

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ СМЕСЕЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Лекция 5



План лекции



1. Основные принципы электрофореза
2. Электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия разделение по величине молекулярных масс
3. Изоэлектрофокусирование
разделение по величине изоэлектрических точек
4. Двумерный электрофорез
изоэлектрическая точка+молекулярная масса
5. Капиллярный электрофорез
6. Лаборатория на чипе и ее применения

Что разделяется?

- клетки
- коллоидные частицы
- нуклеиновые кислоты
- белки
- пептиды
- аминокислоты
- органические кислоты и основания
- лекарственные препараты
- пестициды
- неорганические катионы и аниона
- все что имеет заряд**

Зачем разделяется?

- ✓ качественный анализ
- ✓ контроль чистоты
- ✓ количественный анализ
- ✓ препаративное разделение и очистка

Электрофорез

Ф.Ф. Рейсс, 1807; А. Tiselius, 1937

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

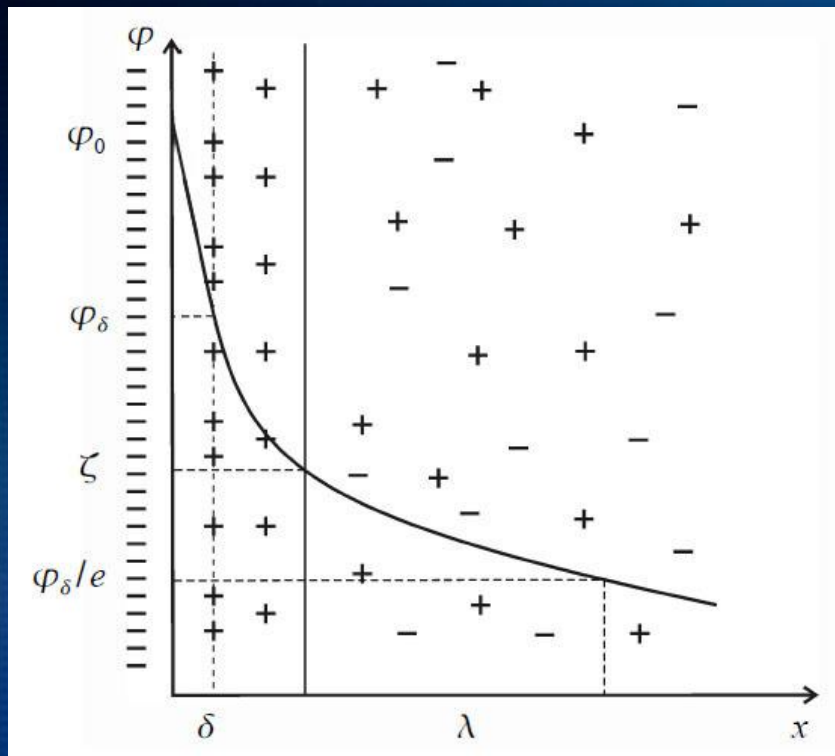
Электрофорез в крахмальном геле



Arne Tizelius

Теория электрофореза

Двойной электрический слой (ДЭС)



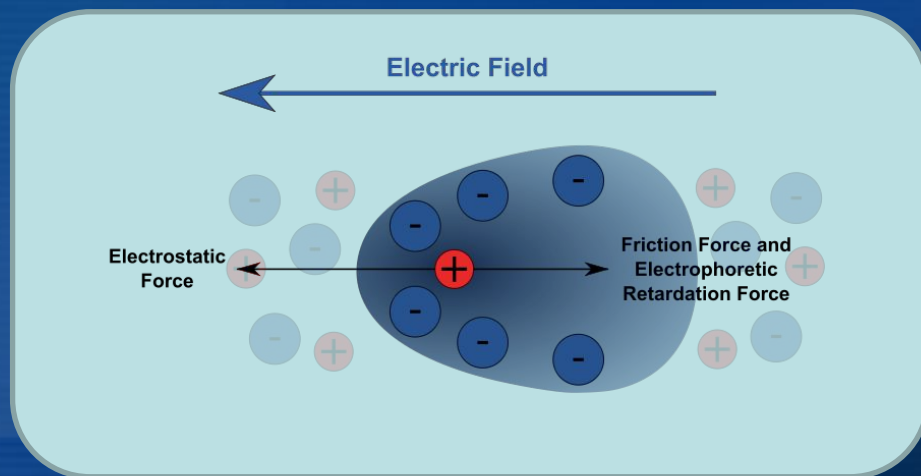
Строение ДЭС:

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

Характеристические потенциалы ДЭС:

- потенциал диффузного слоя
- дзета-потенциал

Движение частицы в электрическом поле



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

Виды электрофореза

Зональный электрофорез

гомогенная буферная система

Изотахофорез

Негомогенная буферная система

Изоэлектрическое фокусирование

Градиентная буферная система

SDS-PAGE

Лэмбли, 1970

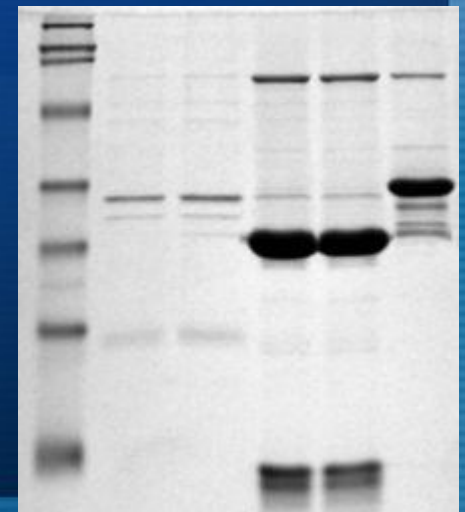
изучение процесса сборки капсида
бактериофага T4

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:

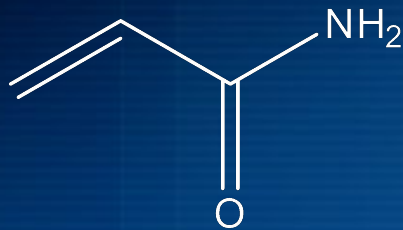
- определение молекулярной массы
- определение составе смеси белков
- определение чистоты ферментных/белковых препаратов
- препаративное выделение белка



Гели для электрофореза (ПААГ)

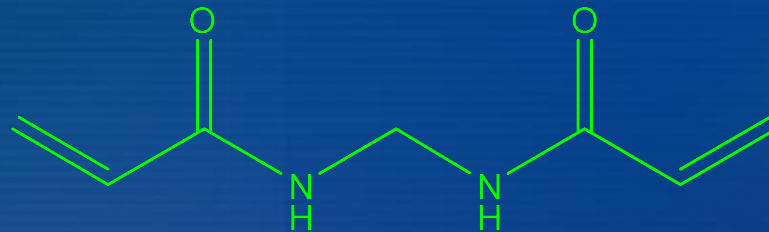
Исходные материалы

Мономер



Акриламид

Поперечно-сшивающий агент



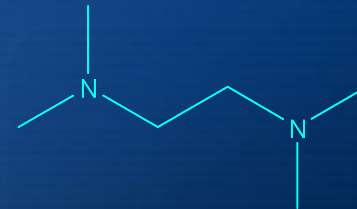
N,N'-метиленбисакриламид

Инициатор процесса полимеризации



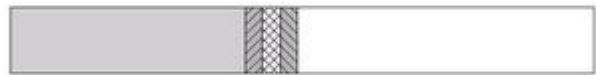
Персульфат аммония

Катализатор процесса полимеризации



Тетраметилэтилендиамин

Изотахорез



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.

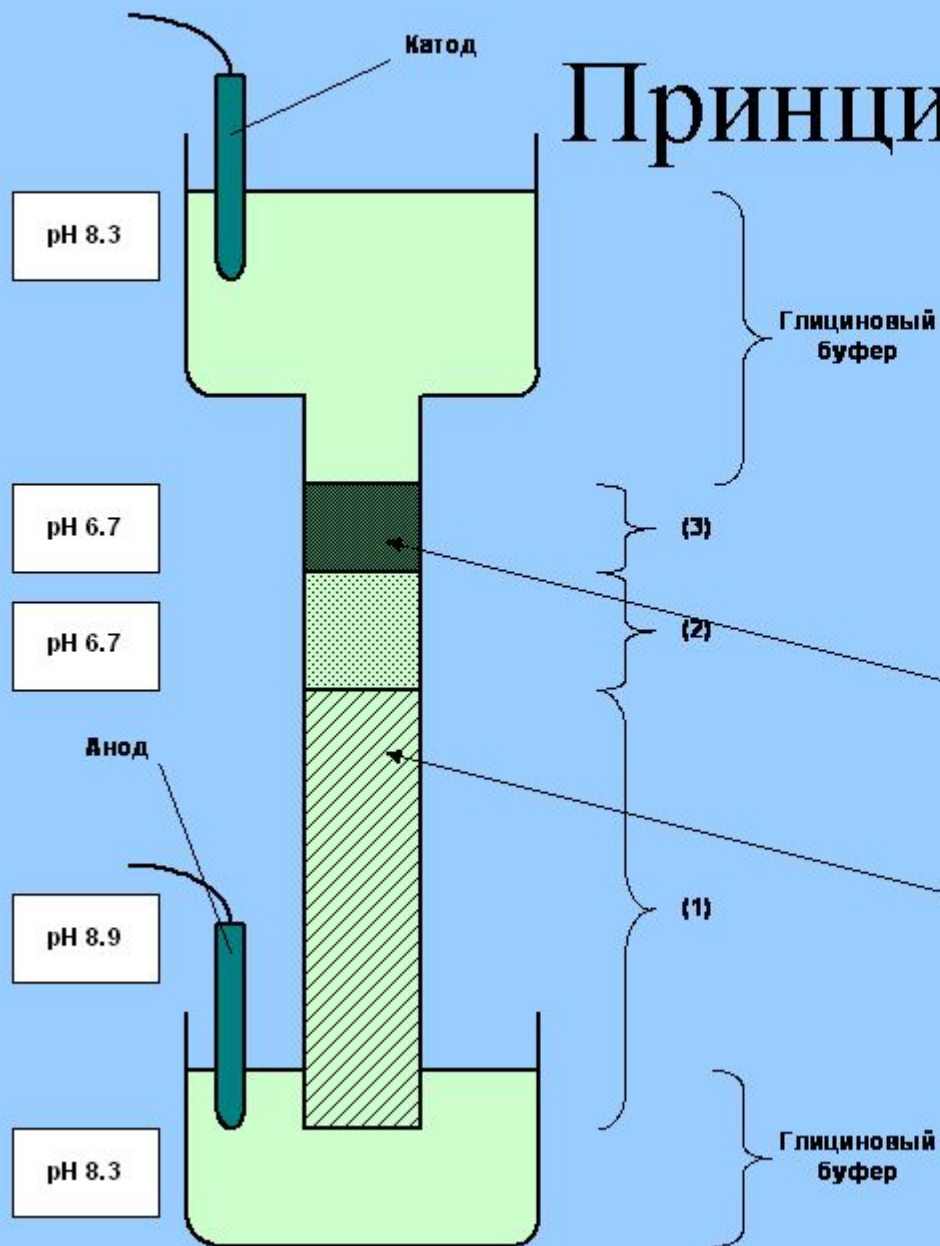
2. Разделяющий гель имеет рН в районе 8,5-9 и концентрацию полиакриламида 10-20 %.

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.

Принцип DE



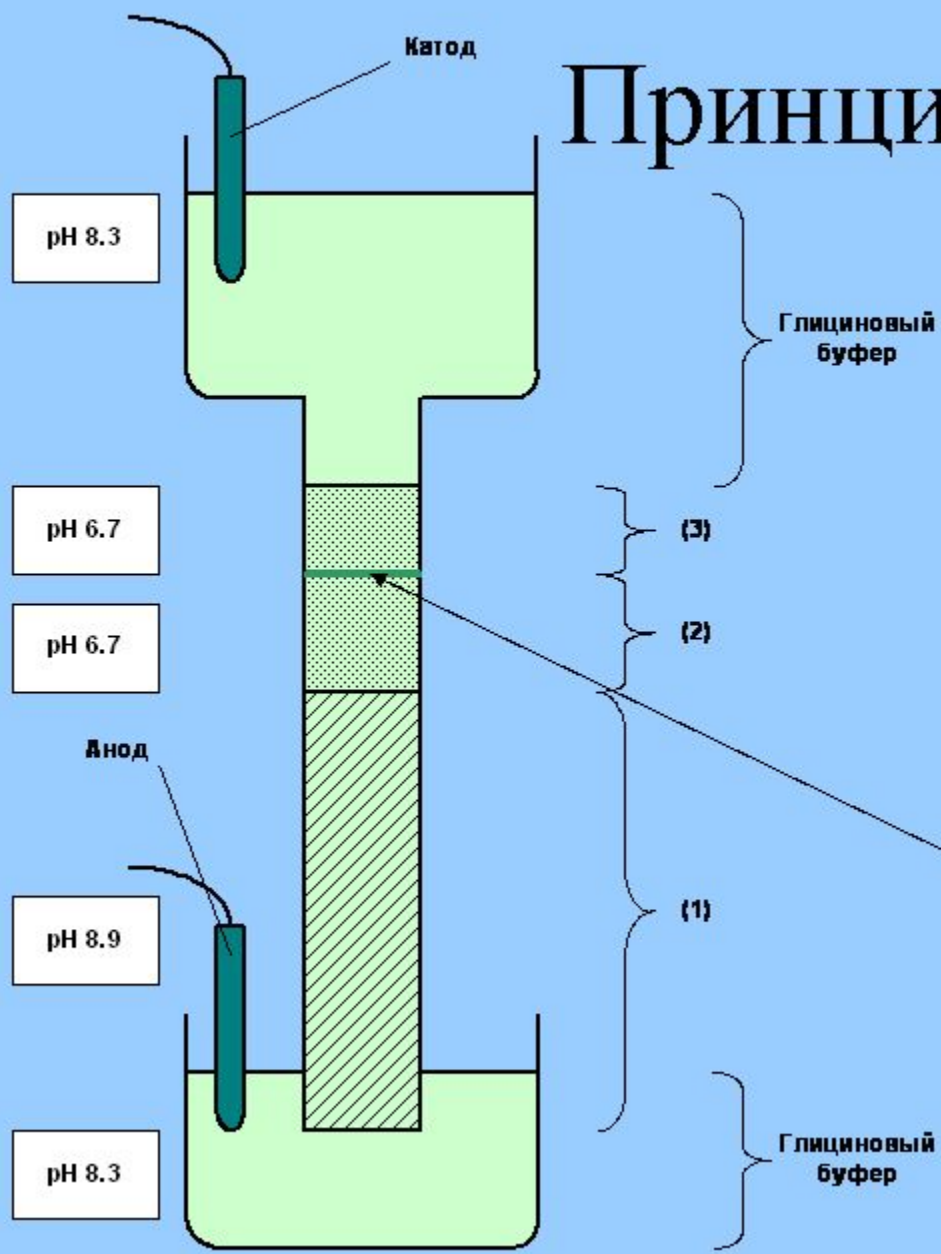
- Введение
образца в гель
образца (3)

Образец

Хлорид-ион



Принцип DE

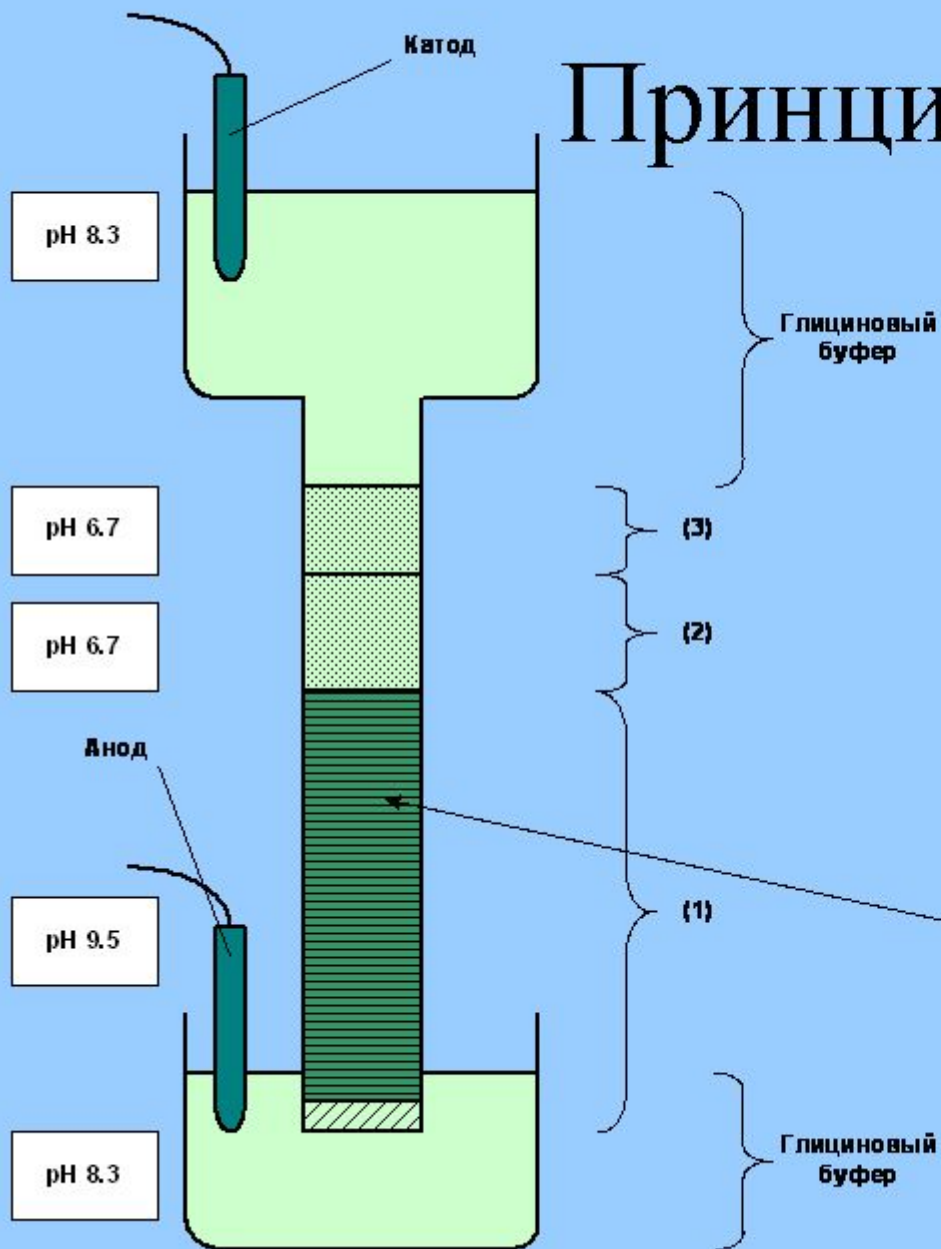


Концентрирование образца на концентрирующем геле (2), имеющем большие поры и низкий рН

Образец



Принцип DE



- Разделение
компонентов
образца на
разгоняющем геле
(1), имеющем
маленькие поры и
градиент рН

Образец



Схема аппарата для диск-электрофореза

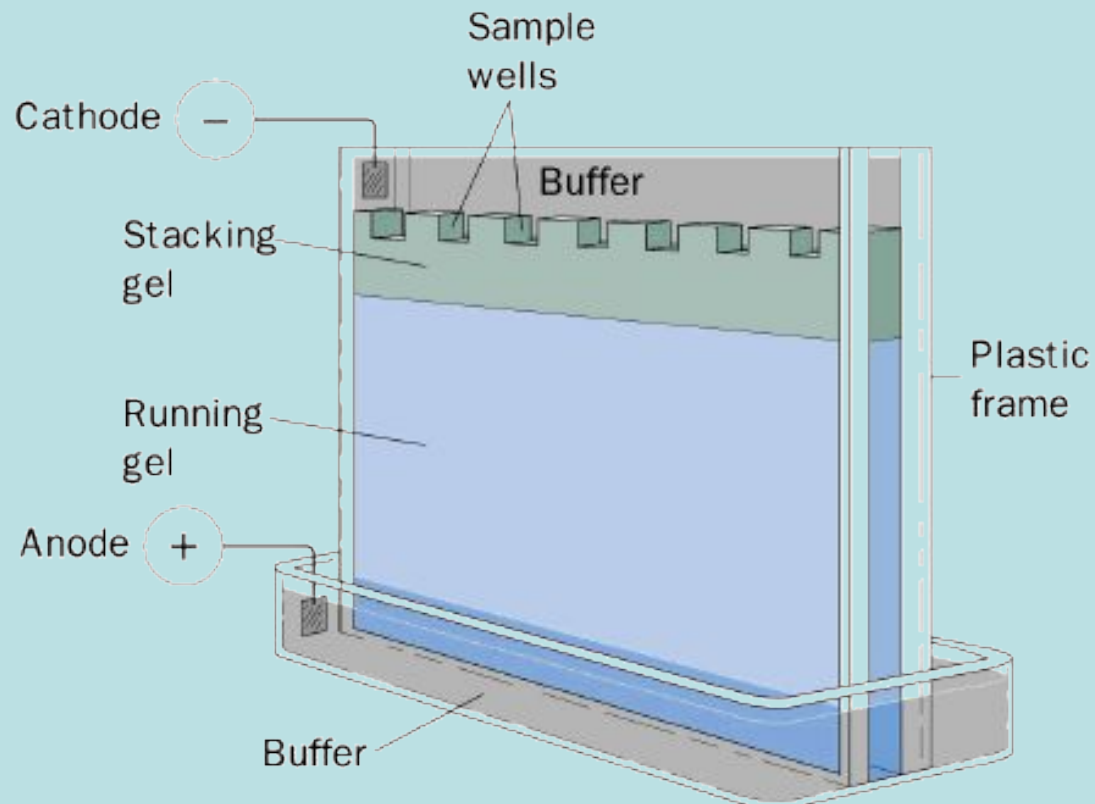
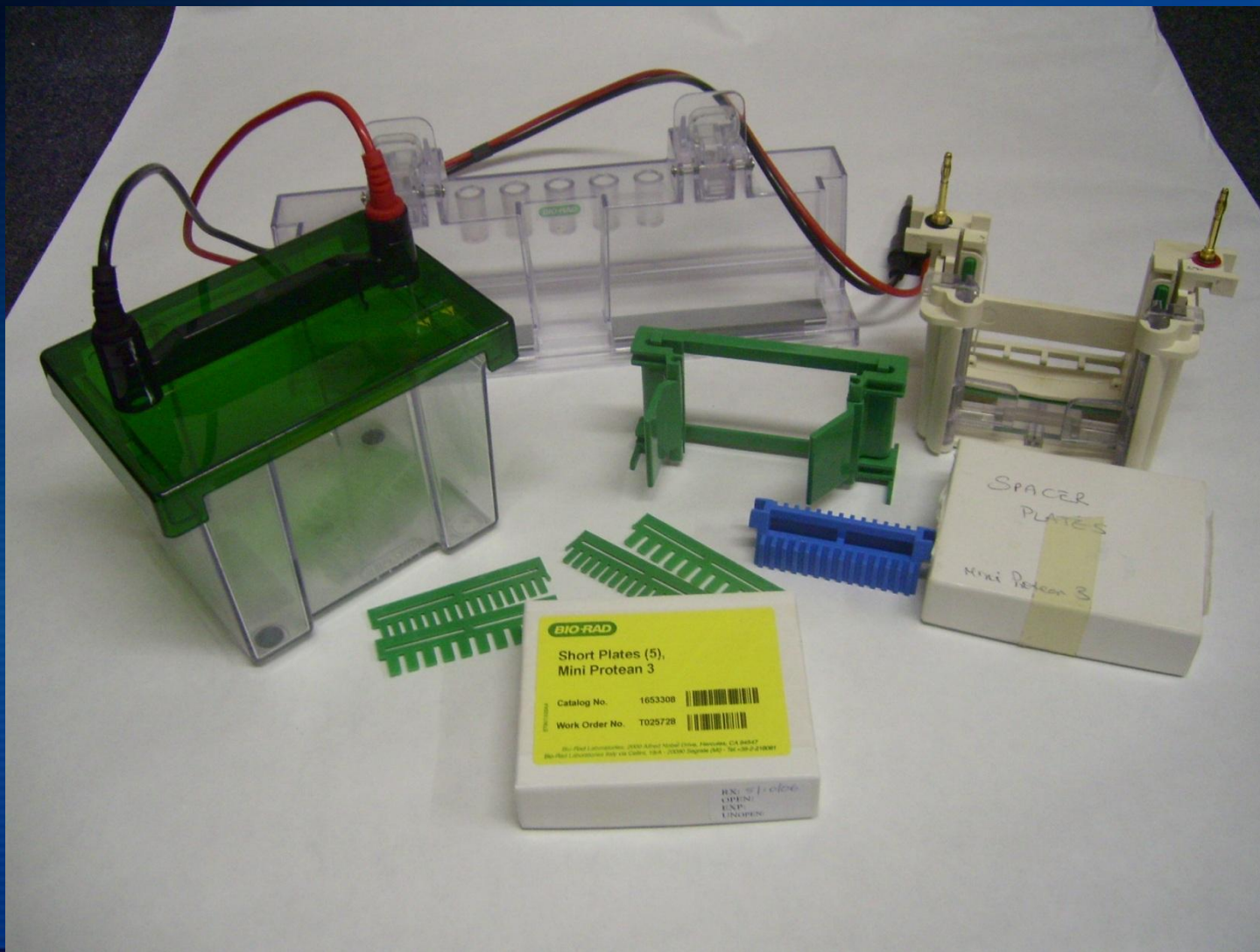


Diagram of a disc electrophoresis apparatus

Аппараты для электрофореза

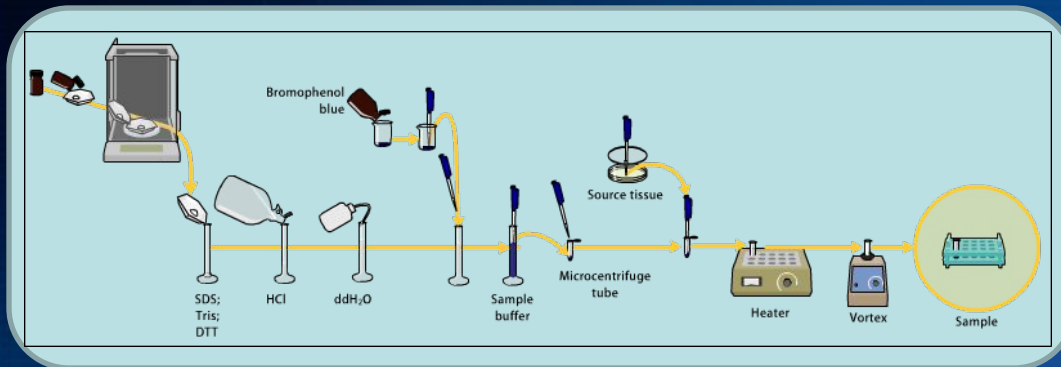


Аппараты для электрофореза

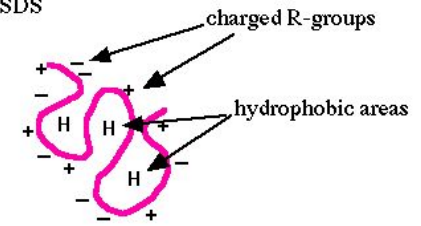


Процедура SDS-PAAG

1. Подготовка образца



BEFORE SDS



1.4 г ДСН – 1 г белка

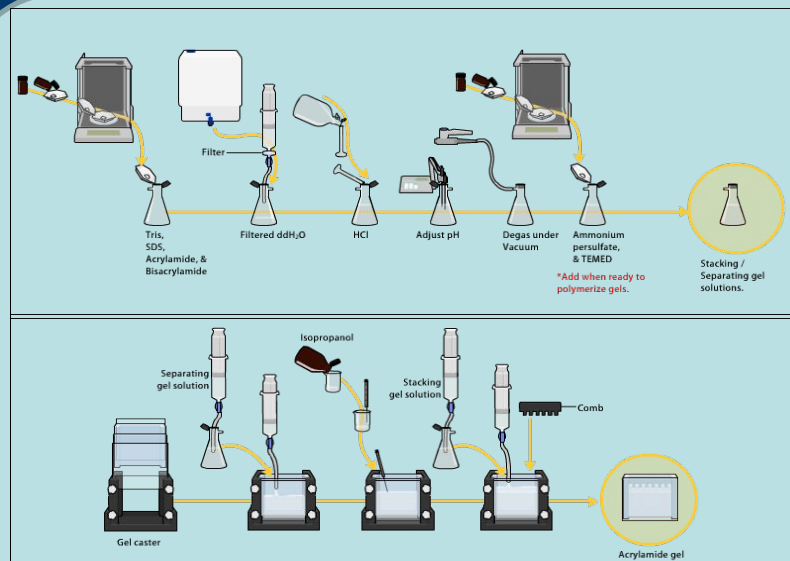
AFTER SDS



Структура ПААГ

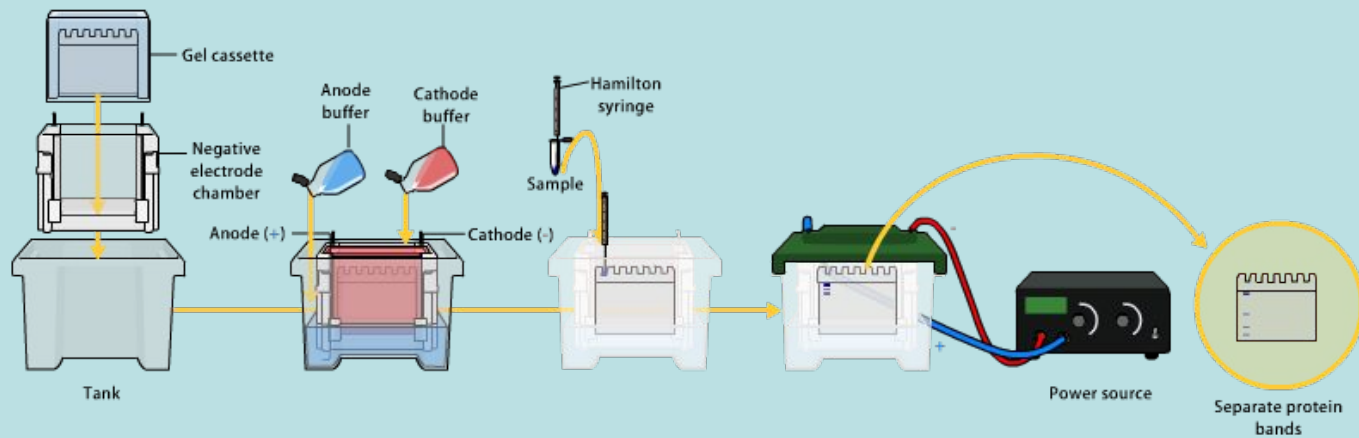
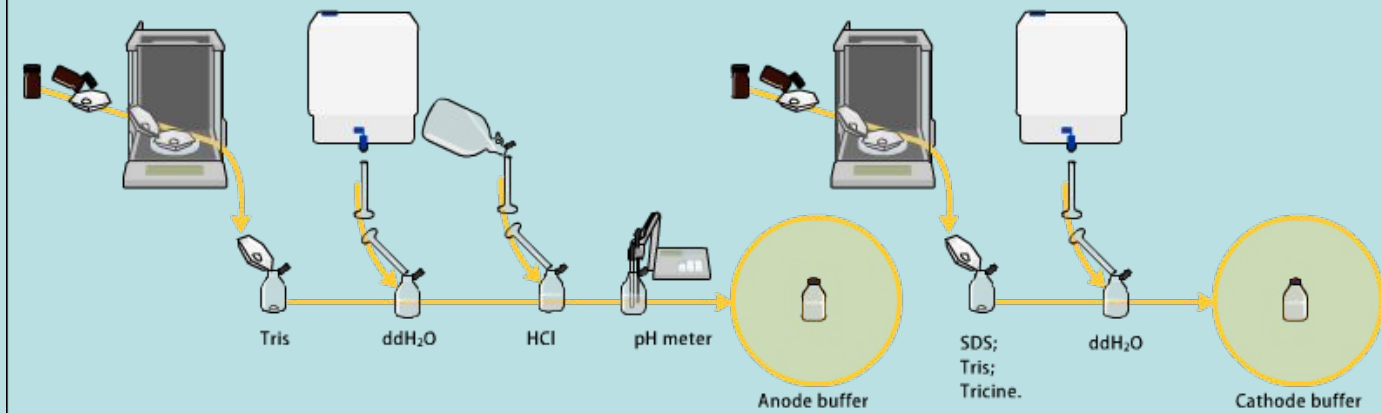


2. Подготовка геля



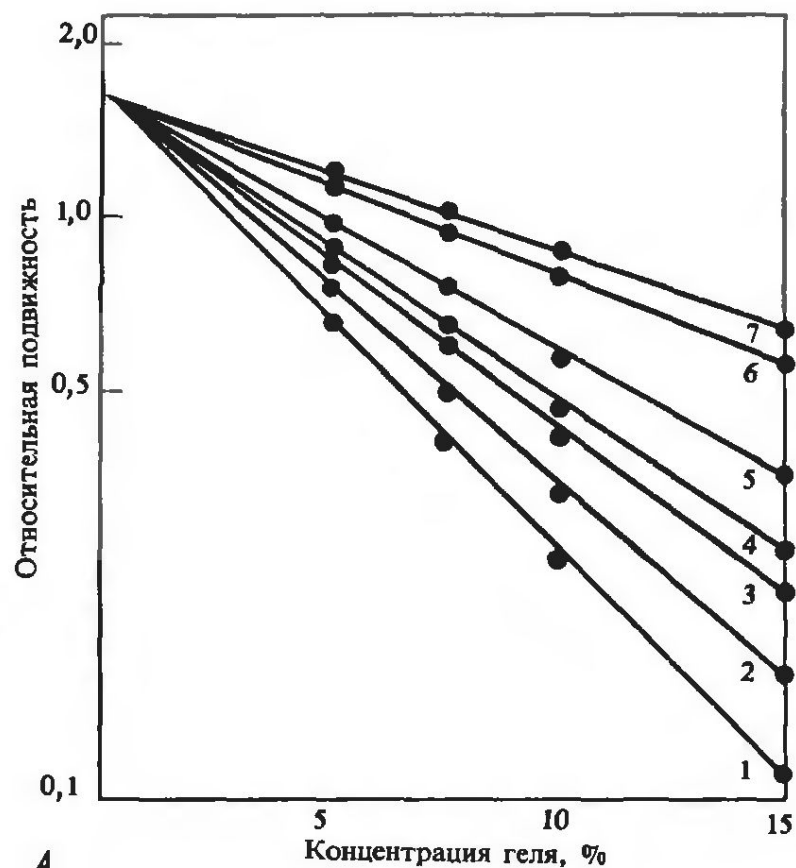
Процедура SDS-PAAG

3. Электрофорез

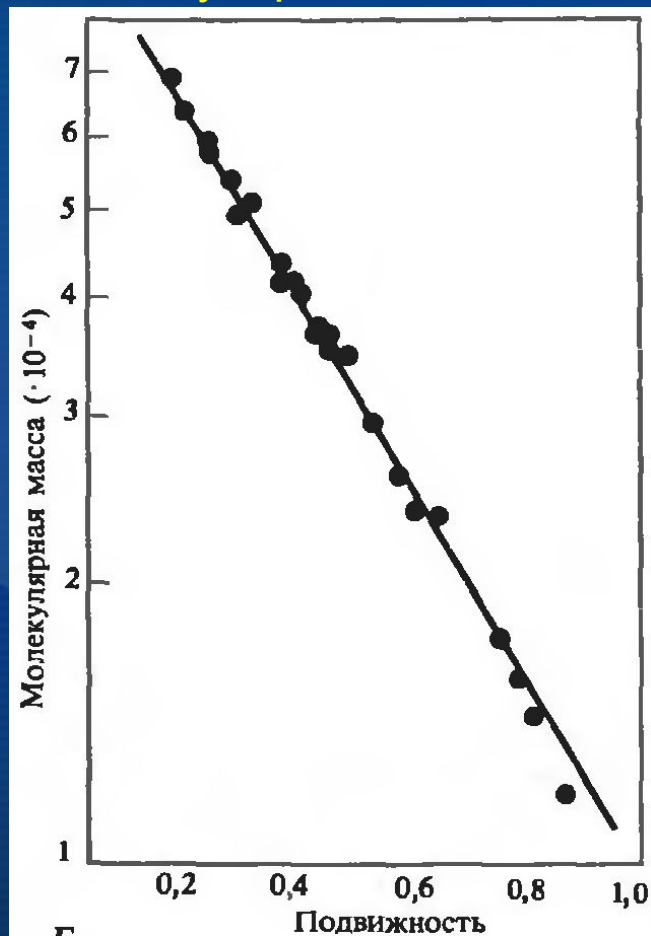


Интерпретация

Зависимость относительной подвижности от концентрации геля

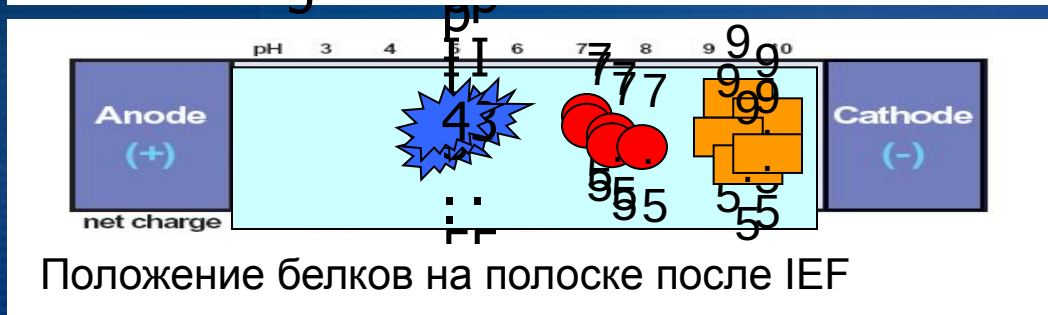


Относительная подвижность белков в 10 % ПААГ как функция молекулярной массы



ИЭФ (IEF)

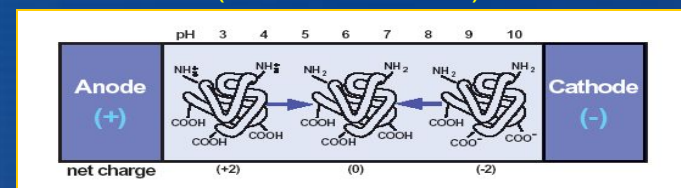
Изоэлектрическое фокусирование (электрофокусирование) — метод разделения молекул (белков) по разнице в их электрических зарядах. Это разновидность зонального электрофореза, которую обычно производят в геле. Белок, который находится в pH-зоне ниже собственной изоэлектрической точки, будет положительно заряжен и будет перемещаться к катоду. В результате перемещения заряд молекулы будет снижаться, а перемещение — замедляться. В результате белки образуют четкие полосы, и каждый белок будет располагаться в градиенте значений pH в соответствии с изоэлектрической точкой.



Разрешение - < 0.01 , образец – 100-200 мкг

Градиент pH в геле создается **амфолитами** (полиаминополикарбонowymi кислотами)

Полоска геля, со сформированным в матрице pH градиентом (Garfin *et al.* 2000)



Прибор для ИЭФ фирмы BioRad



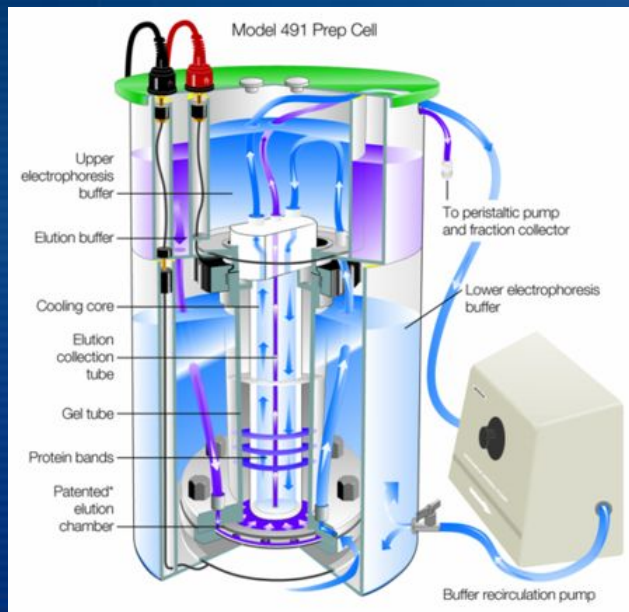
Двумерный электрофорез

- 1 измерение – ИЭФ, нативный электрофорез
- 2 измерение – ДСН электрофорез

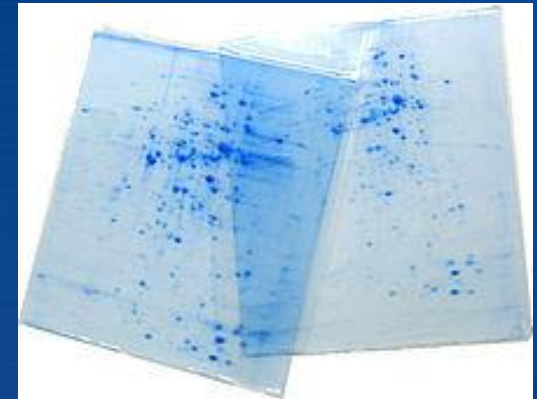
Виды нативного электрофореза:

1. BN-PAGE
2. CN-PAGE
3. QPNC-PAGE

quantitative preparative native continuous polyacrylamide gel electrophoresis



2Д-гель окрашенный кумасси



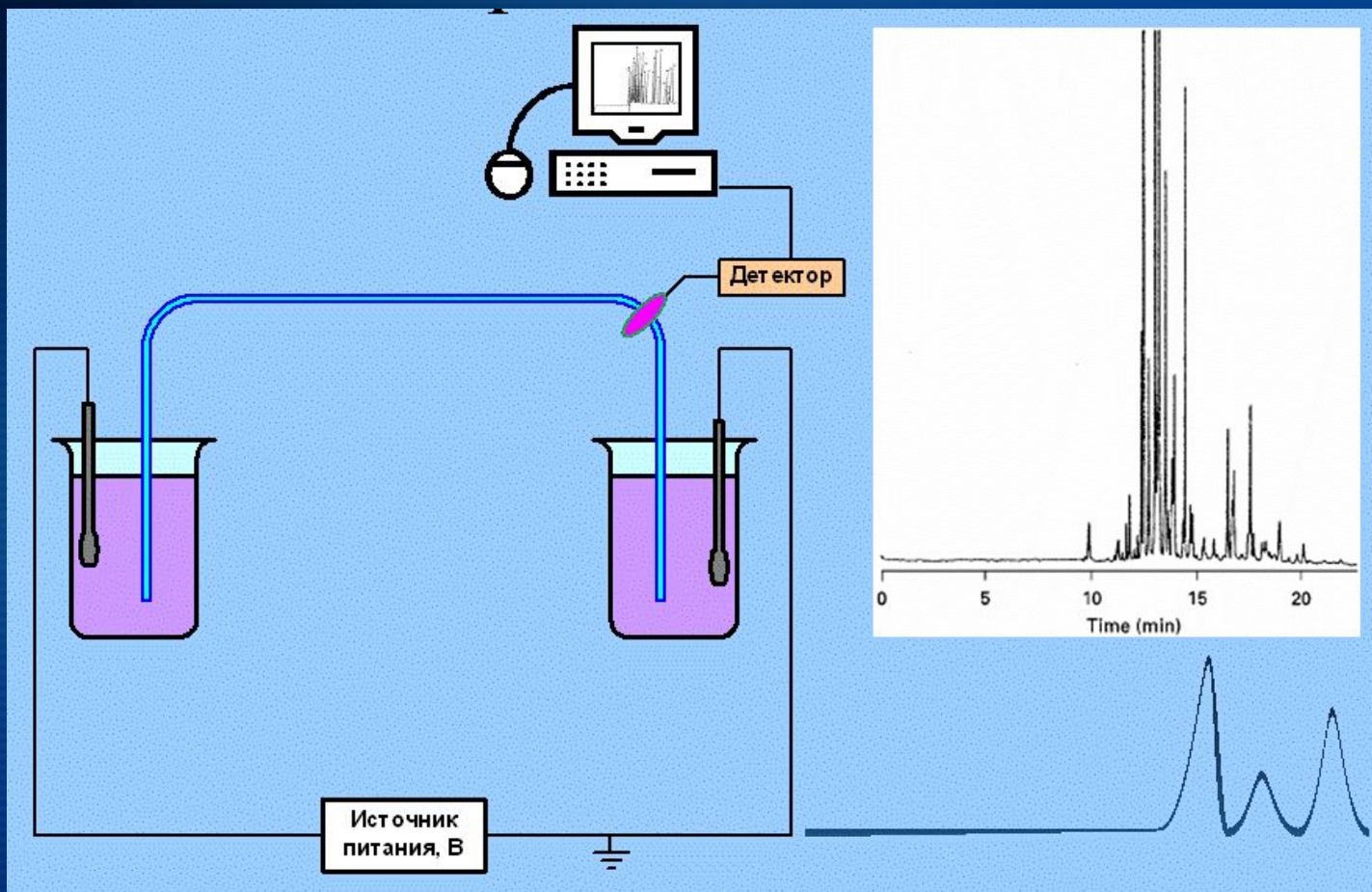
Автоматическое выделение пятен



Капиллярный электрофорез (СЕ или HPCE)

Jorgenson, Lukas, 1981

- >>> минимизация диффузионных эффектов, размывов и турбулизаций потока
- >>> сверхвысокие разрешения при разделении компонентов



Оборудование для КЭ



Оборудование для КЭ



Agilent 7100 CE

Оборудование для КЭ



Капиллярный электрофорез (СЕ или НРСЕ)

Назначение:

- аналитическое разделение
- микропрепаративное разделение

среда разделения

- кварцевый капилляр длиной 20-30 см и внутр диаметром 50-100 мкм

параметры разделения

Напряженность поля 1 кВ/см; ток 10-20 мА, напряжение источника до 30 кВ

объем разделения

- 2-4 нл

предел обнаружения

- нг, для некоторых соединений на аттомолярном уровне

время анализа

- 10-20 мин

используемые детекторы

- UV-VIS
- флуоресцентный
- кондуктометрический
- электрохимический
- масс-спектрометрический

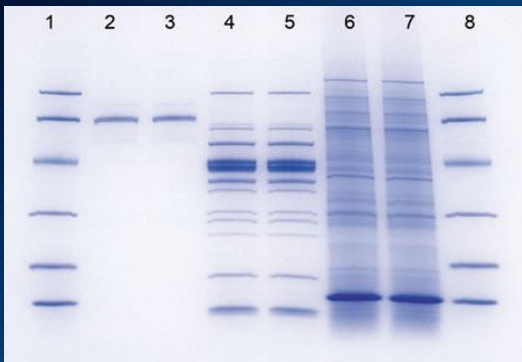
Визуализация



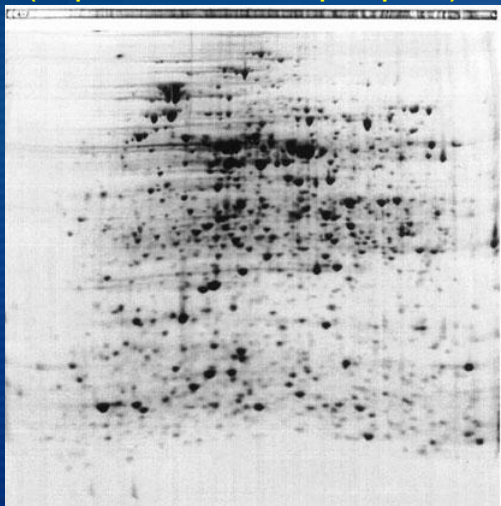
- Окрашивание кумасси (50 нг белка)
- Окрашивание серебром (1 нг белка)
- Окрашивание флуоресцентными красителями
- Иммуноблоттинг

Окрашивание серебром и красителями

1D-электрофореграмма (SDS-PAGE)
(окрашивание кумасси)



2D-электрофореграмма
(окрашивание серебром)



Чувствительность



Стоимость

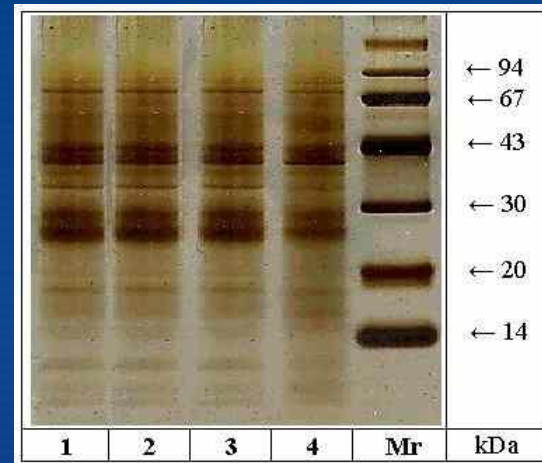


Сложность

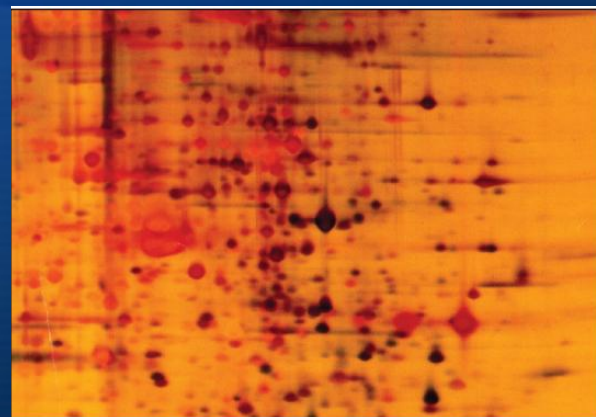


Временные
затраты

1D-электрофореграмма (SDS-PAGE)
(окрашивание серебром)



2D-электрофореграмма
(окрашивание серебром)



Флуоресцентные красители

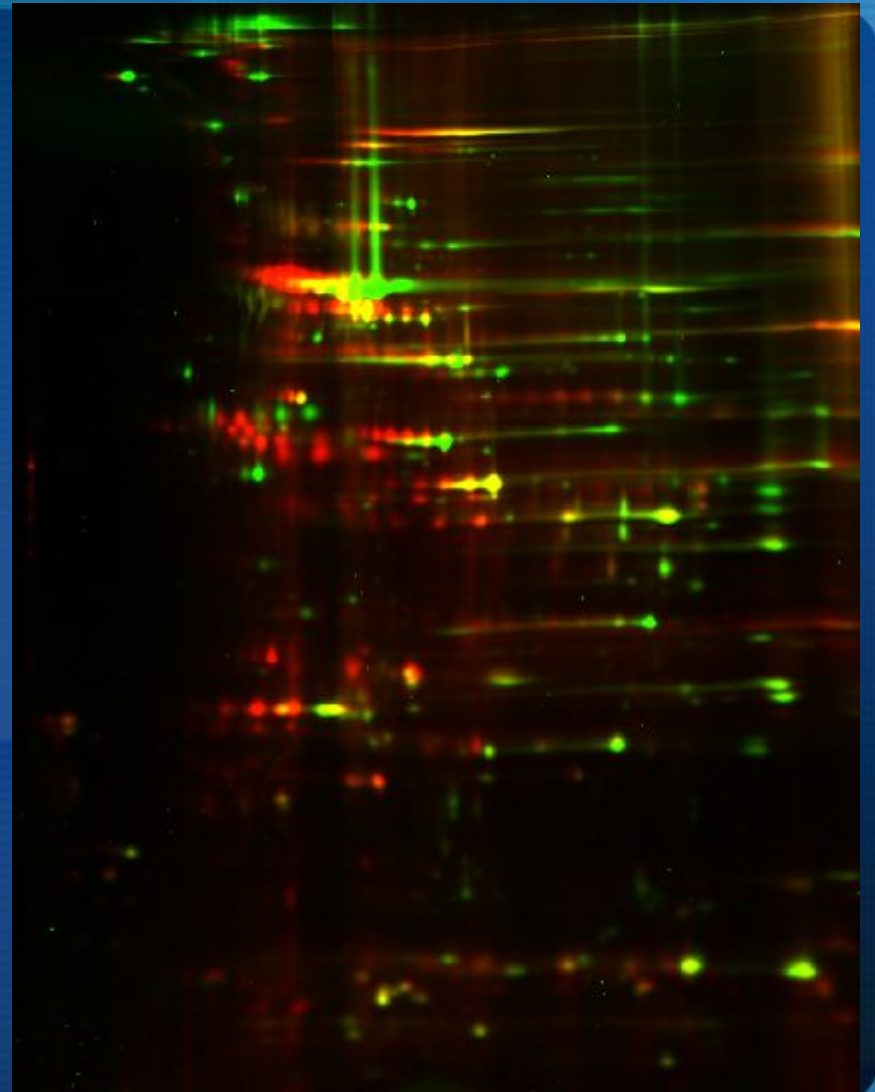
Окраска DIGE Cy3/Cy5

Электрофорез 2-х предварительно окрашенных белков *Mycoplasma gallisepticum* проводится на одном геле.

- Зеленым (Cy3) – белки из контрольных клеток,
- Красным (Cy5) – белки из обработанных клеток.

Достоинства: Очень чувствителен, прекрасное сопоставление пятен, очень точен и удобен для оценки экспрессии белка

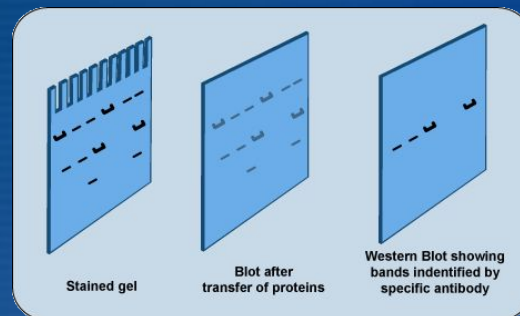
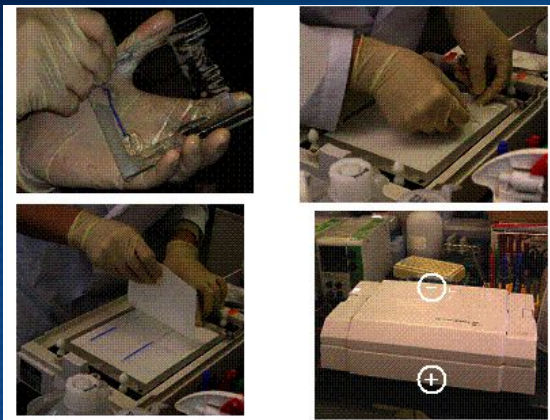
Недостатки: Недолговечность флуоресценции (сутки), требует дорогих сканеров, непригоден для вырезания пятен без дополнительной окраски серебром



Иммуноблоттинг

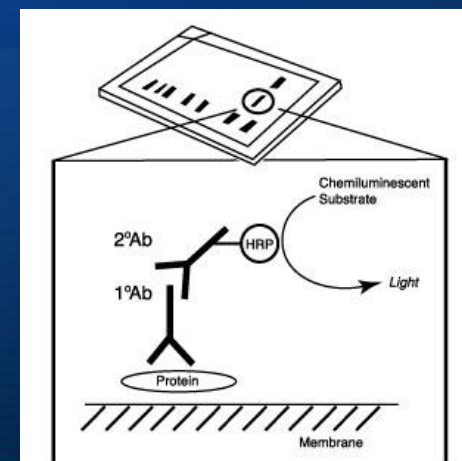
Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг) - метод идентификации белковых антигенов. Белки разделяют с помощью электрофореза и переносят на мембрану. Затем мембрану инкубируют в растворе антител и связанные антитела выявляют с помощью радиоизотопного или ферментного методов.

Если белки антисыворотки разделить изоэлектрофокусированием, а затем перенести (блоттинг) на мембрану, то с помощью меченого антигена можно установить и так называемый спектротип антисыворотки, т.е. определить изотип антител, взаимодействующих с данным антигеном.



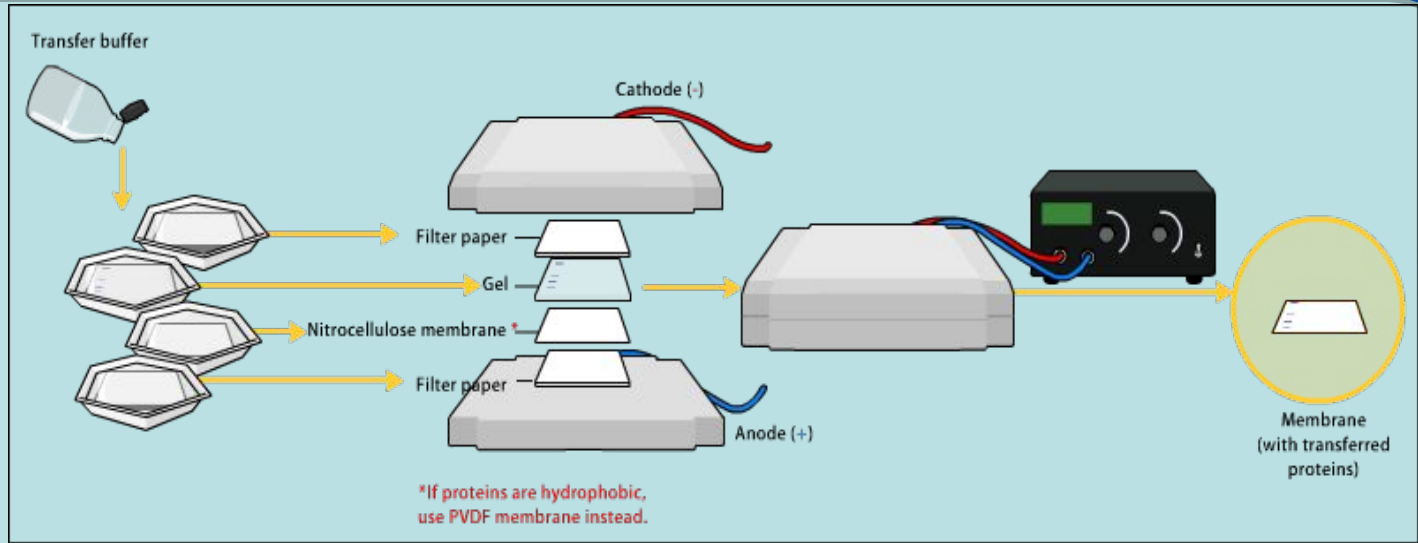
Процедура иммуноблоттинга

1. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану
2. Блокирование мембраны
3. Связывание антител
4. Детекция

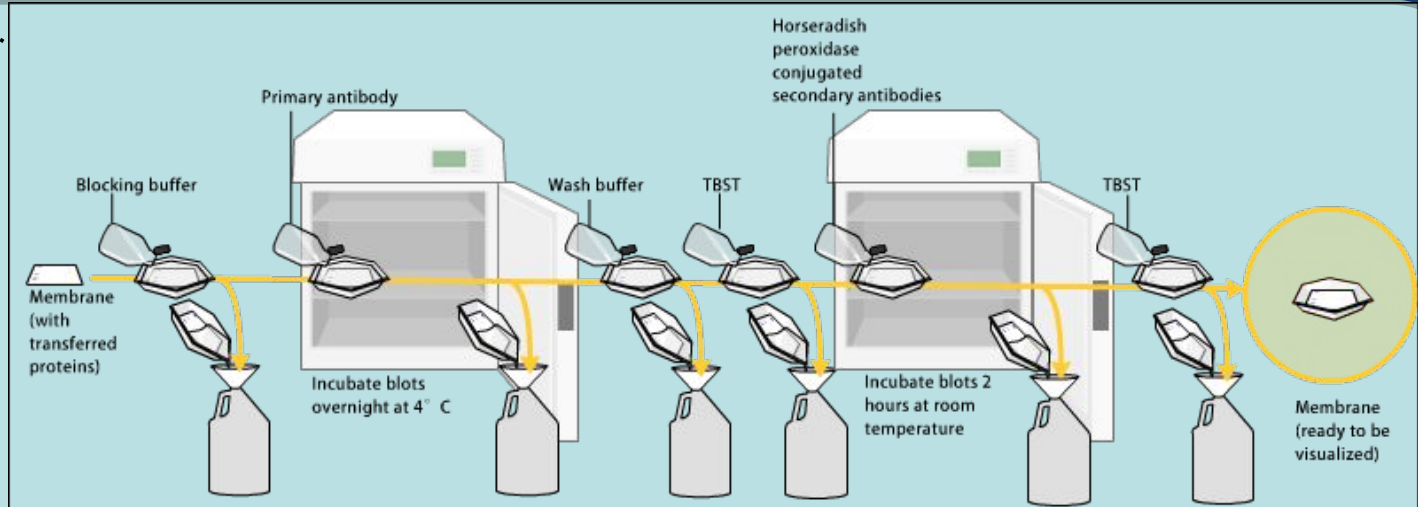


Иммуноблоттинг

1. Перенос на мембрану
(НЦ, ПВФ)

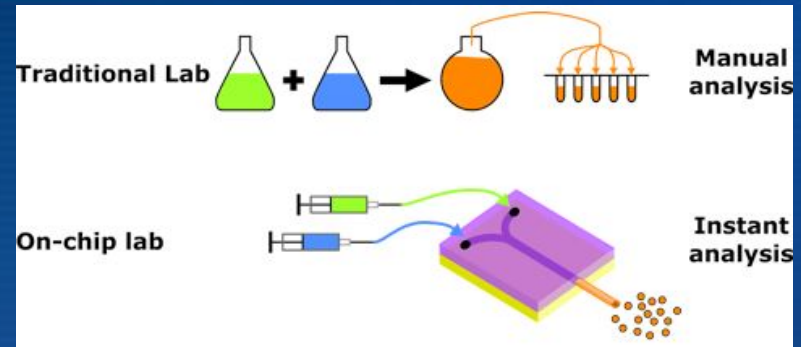


2-3. Блокирование мембраны.
Связывание антител.



Лаборатория на чипе

Lab-on-chip (LOC),
Лаборатория на чипе
Микроэлектромеханическая система
Микросистема полного анализа
Micro-TAS – Total analysis system
MEMS – Microelectromechanical system



Современное направление в анализе, позволяющее автоматизировать и реализовать несколько последовательных лабораторных операций на одном чипе размером несколько миллиметров с использованием микрофлюидных технологий.
Используемые для анализа образцы имеют объемы порядка **пиколитров**

LOC <> биомикрочип

Лаборатория на чипе

ЛОС

Последовательные химические превращения исходных образцов:

Разделение

Концентрирование

Смешивание промежуточных продуктов

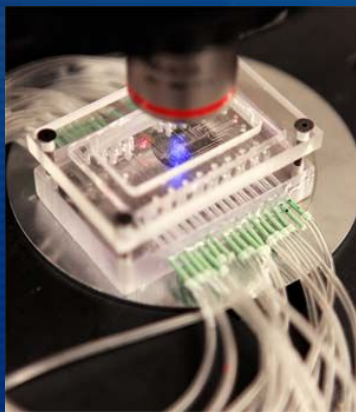
Перемещение продуктов в реакционные микрокамеры

Считывание результатов анализа

Биомикрочип

1 реакция/процесс

(гибридизация нуклеиновых кислот)

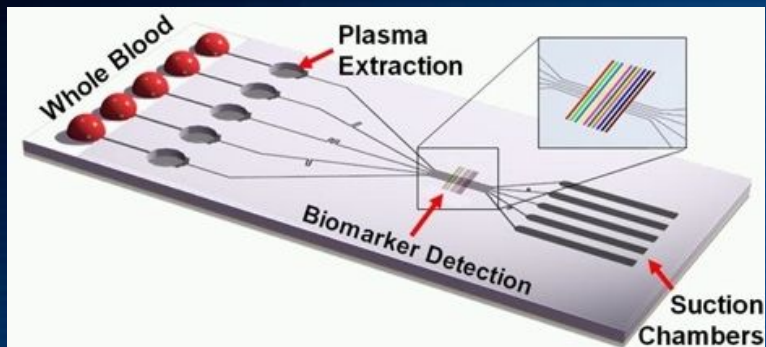


Преимущества ЛОС:

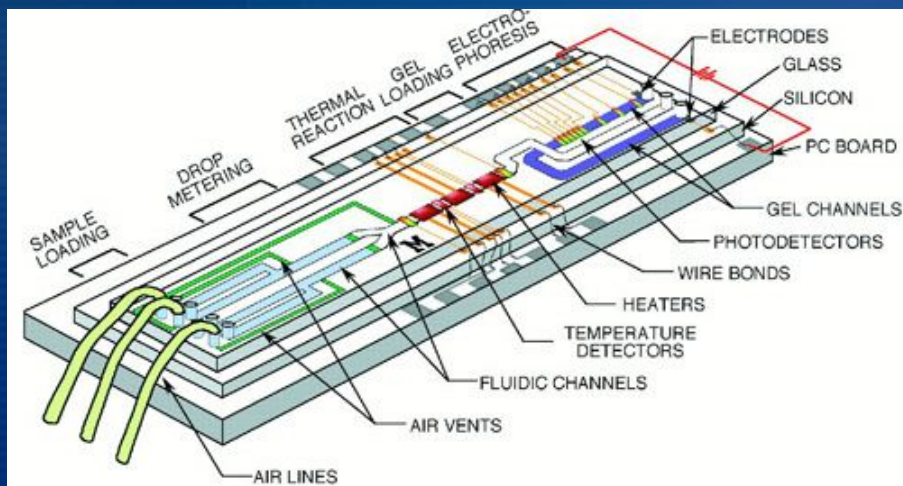
- простота использования
- высокая скорость анализа
- малое количество образцов и реагентов
- хорошая воспроизводимость результатов

Применения ЛОС

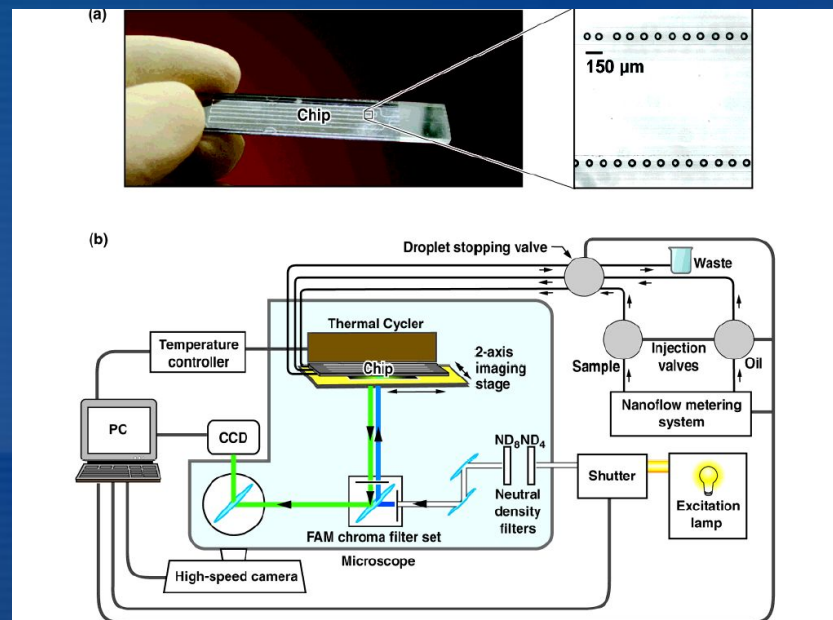
Анализ крови



ПЦР-анализ, ДНК-гибридизация



Real-time ПЦР на чипе



Применение биочипов

Lab-on-chip применения:
разработка лекарственных
средств, геномика, диагностика,
протеомика, IVD & POC,
высокопроизводительный
скрининг.

ДНК-чипы: экспрессия генов, SNP
генотипирование, диагностика
онкозаболеваний, геномика,
сельскохозяйственная
биотехнология, разработка
лекарств.

LOC

Другие применения: профили
экспрессии белков, диагностика
рака, токсикогеномика,
геномика, разработка лекарств.

Protein microarray : профили
экспрессии, протеомика,
высокопроизводительный
скрининг, диагностика, разработка
лекарств.

Заключение



- для разделения сложных смесей в протеомике используются методы:
 - SDS-электрофорез в ПААГ
 - изоэлектрическое фокусирование
 - нативный электрофорез
 - двумерный электрофорез**
 - изоэлектрическое фокусирование – разделение по величине изоэлектрических точек
- SDS-электрофорез в ПААГ – разделение по величине молекулярных масс
- ВЭЖХ
- «Лаборатория на чипе» – перспективное будущее анализа...