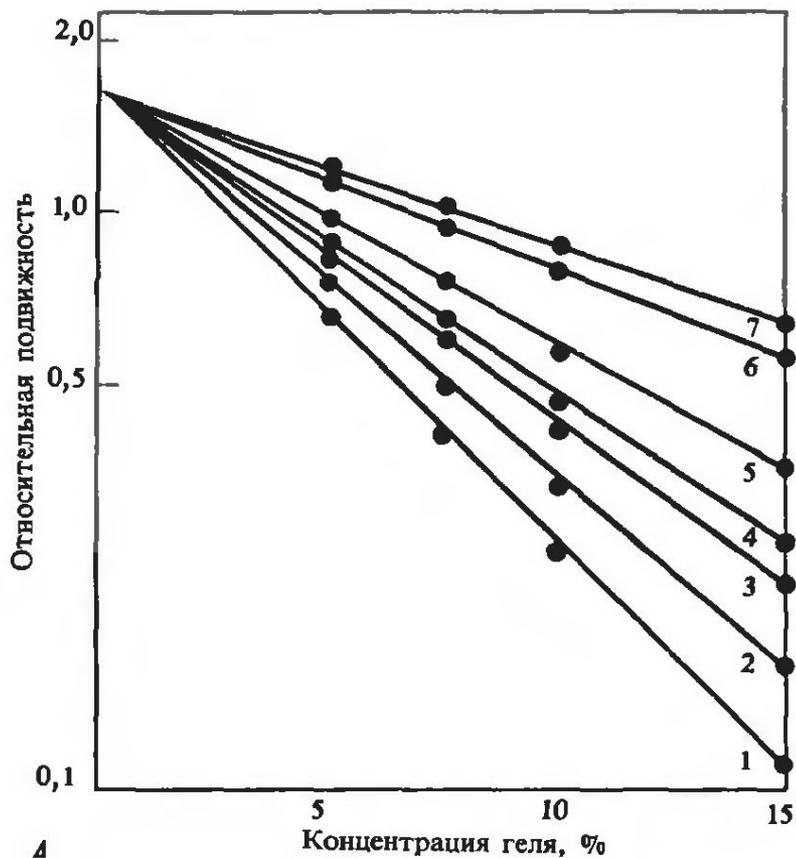
Электрофорез



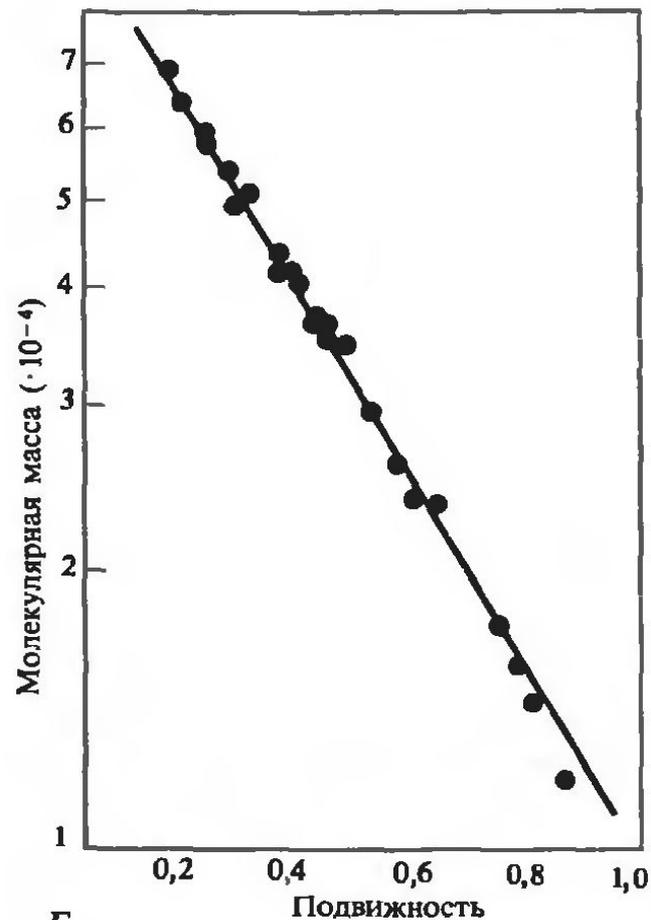


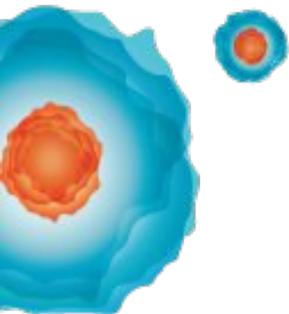
Интерпретация

● Зависимость относительной подвижности от концентрации геля



Относительная подвижность белков в 10 % ПААГ как функция молекулярной массы



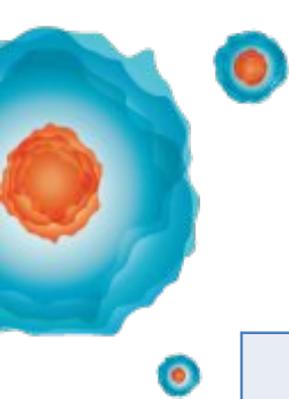


Уравновешивание образцов после ИЭФ

Перед разделением в СДС-ПААГ белки должны быть уравновешены в СДС-буфере

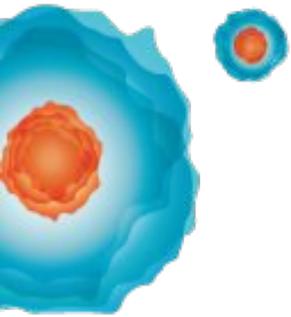
- Уравновешивание I – с DTT, для удаления дисульфидных связей, которые возникли при ИЭФ
- Уравновешивание II – с йодацетамидом, для алкилирования цистеинов, чтобы предотвратить образование дисульфидных связей





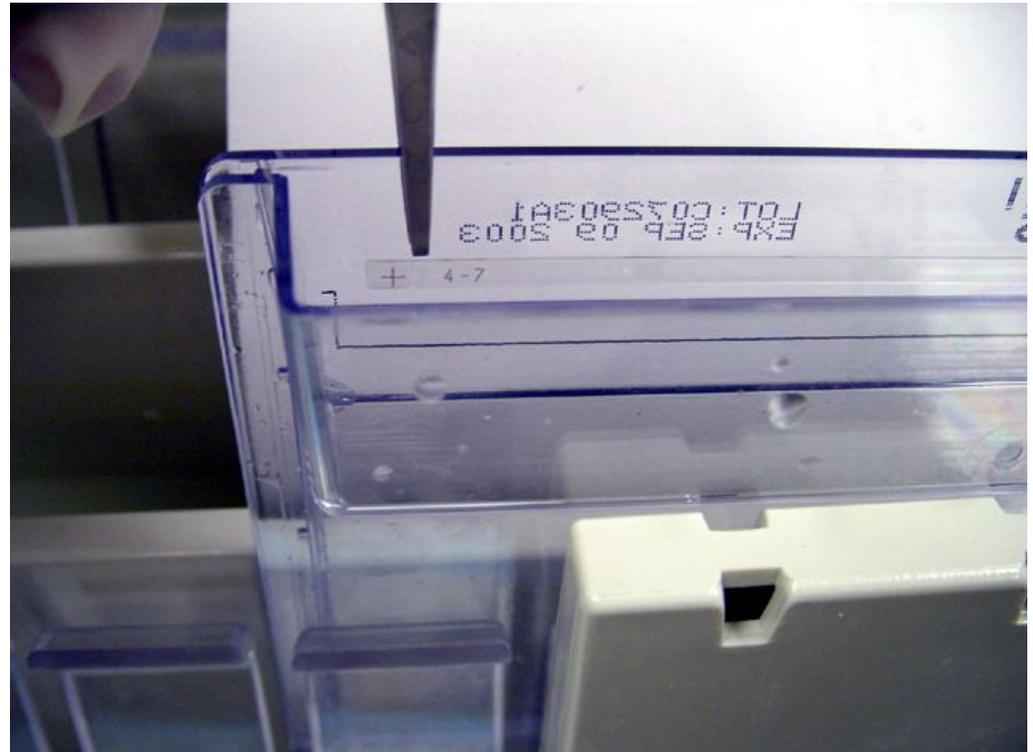
Уравновешивание образцов после ИЭФ

Компонент	Задача
Мочевина	Хаотропный агент. Разрушает водородные связи, предотвращает агрегацию и образование вторичной структуры белков, помогает сольубилизовать образец
СДС	Детергент. Денатурирует белок, обволакивает белок отрицательно-заряженными группами для СДС-ПААГ-электрофореза
Трис/HCL	Буфер
ДТТ	Удаляет цистеины, разрушая дисульфидные связи
Йодацетамид	Алкилирует цистеины для предотвращения восстановления связей



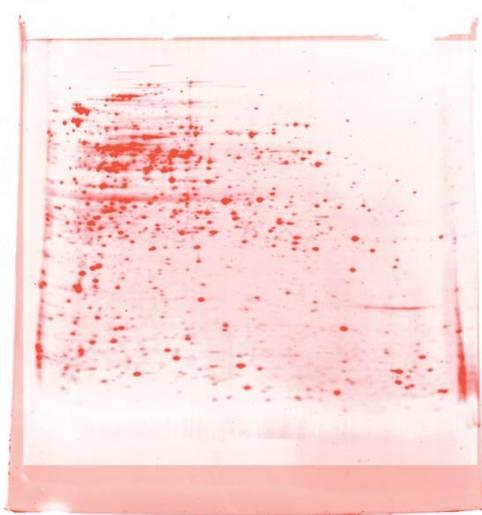
СДС-ПААГ-электрофорез

- IPG стрип располагается в лунке в верхней части геля
- Лунка заполняется нагретой агарозой
- Между стрипом и гелей не должно быть пузырьков воздуха
- Рекомендуется использовать низкое напряжение

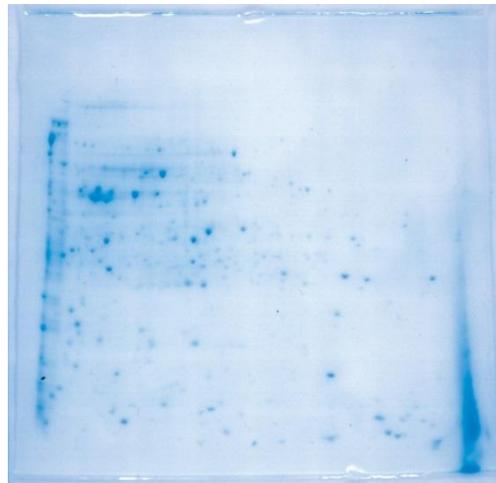


Окрашивание гелей и визуализация результатов

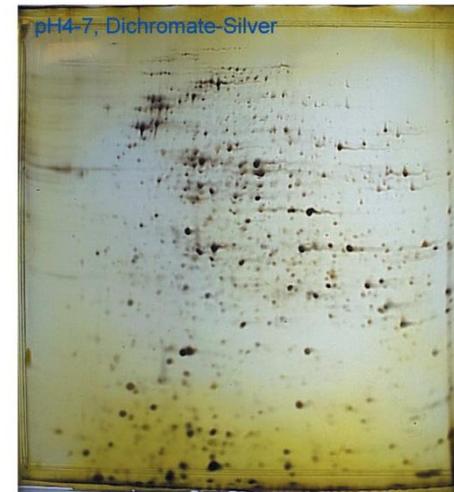
Выбор из огромного множества методов окрашивания зависит от многих факторов



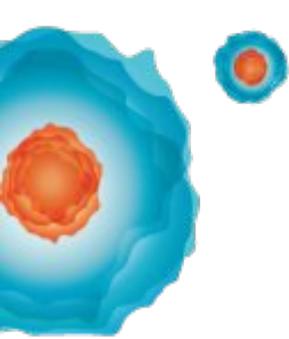
Oriole



Кумасси



Серебро



Выбор метода окрашивания

Скорость

- От 5 мин (Stain-Free) до 24 ч (коллоидное Кумасси)

Простота

- Без реагентов (Stain Free), смена буфера x1 (Oriole), смена буфера x15 (серебро)

Чувствительность

- 40 нг (Кумасси), 0,1 нг (Flamingo)

Стоимость

Точность

- Некоторые красители окрашивают равномерно и воспроизводимо, некоторые – нет

Динамический диапазон

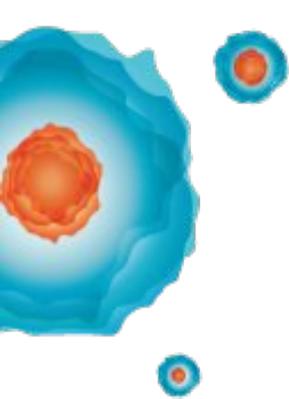
- Лучшие показатели – у флуоресцентных красителей; не очень – у серебра

Совместимость с масс-спектрометрией

Доступные системы визуализации для анализа изображений

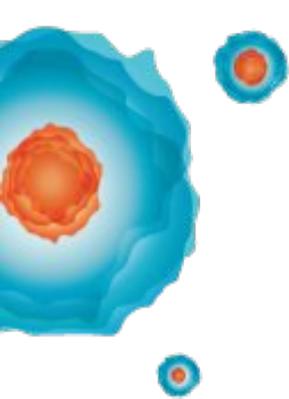
Выбор метода окрашивания

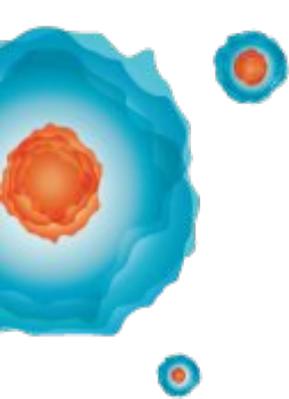
Краситель	Чувствительность	Время окрашивания	Преимущества
Stain Free	10 нг	5 мин	Очень быстро, МС-совместимо, готово для вестерн-блоттинга
Oriole™ флуоресцентный краситель	1 нг	1,5 ч	Быстро, широкий динамический диапазон, МС-совместимо
Flamingo™ флуоресцентный краситель	0,1 нг	5 ч	Высокая чувствительность, широкий динамический диапазон, МС-совместимо, нет необходимости отмывки геля, идеально для лазерных сканнеров
SYPRO Ruby™	1 нг	Ночь	Флуоресцентный краситель, просто в использовании, широкий динамический диапазон, МС-совместимо
Dodeca™ серебро	0,25 нг	3 ч	Детектирует некоторые высокогликозилированные и другие сложные в окрашивании белки
Silver Stain Plus™	0,6 нг	1,5 ч	Чувствительный, относительно низкий уровень фона
Bio-Safe™ Coomassie G-250	8 нг	2,5 ч	Безопасно, простота визуализации, готово к работе, МС-совместимо
Coomassie Blue R-250	36 нг	5 ч	Просто, МС-совместимо, старейший и Simple; MS compatible; самый старый и наименее затратный метод



Рекомендации для выбора красителя

- Для превосходных 2D-результатов лучше использовать меньшую концентрацию образца и более чувствительный краситель
- С другой стороны, чувствительность – не всегда необходима. Для масс-спектрометрии необходимо минимальное количества белка для идентификации
- Чистота очень важна, особенно для работы с чувствительными красителями





Спасибо за внимание!

Вопросы?

