

**ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ
В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ
ГЕЛЕ
и ВЕСТЕРН-БЛОТТИНГ**

Электрофорез - это движение заряженных частиц в растворе под действием электрического поля.

Электрофореграмма – картина, полученная после разделения сложной смеси с помощью электрофореза и специфического проявления.

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.

Классификация электрофоретических методов

Основными типами электрофореза являются:

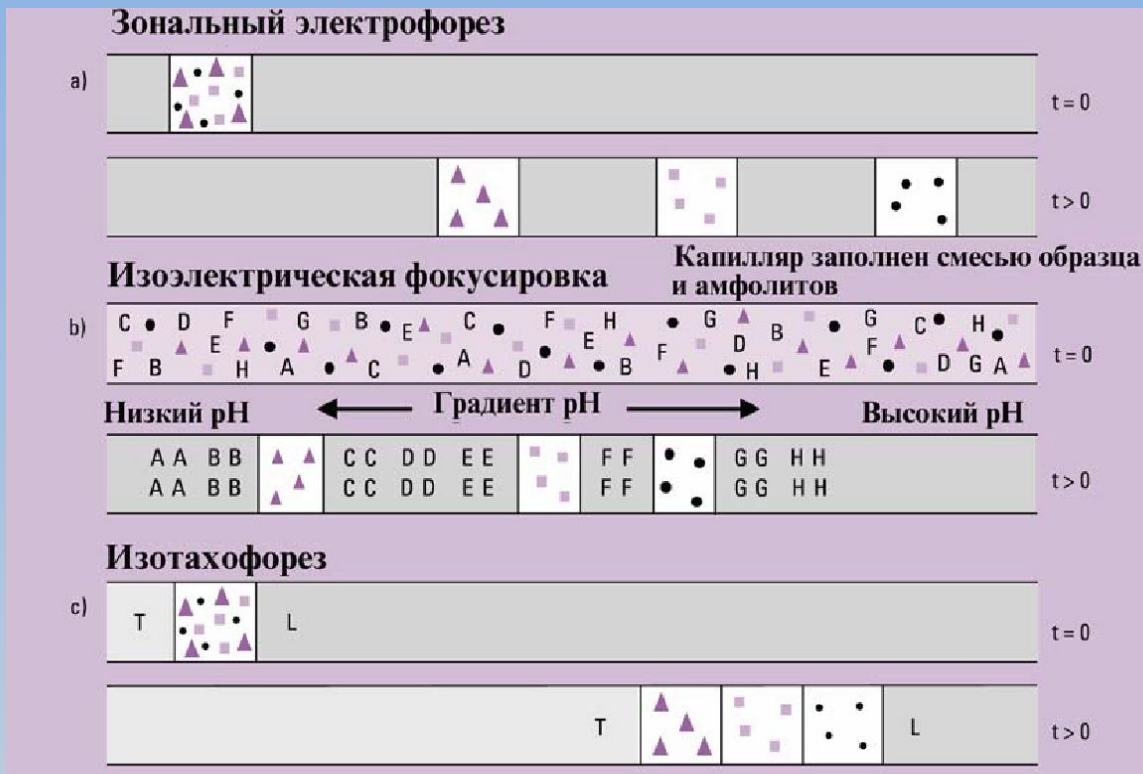
- *изоэлектрическое фокусирование,*
- *зональный электрофорез,*
- *изотахофорез,*
- *иммуноэлектрофорез.*

При изоэлектрическом фокусировании в среде для электрофореза создается плавный градиент рН. Белок останавливается в зоне, где значение рН равно его изоэлектрической точке (pI). Для создания градиента рН обычно используют раствор полиамино-поликарбонновых кислот, которым насыщают носитель. В отсутствие электрического поля эта смесь обычно имеет рН=6,5. При наложении электрического поля указанные кислоты обеспечивают линейный градиент рН от 3 до 10.

- Основы метода были заложены в начале 20в. Этот принцип был использован для выделения вазопрессина и окситоцина из экстракта гипофиза (Du Vigneaud et al., 1938).
- Сформировался метод ИЭФ в его современном виде только к 1969г. (Vesterberg)
- Особенности ИЭФ, отличающие его от электрофореза: белки мигрируют с замедлением, а начальный объем препарата не влияет на конечное положение белковой зоны. В процессе ИЭФ участвуют не все ионогенные группы данного белка, а только те, которые лежат на поверхности белковой глобулы и контактируют с растворителем.

Примеры применения:

- ИЭФ пептидов (высокая разрешающая способность и эффект изоэлектрического концентрирования сфокусированных фрагментов)
- ИЭФ клеток, субклеточных частиц, бактерий и вирусов
- ИЭФ ферритинов (выявление его микрогетерогенности, число зон и распределение ферритинов в тканях)
- ИЭФ гемоглобинов



Зональный капиллярный электрофорез ведется при постоянном (не изменяющемся) значении pH буферного раствора, заполняющего данный носитель (бумагу, гель, др.). Исследуемый образец наносится пятном или тонким слоем на носитель, по которому и перемещается в электрическом поле.

Усложненным вариантом зонального электрофореза является диск-электрофорез (многофазный зональный электрофорез), при котором pH и другие характеристики, постоянные внутри одной “фазы”, при переходе к другой “фазе” скачкообразно изменяются.

Примеры применения: анализ аминокислот, пептидов, ионов, широкого диапазона оптических изомеров, многочисленных прочих (ионных) веществ.

В случае изотахофореза - метод разделения "с движущейся границей". В условиях изотахофореза все ионы перемещаются с одной и той же скоростью, но располагаются друг за другом в соответствии с их подвижностями. Концентрация ионов в каждой зоне зависит от концентрации предшествующего иона. Это означает, что концентрация ионов в любой зоне определяется первым, или ведущим, ионом. Необходимо, чтобы исследуемый ион находился между ведущим и замыкающим ионами. За одно разделение, возможен анализ или катионов, или анионов. Обладает очень высокой разрешающей способностью

Применение: Применялся для получения гемоглобина человека, продуктов распада фибриногена, а также при изучении белков сыворотки крови и спинномозговой жидкости человека.

Иммуноэлектрофорез сочетает в себе электрофоретическое разделение белков с иммунопреципитацией, основанной на реакции "антиген – антитело". Этот тип электрофореза превосходит остальные по чувствительности и разрешающей способности.

Существуют различные варианты иммуноэлектрофореза. Сочетание электрофореза с двойной иммунодиффузией впервые описали в 1953 г. Грабар и Уильямс. В 1955 г. Шейдеггер впервые предложил микровариант иммуноэлектрофореза. Благодаря этому простому и быстрому методу иммуноэлектрофорез нашел широкое применение.

По цели различают:

- *аналитический* (для анализа состава смеси, проанализировать вещество качественно и (или) количественно) электрофорез,
- *препаративный* (для получения препаратов - значительных количеств чистых веществ) электрофорез.

По степени денатурации разделяемых белков различают:

- *нативный* электрофорез,
- *электрофорез в денатурирующих условиях*.

В отличие от нативного электрофореза, электрофорез в денатурирующих условиях предполагает применение химических реагентов, разрушающих пространственную структуру разделяемых белков.

По направлению фракционирования выделяют электрофорез, при котором белки движутся в *одном* направлении, и *двумерный* электрофорез, при котором сначала проводят разделение в *одном* направлении, а затем – в *направлении, перпендикулярном* первому. Двумерный электрофорез позволяет резко увеличить разрешающую способность при разделении смесей, состоящих из большого количества разных белков. Различные белки мигрируют в одной зоне либо в силу близости их размеров, либо ввиду совпадения значений их электрофоретических подвижностей при выбранном значении pH, для их разделения используют 2D-форез.

В зависимости от ориентации носителя (геля, бумаги, др.) электрофорез может быть *вертикальным* или *горизонтальным*.

Классификация по типу носителя жидкой фазы (развитие в историческом аспекте)

Название метода, носитель	Преимущества метода и/или носителя	Недостатки
Электрофорез с подвижной границей (в свободном растворе). Носителя нет.	Первый электрофоретический метод, позволивший разделять белки.	Конвекция – перемешивания разделяемых зон; нужна проба в десятки мг белка, разрешающая способность мала.
На фильтровальной или хроматографической бумаге (50е годы XX в.)	Сниженная конвекция, разделенные зоны можно зафиксировать и окрасить. Оборудование проще.	Непрозрачность. Загрязнения и неоднородность бумаги мешают разделению. “Хвосты” на электрофореграммах из-за высокой адсорбционной емкости. Фон окрашивается, что затрудняет распознавание белковых зон.
На пленках из ацетата целлюлозы (известен с 1957г.)	Быстрый, требует меньшего количества пробы для анализа. Низкая адсорбционная емкость помогает избежать появления “хвостов” на электрофореграмме. После окрашивания фон остается бесцветным. Пригодны для иммуноэлектрофореза.	Непрозрачность в водных растворах (можно добиться прозрачности, погрузив в минеральное масло). Дороже, чем при использовании бумаги. Мало пригоден для препаративного электрофореза.
В крахмальном геле (предложен О. Смитисом)	Первый носитель со свойствами молекулярного сита. Активно препятствует конвекции. Повышает разрешение.	Низкая прозрачность, хрупкость, размер пор можно менять лишь в небольших пределах. Приготовление качественного геля трудоемко.
В агаровом и агарозном гелях	Удовлетворительная прозрачность, высокая пластичность (проще резать, удобнее красить и определять ферментативную активность прямо в геле), простота изготовления.	Из-за отрицательного заряда на сульфатных и СООН-группах сетки агара возникает электроосмос, приводящий к неравномерному распределению электрического поля, а иногда – гидростатического давления. Возможно химическое взаимодействие веществ с агаром.
В полиакриламидном (ПААГ) геле (предложен Л. Орнстейном и Д. Дэвисом)	Химически инертен, можно кипятить. Можно задать необходимый размер пор и обеспечить свойства молекулярного сита. Высокая прозрачность. Легко готовить. Упругий, прочный.	На сегодняшний день наилучший носитель, но готовится из акриламида - ядовитого вещества.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Идеальный носитель должен:

- а) резко снижать конвекцию;
- б) быть простым в приготовлении;
- в) иметь высокую теплопроводность (при низкой теплопроводности трудно охладить систему);
- г) обладать низкой адсорбционной емкостью и химической инертностью в отношении веществ, подвергаемых электрофорезу;
- д) не иметь заряда на поверхности частиц, чтобы не вызывать эндоэлектроосмос.

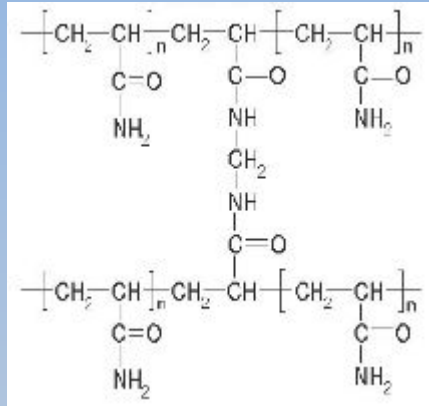
Выбор концентрации акриламида при разном диапазоне молекулярных масс исследуемых белков

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

ПААГ формируют путем сополимеризации **акриламида** (создающего линейную “основу”) и **N, N’-метиленбисакриламида** (служащего для поперечных “сшивок” линейных цепей). В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля.



Акриламид

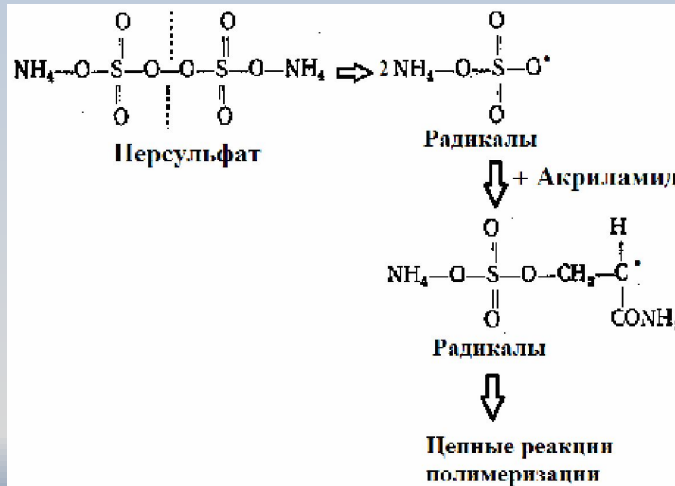


N, N’ -метиленбисакриламид

Для сополимеризации нужны инициатор и катализатор.

□ $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ Персульфат аммония (ПСА).

□ $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД)

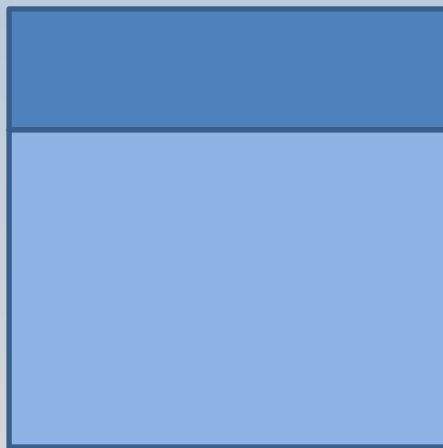


Когда требуется фракционировать белки исключительно по молекулярной массе - *ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях*. Такая система была разработана У. К. Лэмли (Laemli, U.K., Nature, 227, 680 (1970)). Этот метод позволяет оценить количество полипептидов в белковой смеси.

Денатурирующие условия достигаются путем обработки пробы трехкратным избытком SDS.



SDS сорбируются на белках пропорционально их объему, превращая любой полипептид в неразветвленный стержень с отрицательным зарядом, значительно превышающим собственный заряд белковой молекулы.



концентрирующий гель (крупнопористый, ограничивает диффузию, но не обеспечивает гелю свойства молекулярного сита). рН 6,8

разрешающий гель рН 8,8

Разрешающий гель

вода/изопропанол

10ml	5%	6%	7.5%	10%	12.5%	15%
AA, 30% ml	1.66 6	2.0	2.5	3.33	4.16	5.0
H ₂ O, mQ ml	4.38 4	4.05	3.55	2.72	1.89	1.05

	Конц.	Сток	10ml
Tris-Cl pH 8.8	375mM	1M	3.75ml
SDS	0.1%	10%	0.1ml
PSA	0.1%	10%	0.1ml
TEMED	0.08%	100%	8μl

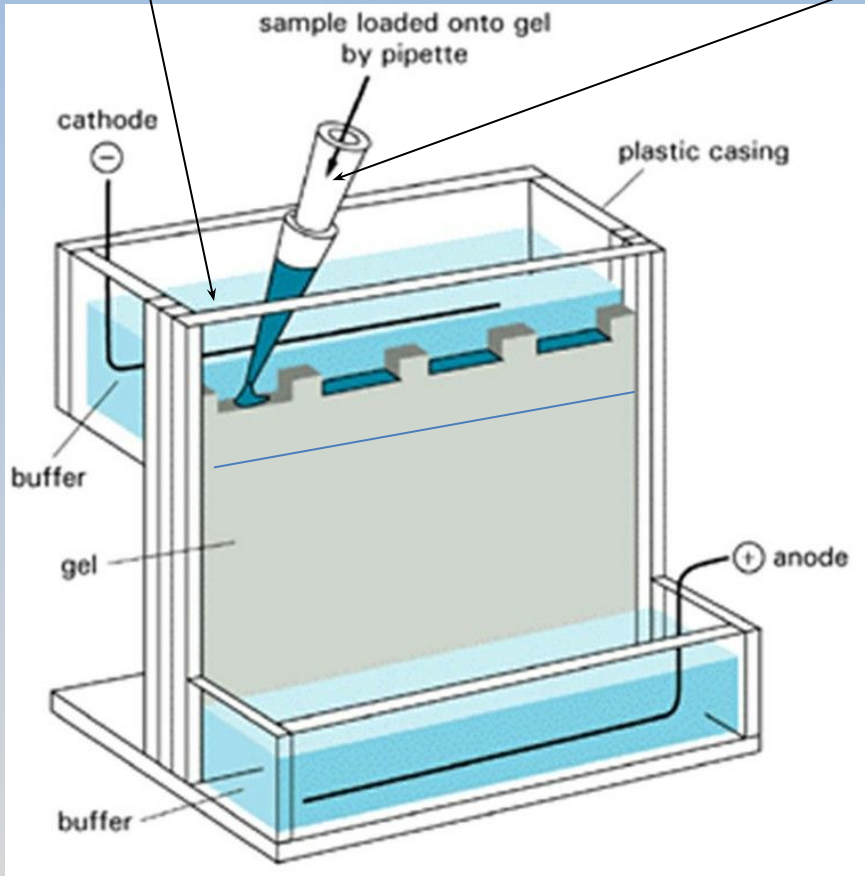


Концентрирующий гель

Конц.	Сток	1ml	2ml	3ml
H ₂ O		mQ	0.68ml	1.4ml
AA	5%	30%	0.17ml	0.33ml
TrisxCl pH6.8	0.13M	1M	0.13ml	0.25ml
SDS	0.1%	10%	10μl	20μl
PSA	0.1%	10%	10μl	20μl
TEMED	1μl/ml		1μl	2μl

Tris-Glycine buffer 5x, pH 8.3 (доводить не надо), (хранить основной сток при +4°C, рабочий сток – при NT).

SDS- gel loading buffer (Tris-HCl pH 6.8, β-MeEtOH, SDS, Bromphenol blue, Glycerol) + образец



Лизис образцов

Protein location	Buffer recommended
Whole Cell	NP-40 or RIPA
Cytoplasmic (soluble)	Tris-HCl
Cytoplasmic (cytoskeletal bound)	Tris-Triton
Membrane bound	NP-40 or RIPA
Nuclear	RIPA or use nuclear fraction protocol*
Mitochondria	RIPA or use mitochondrial fraction protocol*

+ ингибитор протеаз (или PMSF)

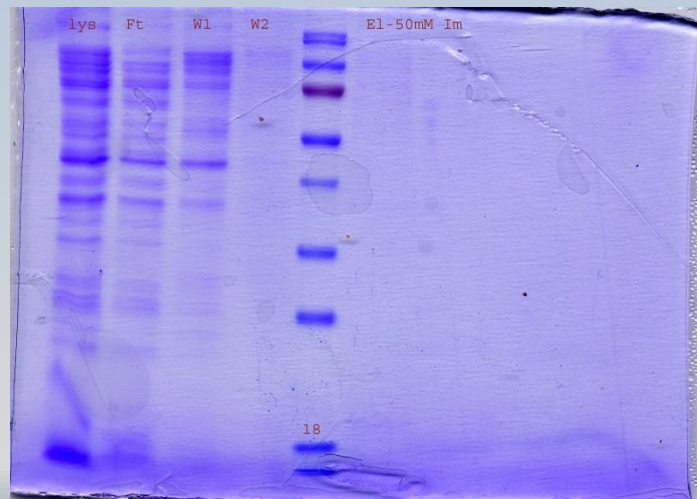
На льду 10 мин-2 ч, затем Цф, используют супернатант.

Пробы денатурируют и нагревают (95-100°C) с буфером для нанесения.

Способы проявления электрофореграмм

- заранее метят *хромофором* (например, флуорескамином), и обнаруживают по флуоресценции в УФ-области спектра
- Используют *радиоактивную метку* (радиоактивным углеродом или йодом). Регистрацию полос в этом случае проводят методом автордиографии с помощью рентгеновской пленки.
- Окрашивание: амидочерный, кумасси ярко-синий (G-250 0,3-1 мкг белка - чувствительность, R-250 10нг белка), Zn/имидазол, нитрат серебра.

Разделившиеся зоны белков фиксируют смесью уксусной кислоты и этанола (реже – метанола) , только этанола 40% или раствором ТХУ , затем окрашивают.



Вестерн-блоттинг

Или *иммуноблоттинг* - современный высокочувствительный аналитический метод, используемый для определения в образце специфичных белков с помощью антител.

Метод основан на комбинации гель-электрофореза и иммунохимической реакции «антиген-антитело».

Окрашивание геля не проводится!

Белки переносят на нитроцеллюлозную или PVDF(поливинилиденфторид) мембрану. Затем их детектируют с использованием антител методом «сэндвича». Белки перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения, но получается двумерное – плоскостное – расположение белковых молекул на поверхности мембраны.

Связывание белков основано как на гидрофобных взаимодействиях и на электростатических взаимодействиях между мембраной и белком.

электроблоттинг

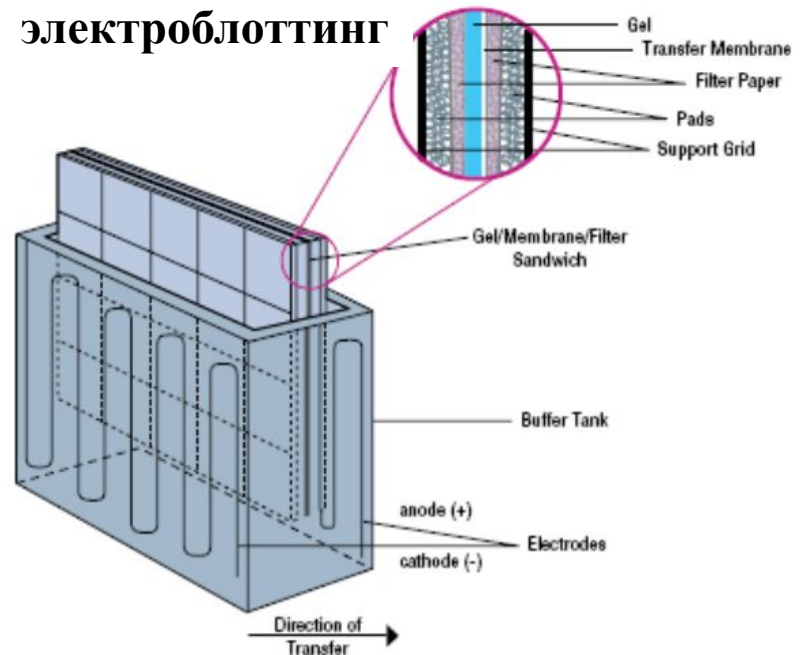
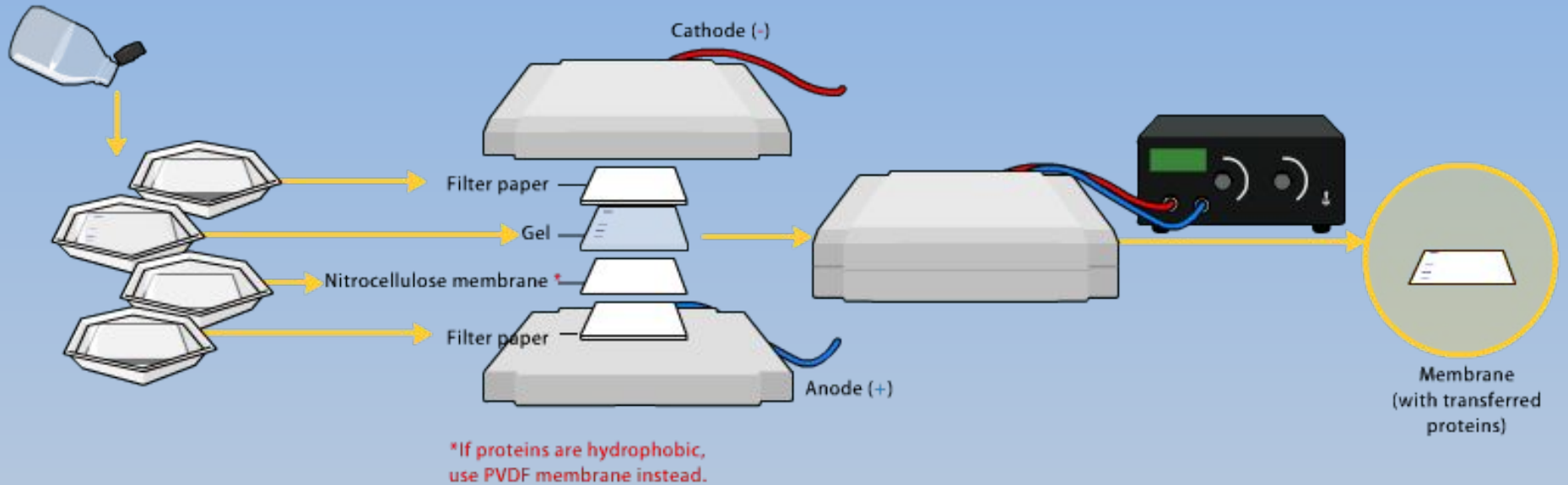


Figure 2. Electrophoretic transfer.

PVDF мембраны обладают более высокой емкостью в связывании белков, более прочны, менее ломкие и более устойчивы к различным растворителям.

Transfer buffer



Перенос проводится в буфере :

192 мМ глицин

25 мМ трис-НСl, рН 8.3

20% метанол

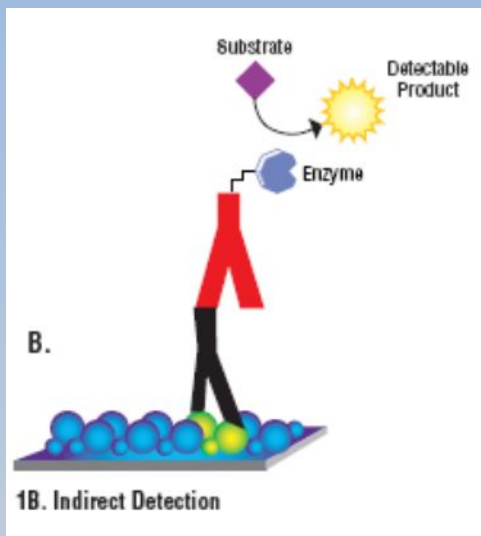
0.1% SDS

Перенос идет около 1-1,5 часа при 300мА.

Эффективность переноса белков из геля на мембрану может быть проверена окрашиванием мембраны красителями *Ponceau S*.



- Блокирование в 2-5% р-ре обезжиренного молока 1ч
- Инкубация с первичными антителами против детектируемого белка 1ч (ночь +4С) в блокирующем растворе
- Отмывание в PBS-Tween 0,1% 15мин-3x5мин
- Инкубация со вторичными антителами, специфичными к Fc-фрагментам первичных антител, конъюгированными с ферментной 40мин-1ч
- Отмывание в PBS-Tween 0,1% 15мин-3x5мин
- Детекция набором хромогенного субстрата



Отрицательный контроль на вторичные антитела

Чувствительность и специфичность метода сильно зависят от того, какие антитела используются при проведении исследований (специфичность, аффинитет).

Для иммунохимической детекции исследуемого белка обычно используются только моно- или поликлональные антитела, специфичные к линейным участкам белковой молекулы. Антитела, специфичные к конформационным эпитопам (или участкам, включающим в себя межсубъединичные контакты), как правило, не пригодны для использования в Western blotting.

Используемые антитела должны быть специфичны к уникальной, характерной только для исследуемого белка последовательности аминокислот.

Чем выше аффинитет используемых антител, тем ярче и четче прокрашиваются белковые полосы, тем выше чувствительность метода. При использовании высокоаффинных антител можно достичь чувствительности 1 нг и даже выше.

