

Определение молекулярной массы белка актина методом электрофореза по Лэммли

Введение

В разных областях биологии и медицины очень важно знать молекулярную массу каких-либо веществ, в том числе и белков. Это необходимо для проведения исследований и опытов. Для определения молекулярной массы белков существуют различные методы, в том числе метод электрофореза. Этот метод является простым и эффективным для определения молекулярной массы белков.

В своей работе я решила испробовать эффективность данного метода на примере определения молекулярной массы белка актина, который встречается во всех клетках нашего организма.

Цель и задачи работы

Цель

Определить молекулярную массу мышечного белка актина методом электрофореза по Лэммли.

Задачи

-Найти и проанализировать информацию о строении мышечных белков.

-Изучить метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (по Лэммли).

-Провести определение молекулярной массы актина.

Белок актин

Актин - глобулярный белок, состоящий из одного полипептида, который полимеризуется с другими молекулами актина и образует две цепи, обвивающие друг друга. Белок актин содержится в тонких филаментах скелетных мышц и цитоскелете клеток.

По данным электронной микроскопии было обнаружено, что актиновые филаменты состоят из двух цепей глобулярных молекул, диаметром 4 нм и образующих двойную спираль (рис. 1), на каждый виток которой приходится 13,5 молекулы. Данные цепи составляют остов тонких филаментов скелетных мышц, которые помимо актина содержат миозин и другие белки [1,3].

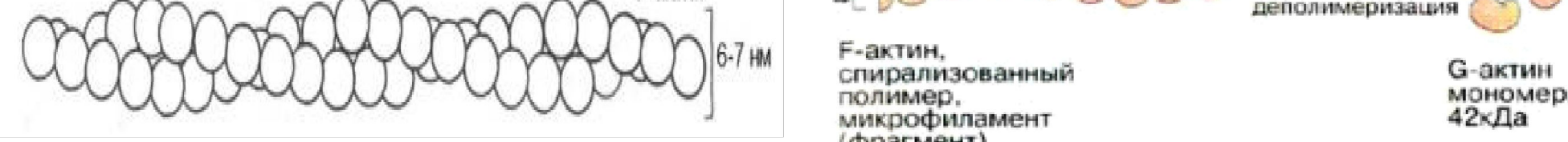


Рис. 1. Схематическое изображение белка актина.



Рис. 2. Схема полимеризации и деполимеризации актина.

Актин можно выделить путем экстракции мышечной ткани разбавленным соевым раствором. В результате обработки происходит расщепление актиновых филаментов на глобулярные субъединицы, так называемый *глобулярный актин* (*G-актин*), к которому присоединен ион кальция и одна молекула АТФ. При полимеризации белка (рис.2) происходит отщепление концевого фосфата молекулы АТФ и образование *фибриллярного актина* (*F-актин*).

Актин в мышцах и регуляция их работы

Мышца, важная часть опорно-двигательного аппарата представляет собой плотный орган, имеющий в своем составе активную часть - брюшко, состоящее из *мышечной ткани*, и *сухожильные концы*. Снаружи мышца покрыта фасцией. Пучки волокон отделены друг от друга соединительнотканными прослойками (*перимизий*). Между каждым мышечным волокном в свою очередь также имеется прослойка - *эндомизий*. В состав каждого мышечного волокна входят миофибриллы и образующие их актиновые и миозиновые филаменты.



Рис. 3. Строение мышцы: от фасции до филаментов

Рассмотрим механизм мышечного сокращения с участием актина и миозина. Сокращение волокон мышц является результатом цепи реакций [6] (рис.4):

Выполнения своей функции мышце необходимы механизмы регуляции, заставляющие скользить тонкие и толстые нити микрофиламентов друг относительно друга. «Скольжение» нитей вызывается изменением концентрации ионов кальция в межфибрилярном пространстве что в свою очередь вызовет [1].

Актин в составе цитоскелета клеток

Цитоскелет клетки - это совокупность нитевидных белковых структур -микротрубочек и микрофиламентов, в состав которых входит актин, составляющих опорно-двигательную систему клетки [5]. Цитоскелетом обладают только клетки эукариот, в то время как у клеток прокариот он отсутствует. На рисунке 5 представлен общий план строения составляющих цитоскелета клетки, куда входят: микрофиламенты, микротрубочки и промежуточные филаменты.

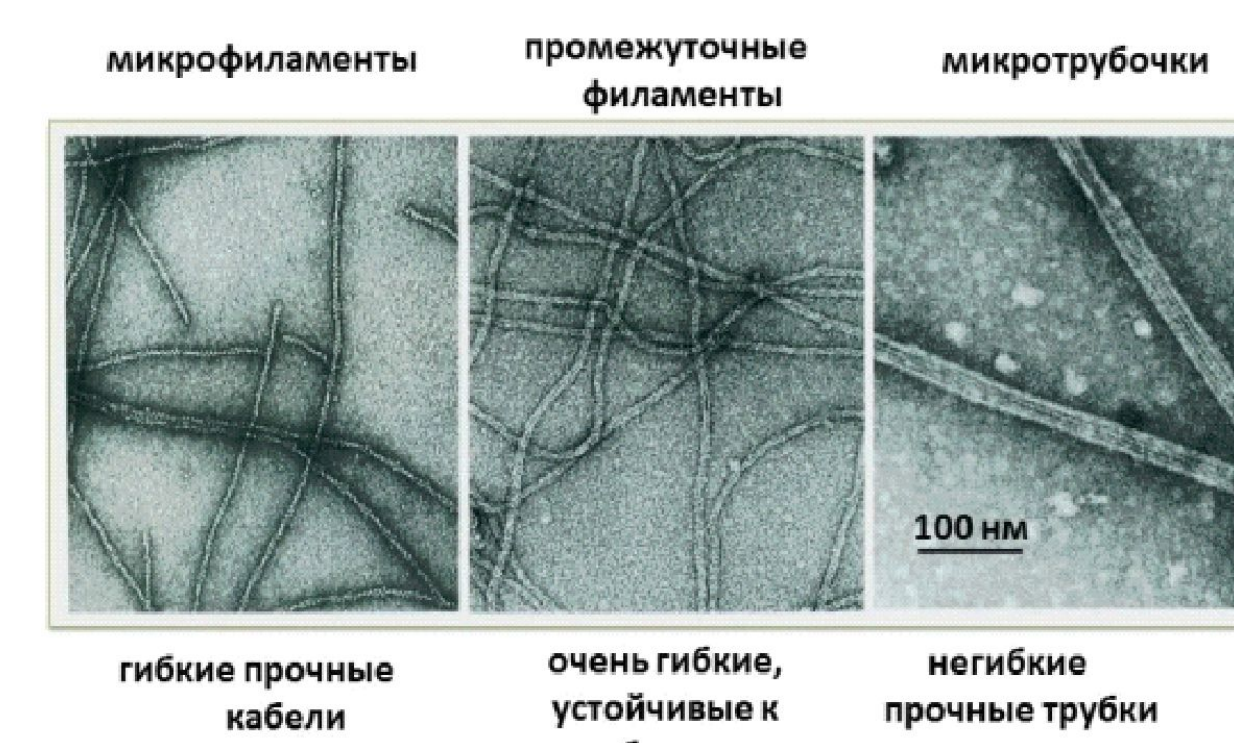


Рис. 5. Общий план строения составляющих цитоскелета

Авторы работы: Варганкина В. Д.

Руководитель: Нефёдова В. В.



ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ГОРОДА МОСКВЫ «КУРЧАТОВСКАЯ ШКОЛА»
Москва, улица Маршала Конева, дом 10. Тел: (499) 194-10-44. E-mail: kurchat@edu.mos.ru



Результаты

Был проведен электрофорез белков по методу Лэммли. Пробы наносили в лунки ПААГ в соответствии с таблицей 1 (рис 7).

Для того чтобы выяснить молекулярную массу представленного образца актина были использованы белки с уже известной молекулярной массой (белки маркеры). После окончания электрофореза была измерена длина пути, который прошел каждый из белков - маркеров. Следует отметить, что белок - маркер овальбумин прошел 11 мм пути. Такой же путь прошел и актин. После этого была построена калибровочная кривая при помощи программы Excel, и по ней была определена масса актина (рис. 15)

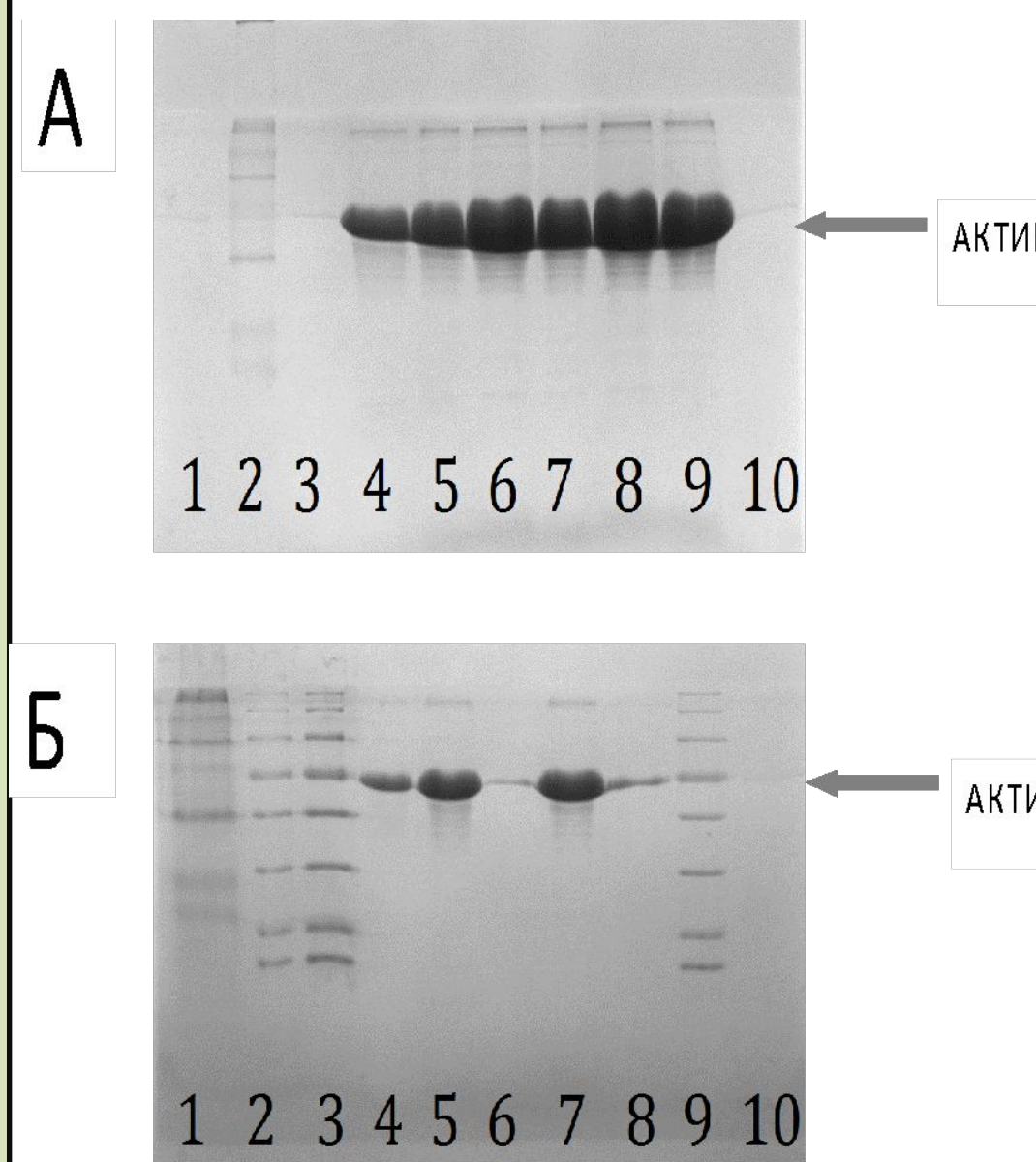


Рис. 6. Сканы гелей. А. гель 1, номера дорожек соответствуют таблице 4. Б. гель 2, номера дорожек соответствуют таблице на рис. 7. Показание актина показано стрелкой.

Молекулярная масса актина оказалась равной 46,7 кДа (значения, указанные в литературе - 42 кДа).

Расчеты:

$\log_{10}(45) = 1,7$ (логарифм молекулярной массы овальбумина)
 $\log_{10}(\text{молекулярная масса актина}) = -0,0245 \cdot l + 1,9384$ (l - длина пути; $l=11$)
 $\log_{10} = 1,7$, $M_r(\text{актин}) = 101,7$
 $M_r(\text{актин}) = 46,7$ кДа или 45700 г/моль

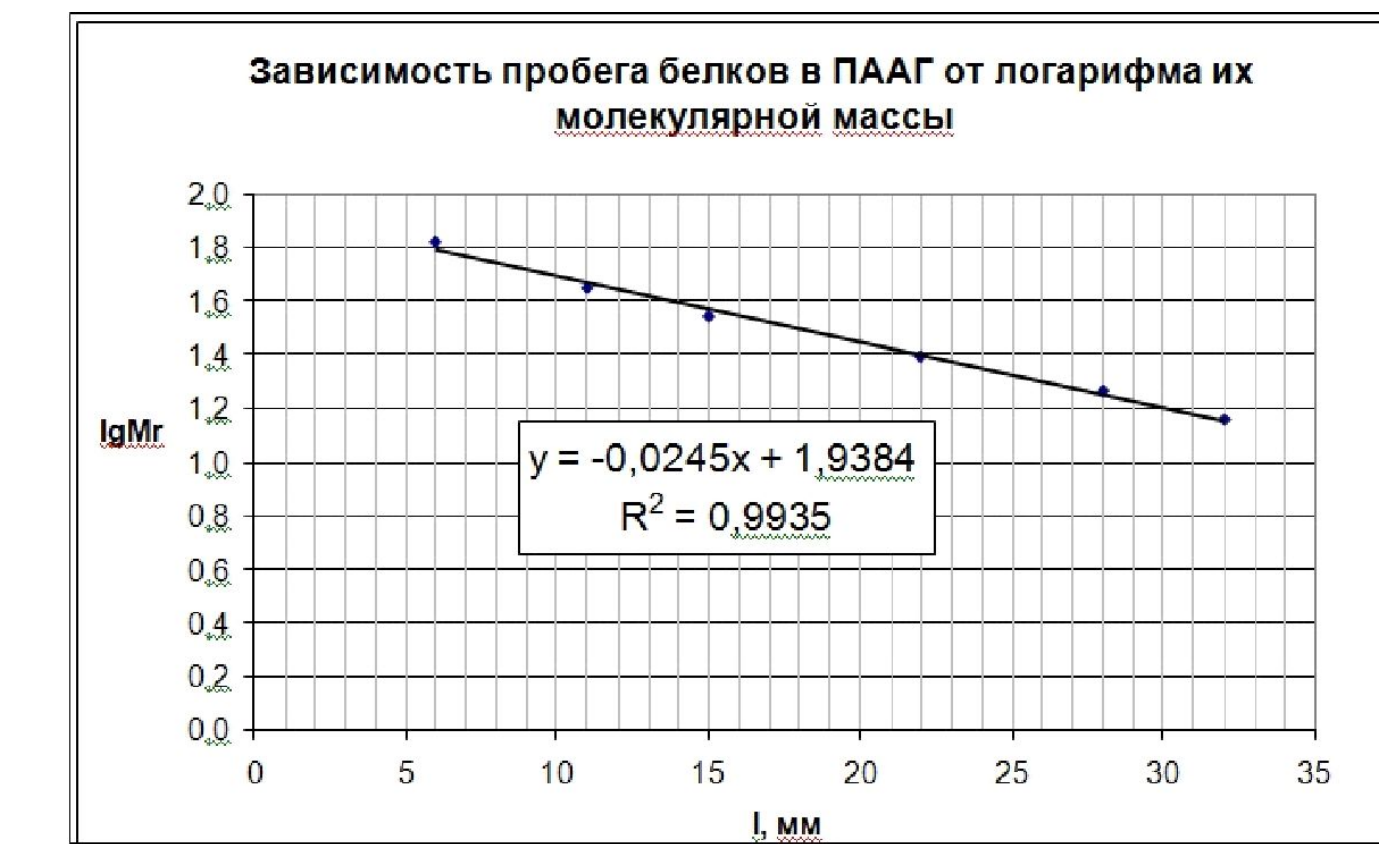


Рис. 8. Калибровочная прямая для определения массы белка и уравнение калибровочного графика

№ дорожки	Гель №1	Гель №2
1	-	Белок-маркеры окрашенные, 6 мг
2	Белок-маркеры неокрашенные, 2 мг	Белок-маркеры окрашенные, 4 мг
3	-	Белок-маркеры окрашенные, 2 мг
4	Актин, 4 мг	Актин, 4 мг
5	Актин, 6 мг	Актин, 6 мг
6	Актин, 8 мг	-
7	Актин, 10 мг	Актин, 6 мг
8	Актин, 12 мг	Актин, 2 мг
9	Актин, 14 мг	Белок-маркеры окрашенные, 4 мг
10	-	-

Рис. 7 (таблица 1)

Материалы и методы

Методы:

Для определения молекулярной массы белка актина был использован метод электрофореза по Лэммли, заключающийся в разделении заряженных молекул в электрическом поле. Весь процесс проходит в камере для электрофореза, заполненной всеми подготовленными ранее материалами (полимеризованный гель ПААГ с белками в лунках)(рис 9).

Материалы:

-Реактивы для Разделяющий ПААГ-15% и концентрирующий ПААГ- 6%, белки- маркеры, актин (рис. 10)

-Оборудование: камера для полимеризации геля BioRad (рис. 9), камера для проведения электрофореза Biorad Mini-protean Tetra Cell (рис. 11), источник тока Amersham Pharmacia Biotech (рис. 12).



Рис. 9. Заполненная камера для электрофореза с подключением к ней источником тока

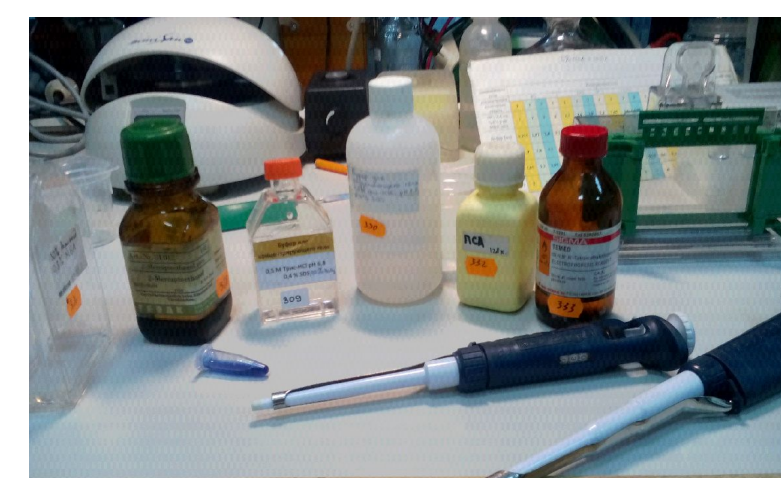


Рис. 10. Реактивы и оборудование

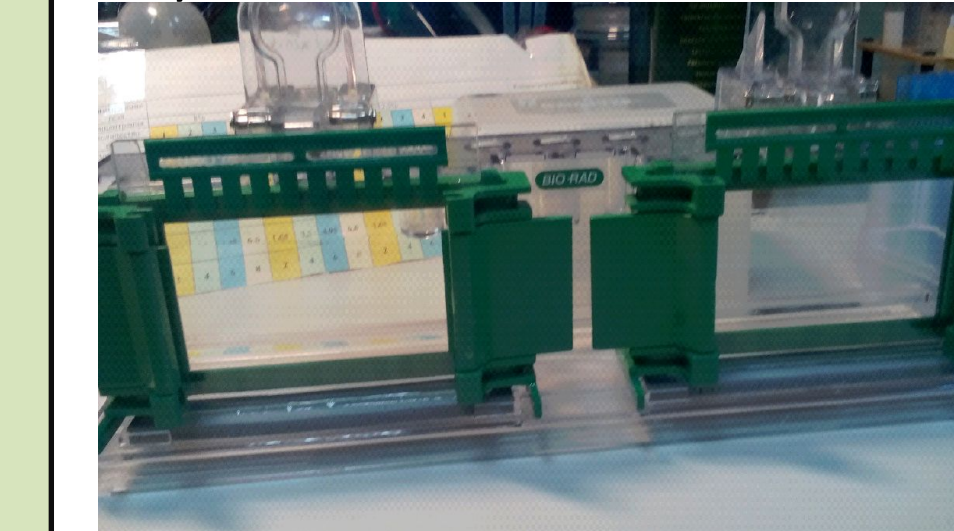


Рис. 11. Камера для гелей [1] с уже установленными гребенками [2], которые будут извлечены после полимеризации гелей

Электрофорезом по методу Лэммли можно определить молекулярную массу исследуемого белка, для этого проводят электрофорез в присутствии белков с известной молекулярной массой. После электрофореза идентифицируют белки - маркеры, измеряют расстояние, которое прошел белок- маркер в геле, и строят график в зависимости от логарифма их молекулярной массы. Далее, используя этот график, определяют массу неизвестного белка.



Рис. 12. Источник тока Amersham Pharmacia Biotech

Выводы

-Был освоен метод определения молекулярной массы белков с помощью электрофореза по Лэммли.
-Определена молекулярная масса актина, которая составила 46,7 кДа.

Перспективы/Список литературы

1. Гусев Н. Б. (2000) «Молекулярные механизмы мышечного сокращения», Соросовский образовательный журнал № 8
2. www.chem.msu.ru
3. www.humbio.ru
4. Теремов А. В., Петросова Р. А. - Биология 10 класс, учебник
5. www.sbio.info
6. www.msscience.ru
7. М. И. Сафронова, Н.Н. Зайцева «Основы практической биохимии белка»