

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

ПОДГОТОВИЛ: СИГИН
ВЛАДИМИР
ГРУППА 3.5.11

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Электрофорез (от электро- и др.-греч. φορέω — «переношу») — это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.

Электрофорез в биохимии - это способ пространственного разделения молекул, имеющих разный заряд и размеры, путем помещения их в электрическое поле.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В растворе белки находятся в виде **заряженных частиц**. Заряд на поверхности белков возникает в результате диссоциации группировок, находящихся в боковых радикалах аминокислот, а также при связывании ионов. Так как степень диссоциации группировок зависит от pH раствора, то величина и знак

суммарного заряда белковой молекулы зависят от pH среды, а также от ионной силы (**интенсивности электрического поля**, создаваемого ионами в растворе).

Для расчета ионной силы следует найти произведение концентрации каждого иона на квадрат его заряда, сложить все полученные величины и итоговую сумму разделить пополам.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i Z_i^2$$

где c_i — молярные концентрации отдельных ионов (моль/л), Z_i - заряды ионов.

Суммирование проводится по всем типам ионов, присутствующих в растворе. Если в растворе присутствуют два или несколько электролитов, то вычисляется общая суммарная ионная сила раствора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Для каждого белка существует такое значение pH среды (обозначаемое как pI – **изоэлектрическая точка**)

Из-за разницы в аминокислотном составе разные белки имеют разные значения pI .

При $pH \neq pI$ молекулы белка приобретают заряд и под действием электрического поля перемещаются к противоположно заряженному электроду - **катоде** (-) или **аноду** (+). Например, кислые белки, богатые моноаминодикарбоновыми аминокислотами (асп, глу), в слабощелочном буфере приобретут отрицательный суммарный заряд из-за диссоциации $COOH$ - групп до COO^- и H^+ и будут двигаться к аноду.

Для электрофоретического разделения оптимально такое значение pH рабочего буфера, которое обуславливает максимальное **различие** зарядов разных белков, составляющих исходную смесь, а не их максимальный заряд. Обычно электрофорез проводят в среде (буфере) со значением pH, на 3 — 4 единицы отличающимся от среднего значения pI для белков данного типа.

НЕМНОГО ТЕОРИИ 😞

При проведении электрофореза электрическое поле создают с помощью **источника питания** – стабилизированного выпрямителя, способного давать регулируемое напряжение до 500 – 1000 В при силе тока в несколько десятков миллиампер (мА).

ϕ – потенциал, В (вольт). Потенциал в данной точке электрического поля численно равен работе, совершаемой электрическими силами при перемещении единичного положительного заряда из этой точки в бесконечность.

U – напряжение, В (вольт). Напряжение на участке электрической цепи равно разности потенциалов на концах этого участка, если на этом участке нет источника сторонних сил, разделяющих разноименные заряды (отсутствуют гальванические элементы, фотоэлементы, генераторы магнитного поля и т.д.)

При электрофорезе участок электрической цепи – это буфер. В буфере отсутствуют источники сторонних сил, поэтому:

$$U = \phi_1 - \phi_2 = \Delta \phi$$

По закону Ома: $U = I \cdot R$

E – напряженность электрического поля, В/см.

$E = \Delta \phi / L = U / L$ где L – длина проводника (см).

НЕМНОГО ТЕОРИИ 😞

Электрофорез проводят в однородном электрическом поле, то есть поле, напряженность E которого во всех точках одинакова. Электрический ток пропускают через проводник - буферный раствор, налитый в канал из изолирующего материала (например, стекла) или пропитывающий какую-либо поддерживающую среду - носитель (например, бумагу или гель). Сопротивление R буферного раствора задается двумя факторами: концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью.

Электрофоретической подвижностью (u) данной молекулы называют скорость движения заряженной молекулы (выражаемой в см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1 В/см. Единицей электрофоретической подвижности является $\text{см}^2/\text{ч}\cdot\text{В}$.

$$u = V / E$$

где u – электрофоретическая подвижность белковой молекулы,

V – скорость миграции белковой молекулы,

E – напряженность электрического поля.

НЕМНОГО ТЕОРИИ 😞

Именно различия в электрофоретической подвижности белков, содержащихся в анализируемой смеси, делают возможным разделить эти белки в пространстве. Скорость v движения белков к тому или иному электроду снижается из-за их трения об окружающую среду. Сила трения (или, иначе, сопротивления

окружающей среды) прямо пропорциональна скорости движения белковых молекул:

$$F_{\text{трения}} = f \times v$$

где f – коэффициент трения. Он зависит как от размера, формы и степени гидратированности этой молекулы, так и от свойств самой среды.

Электрофоретическая подвижность связана с коэффициентом трения в соответствии с уравнением:

$$u = q / f$$

где q – общий заряд молекулы белка.

НЕМНОГО ТЕОРИИ ☹️

Основная проблема заключается в описании сил, действующих на частицу или большую молекулу, плавающую в жидком растворе, содержащем подвижные ионы.

Молекула нарушает распределение ионов в окружающей жидкости из-за необходимости равновесия, обусловленной балансом электростатики и броуновских сил.

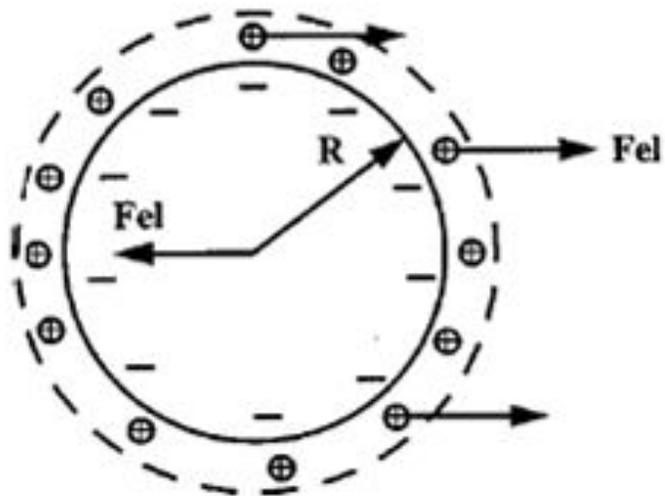


Рисунок 1 Схематическое изображение отрицательно заряженной сферической частицы радиуса $R > \kappa^{-1}$ при электрофорезе в электролите.

НЕМНОГО ТЕОРИИ 😞

Это проявляется в существовании **двух** слоев жидкости: один, непосредственно окружающий молекулу, в котором происходит постоянное поглощение ионов, и дальний, где ионы сохраняют мобильность. Регион, содержащий неподвижные заряды, называется **слоем Штерна** и представляет собой комбинацию слоев с зарядами противоположных знаков. Однако разница между слоем Штерна и диффузионным слоем непостоянна и зависит от времени регистрации.

Толщина слоя Штерна определяется **по уравнению Бьеррума**:

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_b\epsilon_0kT}$$

где ϵ_b - диэлектрическая проницаемость жидкости. В воде при комнатной температуре l_B составляет около **0,7 nm**.

НЕМНОГО ТЕОРИИ ☹️

Теория поля определяет равновесие в распределении подвижных ионов по уравнению **Пуассона-Больцмана**:

$$\epsilon_b \epsilon_0 \nabla^2 V_p = -e \sum_k Z_k C_k \exp(-e z_k V_p / kT)$$

здесь, $e z_k$ и C_k – заряд и концентрация ионов вида k , соответственно.

Линеаризацию уравнения дает **теория Дебая-Хюккеля** (каждый ион действием своего электрического заряда поляризует окружение и образует вокруг себя некоторое преобладание ионов противоположного знака — так называемое **ионное облако**), применяемая к диффузионному слою. Согласно этой теории, потенциал верхнего слоя $V_p(x)$, снижается экспоненциально от уровня поверхностного потенциала V_s ,

$$V_p(x) = V_s e^{-kx}$$

НЕМНОГО ТЕОРИИ ☹️

Длина Дебая κ^{-1} определяется по формуле

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon_b \varepsilon_0 kT}{e^2 \sum_k z_i^2 C_i} \right)^{1/2}$$

При приложении внешнего электрического поля, которое воздействует на поток с рассматриваемыми заряженными частицами, принимаемый для простоты за постоянный, поле воздействует не только на частицы, но и на ионы её окружающие. А так как в ионном облаке содержатся частицы противоположных знаков, то они начинают двигаться в противоположных направлениях, а также оказывать гидродинамическое воздействие на ионы пробы. Скорость последней можно определить. Для случая, когда толщина слоя Дебая велика ($\kappa^{-1} > R$, где R -радиус частицы), внешнее электрическое поле и силы вязкости действуют независимо друг от друга в противоположных направлениях. Скорость определяется в этом случае как QE , где Q -заряд частицы.

НЕМНОГО ТЕОРИИ 😞

Подвижность этой частицы в случае её сферичности определяется по **уравнению Хьюккеля**

$$\mu = v / E = Q / 6\pi\eta R.$$

В противном случае, когда слой Дебая тонок и сравним с размерами частицы, то её скорость становится независимой от размера и формы:

$$\mu = \frac{\varepsilon_b \varepsilon_0 \zeta}{\eta}$$

где **ζ-зета** потенциал, который представляет собой потенциал на поверхности частицы

НЕМНОГО ТЕОРИИ ☹️

РЕЗЮМЕ

Электрофоретическая подвижность белка зависит:

- от самой молекулы: ее размера (молекулярной массы), формы, электрического заряда, степени диссоциации и гидратации,
- от концентрации молекул, - от среды: ее вязкости, рН, температуры и ионной силы,
- от характеристик используемого электрического поля.

ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает многими качествами идеального носителя (Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный). Имея свойства молекулярного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение белковых смесей не только по заряду, но и по размеру и форме частиц. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля.

ПААГ формируют путем сополимеризации акриламида (создающего линейную “основу”) и N, N’-метиленабисакриламида (служащего для поперечных “сшивок” линейных цепей).



ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50% можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, содержащем 7,5% акриламида, равен 5 нм, а 30% акриламида –

2 нм. При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу (M_r) разделенную на количество веществ.

Выбор концентрации акриламида
при разном диапазоне молекулярных масс исследуемых белков

Размер белка, кДа	Концентрация акриламида, %
36 - 205	5
24 - 205	7,5
14 - 205	10
14 - 66	12,5
10 - 45	15

ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля. Каждый второй углеродный атом линейной цепи содержит кислотную амидную группу, что обеспечивает гидрофильность полимера. В то же время ПААГ не содержит ионизируемых групп.

→ подвигтися на
сітку ←

ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Для сополимеризации нужны инициаторы и катализаторы (окислительно-восстановительные системы - источники свободных радикалов). Чаще всего используют систему из двух компонентов, представленных ниже:

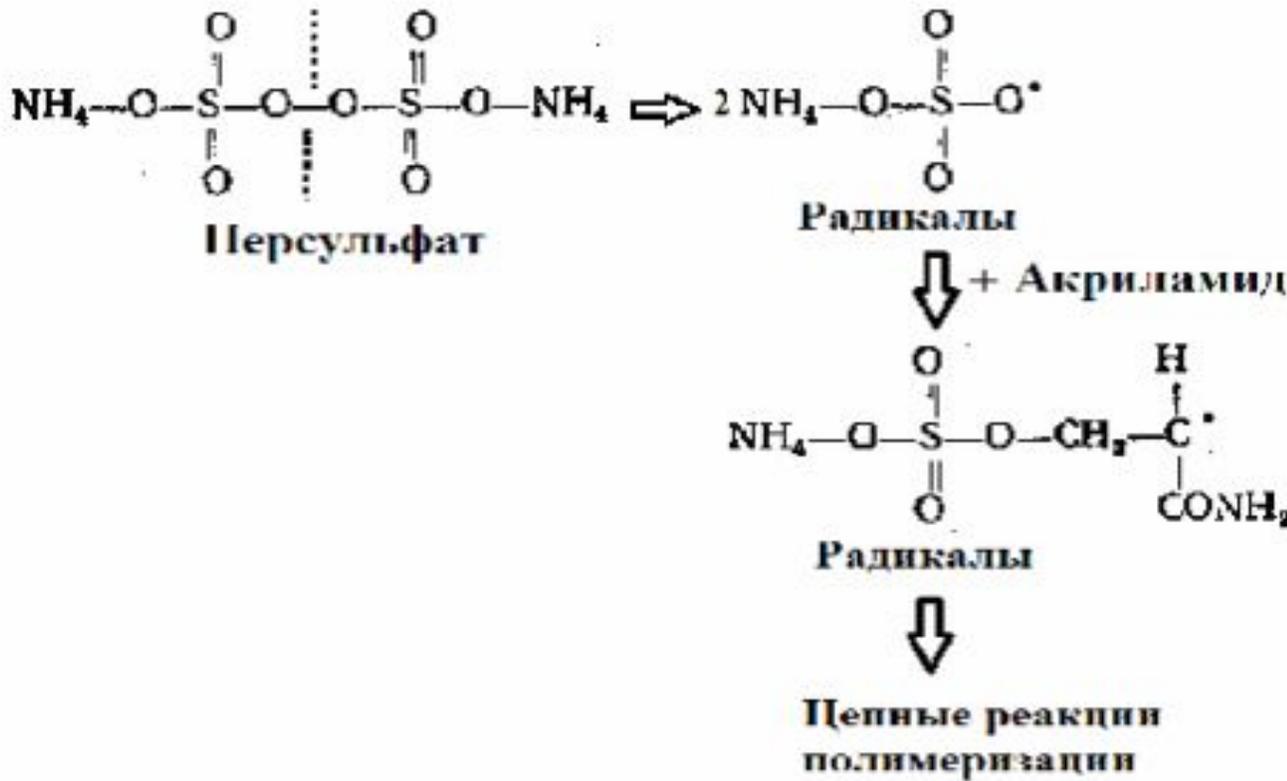
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ – персульфат аммония.

Функция: инициатор

полимеризации
 $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД)

Функция: катализатор образования ПААГ

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ
ПЕРСУЛЬФАТА



НАЗА
Д

При разрыве связи O-O образуются два свободных радикала, каждый из которых стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней, также образуя свободные радикалы. Каждый такой радикал, в свою очередь, вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с образованием нового радикала, и т. д. Цепная реакция полимеризации идет до тех пор, пока два радикала, встретившись между собой, не образуют обычную ковалентную связь. По такому же механизму в растущую цепочку линейного полимера одной из своих концевых винильных групп может встроиться метиленбисакриламид. Если его второй конец встроится в состав другой линейной полимерной цепочки, то образуется «сшивка». Без агента, образующего поперечные сшивки, в геле образуются лишь продольно расположенные длинные тонкие волокна

ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

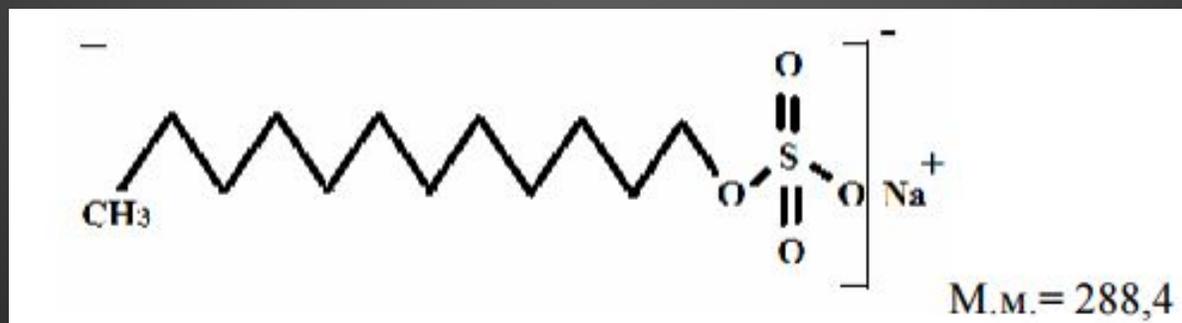
В полиакриламидном геле можно проводить как **нативный электрофорез**, так и **электрофорез в денатурирующих условиях**.

Нативный электрофорез в ПААГ служит для разделения не подвергнутых денатурации белков (то есть белков в нативном состоянии), в том числе – в случаях, когда необходимо сохранить ферментативную или любую другую функциональную активность белков.

В случае, когда требуется фракционировать белки исключительно по молекулярной массе, применяют ПААГ-электрофорез в **денатурирующих** условиях. Этот метод позволяет оценить количество полипептидов в белковой смеси, им достигается очень четкое разделение зон, но активность ферментов полностью или в значительной мере может быть утрачена из-за их денатурации.

ПААГ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Денатурирующие условия достигаются путем обработки пробы трехкратным избытком додецилсульфата натрия (SDS). Анион SDS несет отрицательный заряд.



Благодаря гидрофобным взаимодействиям анионы SDS сорбируются на белках пропорционально их объему, превращая любой полипептид в неразветвленный стержень с отрицательным зарядом.

для полной денатурации белки, имеющие **S-S-связи**, до применения SDS обрабатывают **β-меркаптоэтанолом**.

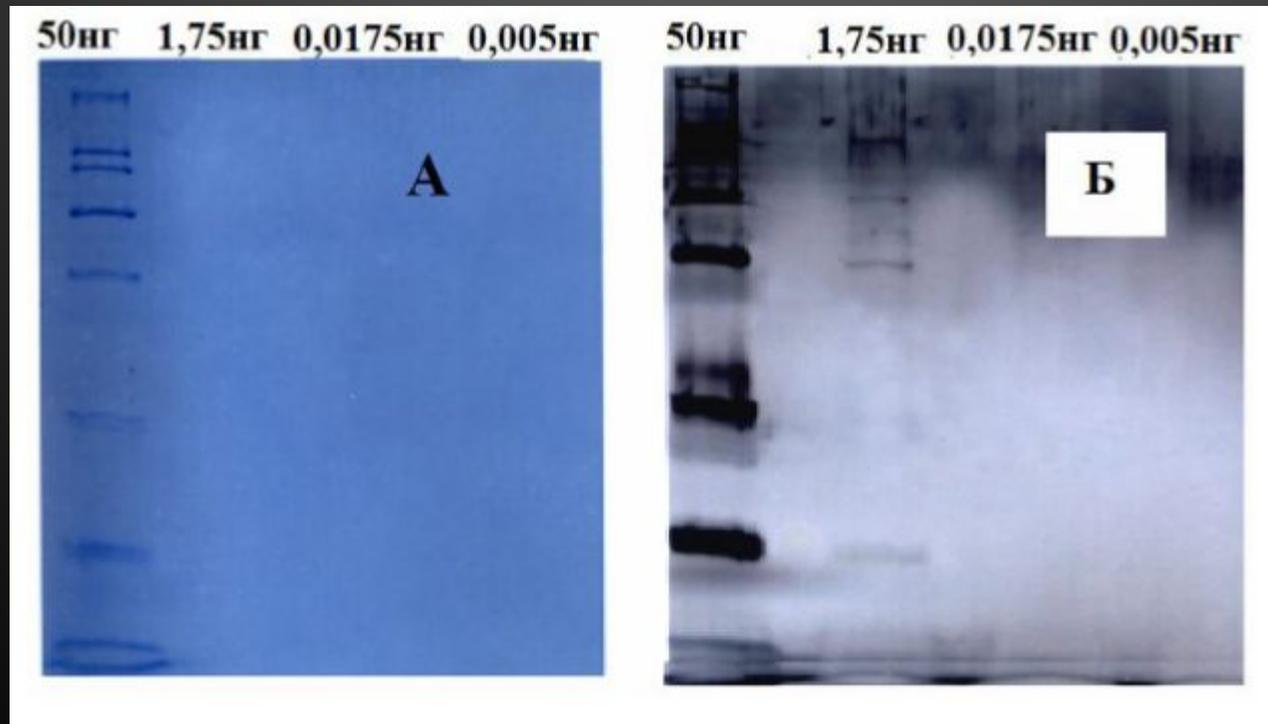
СПРОСОБЫ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

Зоны разделившихся белков удобно анализировать, если их проявить – сделать видимыми **невооруженным** глазом. Проявление осуществляют либо с целью обнаружения всех белков, либо только белков с определенной ферментативной активностью. В последнем случае получают **зимограммы** (энзимограммы).

Разделившиеся зоны белков фиксируют осаждением смесью **уксусной кислоты** и **этанола** (реже – метанола) и окрашивают, используя раствор красителя. Фиксация предотвращает размывание зон из-за диффузии белковых молекул в геле.

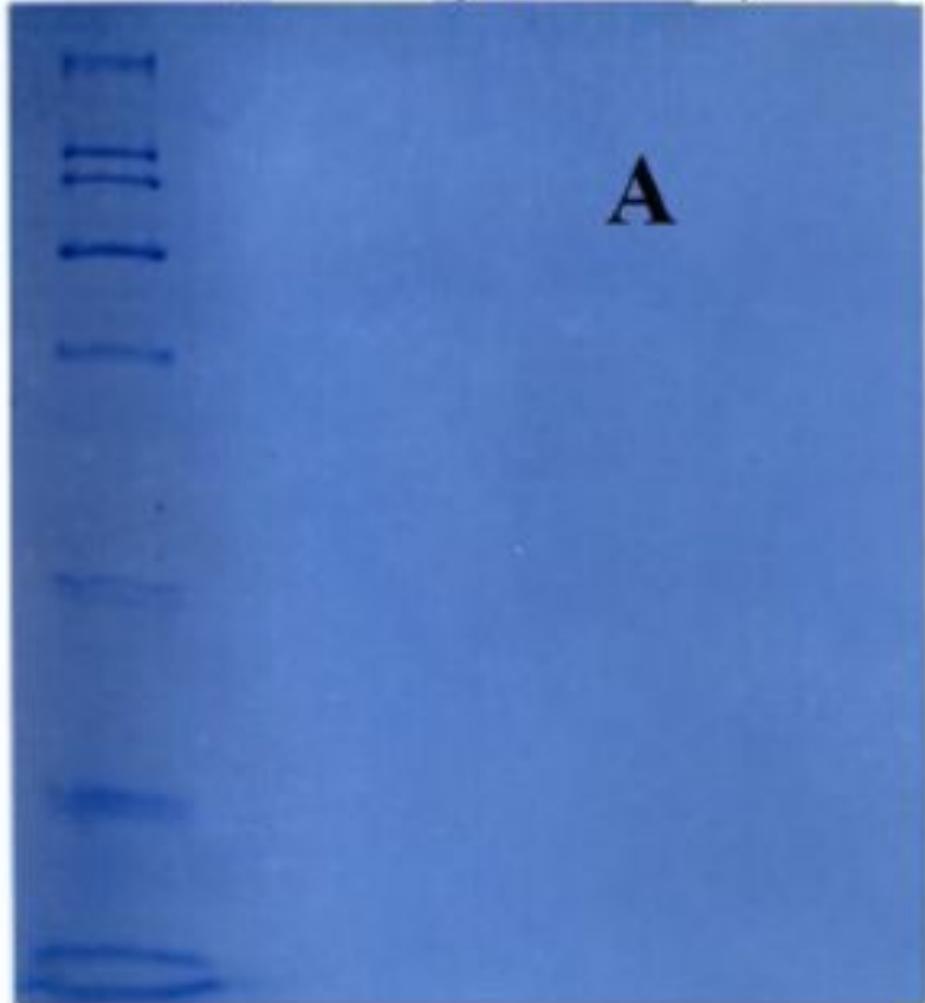
СПРОСОБЫ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

В настоящее время самым удобным и широко используемым является краситель **кумасси ярко-синий**, или бриллиантовый синий («**Coomassie brilliant blue**», он же ксилоловый яркий цианин), выпускаемый в двух модификациях: R250 и G-250



СПРОСОБЫ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕГРАММ

50нг 1,75нг 0,0175нг 0,005нг



50нг 1,75нг 0,0175нг 0,005нг

