

ИЗОЭЛЕКТРОФОК У-СИРОВАНИЕ

В этом методе используется градиент рН в постоянной электрическом поле. При этом белки двигаются до тех пор, пока не станут электронейтральными. Есть методы ПРЕПАРАТИВНОГО ИЭФ.



ИСТОРИЯ МЕТОДА

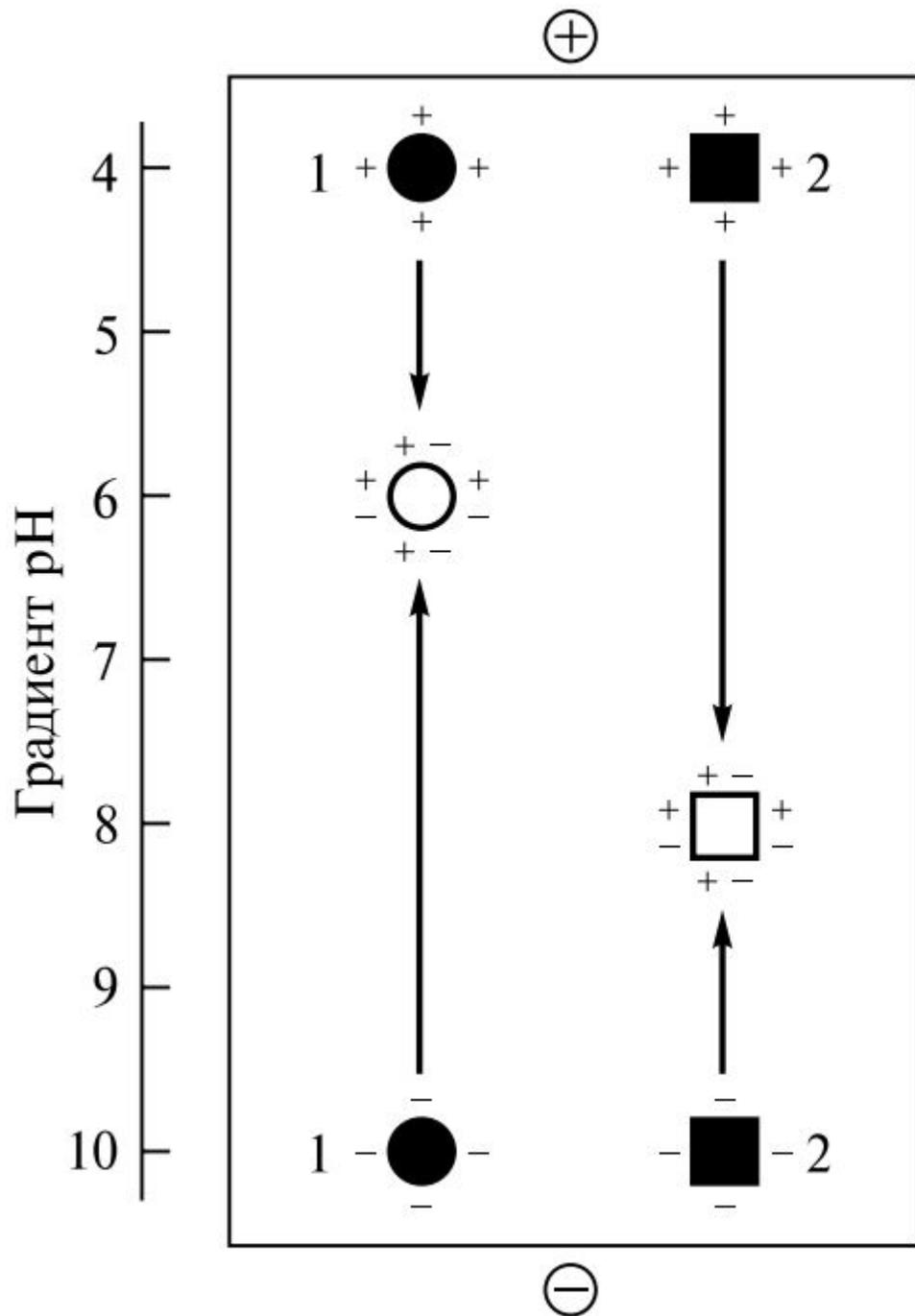
- В начале 70-х годов XX в. в Швеции был разработан новый метод разделения бел в электрическом поле, получивший название изоэлектрофокусирования. В отличие от метода электрофореза, в процессе которого белки фракционируют при каком-то определенном значении рН, задаваемом электрофоретическим буферным раствором, при изоэлектрофокусировании белки разделяют в градиенте рН, создаваемом с помощью специальных реагентов (амфолинов).



ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

- В процессе изоэлектрофокусирования белки передвигаются в электрическом поле в строгом соответствии только с зарядом молекул и останавливаются (фокусируются) в тех точках градиента рН, которые соответствуют их изоэлектрическим точкам (рI), т. е. там, где молекулы становятся электронейтральными (рис. 4). Изоэлектрофокусирование позволяет не только исключительно тонко разделить белки по заряду (разделяются белки, отличающиеся по рI всего на 0,005 единиц рН), но и быстро и точно определить их изоэлектрические точки.





- Рис. 4. Разделение белков методом изоэлектрофокусирования. При низких значениях рН белки заряжены положительно (+), при высоких значениях рН — отрицательно (-). В электрическом поле молекулы белков мигрируют к противоположно заряженным полюсам и останавливаются в тех точках градиента рН, которые соответствуют их изоэлектрическим точкам (рI). Изоэлектрические точки белка 1 и белка 2 находятся при рН 6,0 и 8,0 соответственно

ИСТОРИЯ МЕТОДА

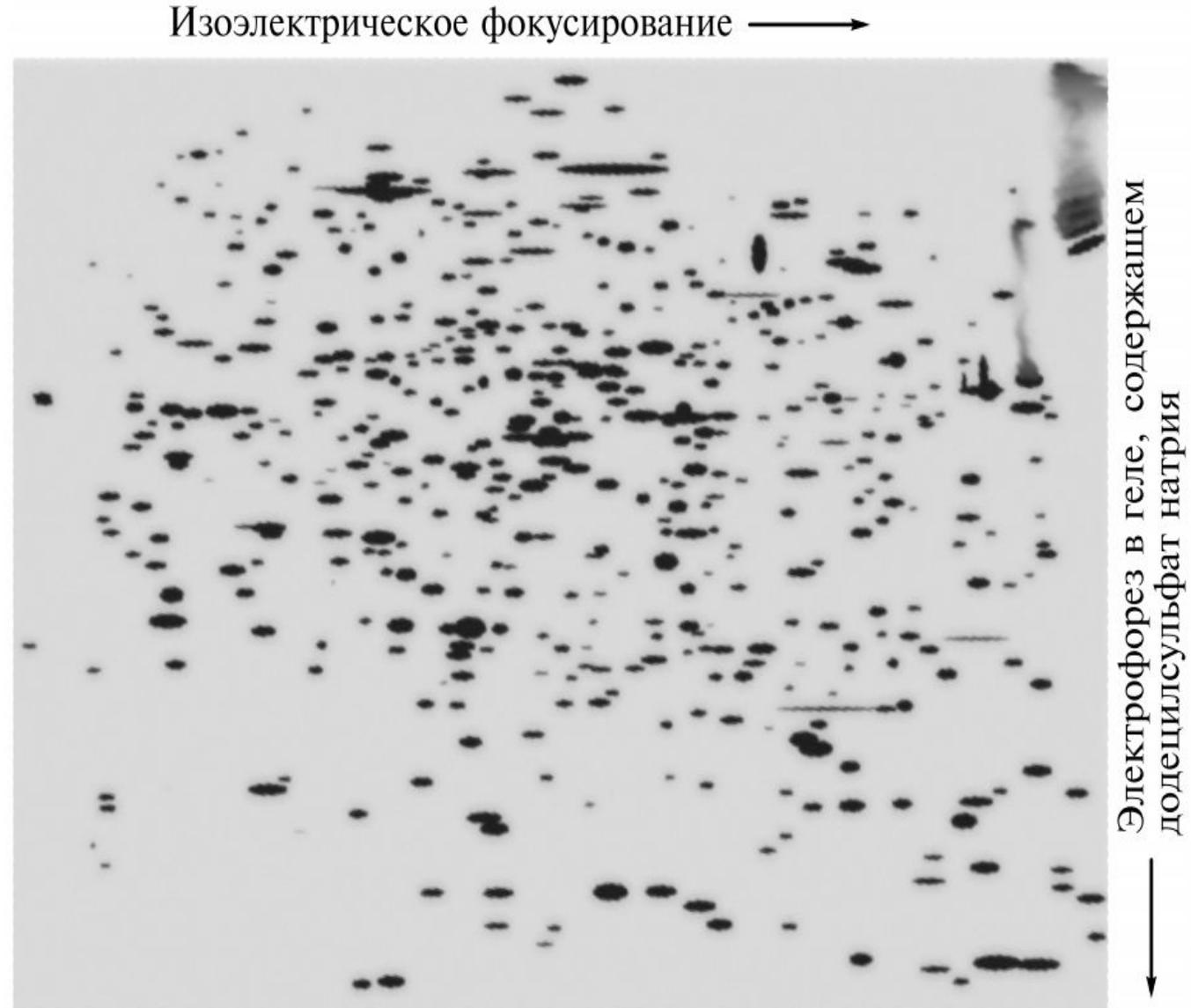
- Разработанное в 1975 г. П.Офареллом сочетание методов изоэлектрофокусирования и электрофореза в ПААГ с SDS получило название двумерного электрофореза. В этой процедуре белки вначале обрабатывают β -меркаптоэтанолом и мочевиной, что приводит к их полному растворению, денатурации и диссоциации полипептидных цепей без изменения заряда.



- Далее проводят изоэлектрофокусирование в ПААГ, разделяя белки по заряду, а затем (в перпендикулярном направлении) ведут их электрофорез в блоке ПААГ с SDS, при котором белки разделяются по молекулярной массе. Таким образом, сочетая тонкое разделение вначале по заряду, а затем по размеру (массе), удастся за один раз разделить до 2 000 полипептидных цепей, т. е. проанализировать большинство всех белков бактериальной клетки (рис. 5).



- Рис. 5. Радиоавтограмма, иллюстрирующая результат разделения белков кишечной палочки с включенными в них ^{14}C -аминокислотами методом двумерного электрофореза. На радиоавтограмме, полученной наложением на пластину полиакриламидного геля фотографической пленки, можно различить свыше 1 000 пятен, соответствующих отдельным полипептидным цепям белков



Электрофорез

Изоэлектрофокусирование

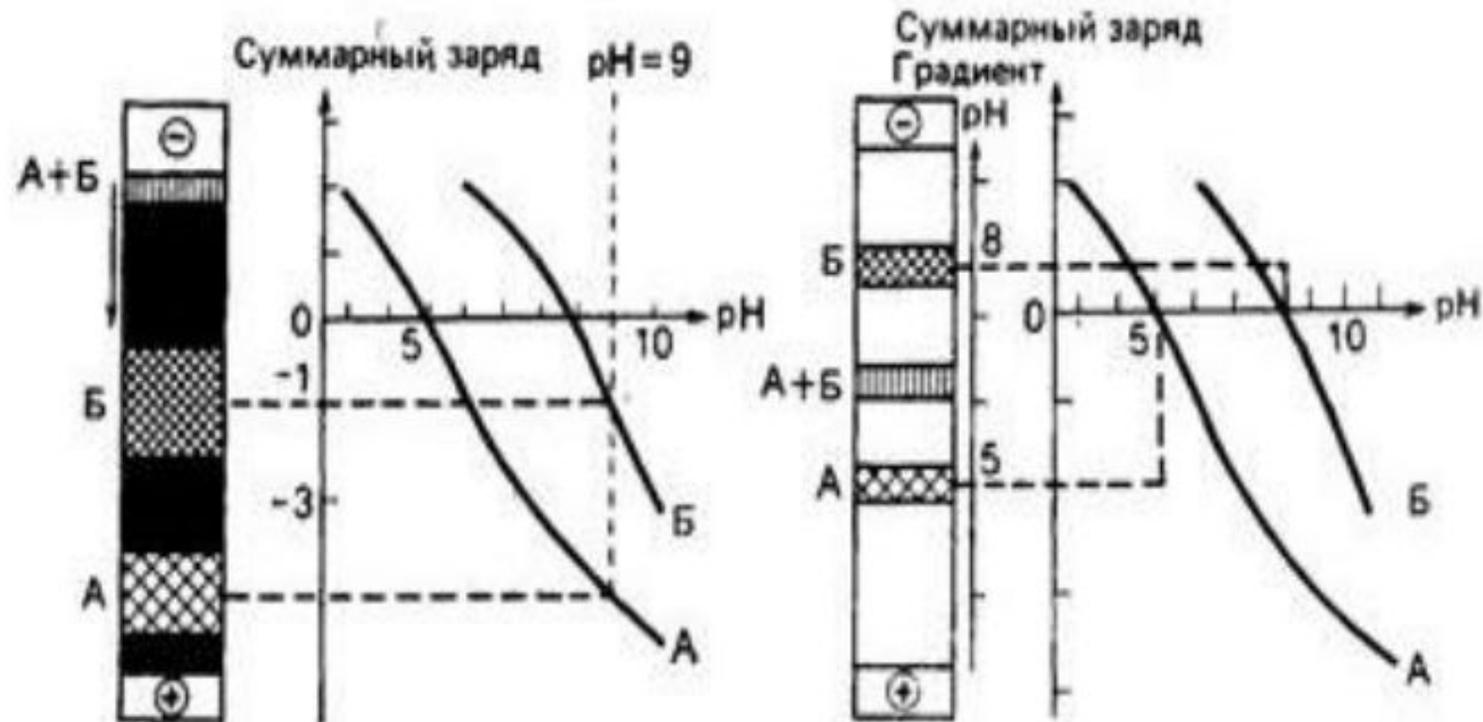


Рис. 1.3. Сравнение зонального электрофореза (слева) и ИЭФ (справа). В каждом случае проводится разделение смеси двух белков А ($pI=5$) и Б ($pI=8$), кривые титрования которых показаны справа. При обычном электрофорезе в среде поддерживается постоянное значение $pH=9$, при котором оба макроиона обладают постоянным суммарным отрицательным зарядом и мигрируют с постоянными скоростями (в отсутствие дифференцированных молекулярно-ситовых эффектов антиконвекционной среды разделения). В ходе фракционирования зоны диффундируют. В случае ИЭФ белки мигрируют с постоянно убывающей скоростью по направлению к стационарным зонам нулевого заряда ($pH=pI$). (С любезного разрешения фирмы LKB Produkter AB.)



АНАЛИТИЧЕСКОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

- Изоэлектрофокусирование — один из вариантов электрофоретического разделения макромолекул. Принцип метода состоит в следующем. Если на колонку, вдоль длины которой сформирован градиент рН, нанести образец белка, а потом подключить концы колонки к источнику тока, то молекулы белка будут двигаться по колонке до тех пор, пока не достигнут той области, где величина рН окажется равной величине изоэлектрической точки белка. Для создания градиента рН используются сложные смеси амфотерных соединений, по-разному обозначаемые фирмами-изготовителями (например, амфолины, фармалиты, сервалиты и т. д.). Эти соединения обычно имеют небольшую молекулярную массу (400—800 Да) и получают путем химического синтеза.



АНАЛИТИЧЕСКОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

- При изоэлектрофокусировании белок можно наносить на любую точку предварительно сформированного градиента рН или формировать градиент рН в присутствии белка. В начальные периоды фокусирования электрический ток имеет достаточно большую величину. По мере фокусирования он уменьшается и к концу фокусирования достигает какой-то минимальной величины. Охлаждение обеспечивает получение более четких и узких зон белка. Увеличение времени электрофокусирования не сопровождается размыванием белковых зон.



ФУНКЦИИ МЕТОДА

- Метод капиллярного изоэлектрофокусирования (СІЕФ, КИЭФ) применяется для разделения белков с примерно одинаковой молекулярной массой, но с различными изоэлектрическими точками (разделение изоформ с разным зарядом).
- При помощи данного метода могут быть разделены белки с изоэлектрическими точками, отличающимися всего на 0.04 единицы pI.
- По сравнению с традиционными анализами белков в полиакриламидном геле, варианты капиллярного электрофореза обладают несколькими преимуществами:
 - полная автоматизация разделения;
 - отсутствие стадии окрашивания;
 - низкая стоимость одного определения;
 - короткое время анализа.

