

ФГБОУ ВПО ВолгГМУ Министерства здравоохранения России
Кафедра фундаментальной медицины и биологии

Отчетная работа
по результатам выполнения индивидуальных заданий
профильной учебной практики
«Профильная учебная практика по биохимии»
на тему:
«Принципы димерного электрофореза и его значение в
протеомных исследованиях»

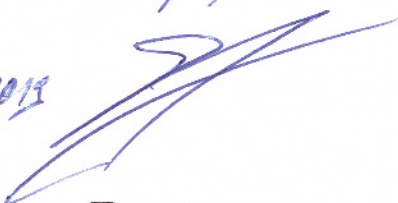
Работу выполнили:
студенты 3 курса,

Медико-биологического факультета,
Направления подготовки «Биология»
302 группы

Авдеев Сергей Викторович
Кан Александр Евгеньевич

Проверил: доцент кафедры фундаментальной медицины и биологии
Морковин Е. И.

Отп.
Недоплатки в оформлении
24.07.2019



Волгоград, 2019 г.

1. Актуальность

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. В современной научной литературе редко можно встретить статью, в которой на той или иной стадии фракционирования или характеристики этих биополимеров не был использован электрофорез. Этот метод позволяет разделить макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как: размеры (молекулярная масса); пространственная конфигурация; вторичная структура; электрический заряд.

2. Цель работы

Ознакомиться с принципами двумерного электрофореза, этапами его проведения, сделать вывод о важности применения этого вида анализа.

3. Содержание

Причем, параметры эти могут выступать как порознь, так и в совокупности. Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор начать пропускать электрический ток, то по его ходу установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала, отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют к аноду или катоду, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размера различные молекулы приобретают разные скорости, и в этом – сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из разных макромолекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине канала.

Помимо рабочего канала (например, трубки, заполненной раствором препарата) необходимыми компонентами рабочей установки являются: во-первых, два электрода, а во-вторых, электродные резервуары, через находящиеся в них буферные растворы и рабочий канал замыкается электрическая цепь между электродами.

Однако если бы разделяемая смесь находилась просто в жидком растворе, вне зависимости от положения трубки в пространстве нам бы не удалось избежать конвекции, которая деформирует и смешивает формирующиеся зоны. Поэтому в современных приборах рабочий канал заполняют гелем. Достаточно чистая и гидрофильная сетка такого геля удерживает жидкость от вытекания и препятствует конвекции. Между тем, при наличии сетки любые молекулы при миграции сталкиваются с нитями полимера, что увеличивает эффективное трение о среду.

В настоящее время для разделения пептидов и нуклеиновых кислот почти исключительно используют полиакриламидные гели (ПААГ) и гели агарозы. Варьируя концентрацию этих полимеров, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а также путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

Однако, существуют трудности. Разделяемые молекулы все же находятся в растворе, поэтому неизбежна их диффузия, приводящая к размыванию зон. Ее повышает и выделение тепла, происходящее при протекании через жидкость электрофоретического тока. Проблема теплоотвода и, главное, его равномерного распределения по всему гелю очень важна еще и потому, что скорость миграции макромолекул в электрическом поле зависит от температуры. В ходе электрофореза зоны растворенных молекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в препарат добавляют краситель, движущийся в электрическом поле аналогично разделяемым молекулам (имеющий сходную электрическую подвижность), но в виде окрашенной зоны. Когда эта зона доходит до конца рабочего канала, электрофорез останавливают. Разделившиеся зоны во избежание диффузии немедленно фиксируют. Зоны наблюдают, как правило, с помощью метки, связывающейся с макромолекулами (обычно, флуоресцентной, радиоактивной). Используют как цилиндрические гели в трубках, так и тонкие заподимеризованные пластины. Кроме ПААГ и агарозы в качестве носителя жидкостной фазы для разделения макромолекул иногда применяют сефадекс, вязкий раствор сахарозы и др. Однако одномерный гель-электрофорез ПААГ не способен фракционировать смеси, содержащие более 100 белков. Поэтому он не пригоден для анализа сложной смеси белков, полученных от целых клеток, тканей или биологических жидкостей, содержащих намного большее число белков. Чтобы решить проблему фракционирования протеома используют двумерный гель-электрофорез (2Д-электрофорез). При осуществлении 2Д-электрофореза белки разделяют по

двум различным физико-химическим свойствам. Вначале белки разделяют в первом направлении по заряду согласно их изоэлектрической точке путем изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), а затем во втором направлении – согласно их молекулярной массе с помощью электрофореза в ПААГ. Обе процедуры проводят в полиакриламидном геле. В результате проведения 2БД-электрофореза получают электрофореграмму, на которой представлено много пятен белков.

4. Принцип метода

Эффективность электрофоретических методов зависит от многих факторов, в т. ч., от суммарного заряда молекул, ситового эффекта используемого для электрофореза носителя, присутствия денатурирующих агентов и т. п. Благодаря такой вариабельности электрофорез обладает высокой разрешающей способностью. Однако при исследовании сложной смеси, состоящей из многих белков (а такие исследования приходится проводить довольно часто) некоторые белковые зоны могут перекрываться. В подобных случаях электрофорез во втором направлении может привести к более полному разделению анализируемых веществ, и этот принцип лежит в основе методов двухмерного электрофореза.

Электрофорез в первом направлении проводят обычным способом, а затем полученную электрофореграмму используют без фиксации и окрашивания в качестве стартовой зоны для электрофореза во втором направлении, перпендикулярном первому. Если оба этапа электрофореза осуществляются в идентичных условиях, то скорость миграции белков в обоих направлениях одинакова и зоны деления молекул располагаются по диагонали. Очевидно, что такие системы улучшают деление лишь постольку, поскольку оно зависит от удлинения пути миграции разделяемых белков. Чтобы повысить разрешение в значительной степени, необходимо на втором этапе изменить по крайней мере один из электрофоретических параметров.

5. Разновидности двухмерного электрофореза

К числу первых разновидностей двухмерного электрофореза относится сочетание электрофореза на бумаге с электрофорезом в крахмальном геле. По этому методу после электрофореза на бумаге полоску электрофореграммы помещают в щель, вырезанную в крахмальном геле, и проводят электрофорез во втором направлении обычным способом. Применение двухмерного электрофореза этого типа для деления белков сыворотки крови человека не дало существенного увеличения числа разделенных фракций по

сравнению с тем, что было получено с помощью одномерного электрофореза в крахмальном геле. Возможно, это объясняется низкой разрешающей способностью электрофореза на бумаге.

Можно использовать крахмальный гель для электрофореза в обоих направлениях. Первое разделение проводят обычным способом, а затем блоки геля шириной 5 мм переносят на вторую пластину геля, причем последнюю лучше готовить на буфере, имеющем другое значение рН или содержащем денатурирующие агенты.

Очевидно, чем выше степень разрешения электрофоретических методов, применяемых в каждом направлении, тем эффективнее будет их комбинация. В связи с этим предпринимались многочисленные попытки использовать разносторонние возможности электрофореза в полиакриламидном геле для разделения сложных смесей белков. Помимо применения буферных растворов с разными значениями рН разработано множество методов, в которых для каждого направления используются гели с разными свойствами.

Если концентрация полиакриламидного геля во втором направлении выше, чем в первом, а значения рН одинаковы, то скорость миграции всех компонентов данного размера будет изменяться одинаково, и в результате эти белки будут располагаться на прямой, проходящей через старт.

Если же при электрофорезе во втором направлении применяют буферную систему с другим рН, то наблюдается иная электрофоретическая картина. В этом случае на разделение влияют изменения в характере диссоциации определенных групп белковых молекул. Все белки с идентичными кривыми титрования будут располагаться на прямой, проходящей через точку нанесения пробы, а компоненты с другими кривыми титрования будут находиться вне этой линии. На практике следует менять и концентрацию геля, и буферную систему.

Возможность для дальнейшего улучшения разделения белков открывает сочетание изоэлектрического фокусирования с электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН, а также использование различных видов равномерных или скачкообразных градиентов концентрации полиакриламида.

Поскольку все указанные методы можно сочетать друг с другом, число возможных вариантов двухмерного электрофореза огромно. На практике же число этих комбинаций несколько ограничено, т. к. изоэлектро-

фокусирование применяют только в первом направлении (отчасти это обусловлено высокой стоимостью амфолитов-носителей), а ДСН-содержащие гели – только на второй стадии электрофореза из-за трудностей, связанных с удалением ДСН из комплексов с белками. В зависимости от изменений, вводимых при электрофорезе во втором направлении, можно выделить следующие типы двухмерного электрофореза:

- 1.двухмерный электрофорез без изменений рН;
- 2.двухмерный электрофорез с изменением рН;
- 3.диск-электрофорез с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН;
- 4.изоэлектрофокусирование с последующим электрофорезом;
- 5.изоэлектрофокусирование с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН.

Двухмерный электрофорез без изменений рН В данном методе используется эффект молекулярного сита, свойственный полиакриламидным гелям различной концентрации. Чтобы улучшить разрешение, рекомендуется на первом этапе проводить электрофорез в геле низкой концентрации полиакриламида, а на втором – электрофорез в градиенте концентрации полиакриламида. Такие системы были применены при разделении белков сыворотки крови. Марголис и Кенрик для электрофореза в первом направлении использовали 2,7%-ный гель, а Райт – 4,75%-ный. Электрофорез во втором направлении проводили в градиенте концентрации 4 – 20%-ного или 2 – 30%-ного полиакриламида. В первом направлении применение 2,7%ногополиакриламидного геля улучшало разделение белков с большой молекулярной массой, тогда как при электрофорезе во втором направлении разделение было лучше при использовании более крутого градиента. Об эффективности указанных методов свидетельствует то, что при разделении с их помощью белков сыворотки человека на электрофореграмме было получено более ста зон. В обоих описанных выше методах электрофорез в первом направлении проводили в цилиндрических гелях, а во втором – на пластинах. Чтобы предотвратить смешивание разделенных белковых зон в тот момент, когда они в процессе электрофореза выходят из первого геля и проникают во второй, пространство между этими двумя гелями также должно быть заполнено гелем. Один из способов его заполнения состоит в том, что столбик первого геля помещают в кювету для формирования

второго геля, наливают в нее гелеобразующий раствор и дают ему заполимеризоваться. По другому способу полимеризацию пластин геля проводят уже во время электрофореза в первом направлении. В этом случае на готовую пластину геля наливают сверху свежий гелеобразующий раствор и погружают в него столбик первого геля. Когда для этой цели используют полиакриламид, то, чтобы уменьшить возможность образования артефактов, проводят, как правило, фотополимеризацию. Существует также простой и быстрый способ заполнения пространства между гелями расплавленной агарозой. Преимущество этого способа заключается в том, что благодаря быстрому застыванию агарозного геля сокращается время операции и уменьшается степень расширения разделенных зон в результате диффузии. Был описан также метод двухмерного электрофореза, осуществляемый в обоих направлениях на одной пластине геля. Вейн проводил такой электрофорез в сигмоидном вогнутом градиенте концентрации полиакриламидного геля. Для его формирования использовали квадратную ячейку, в которую гелеобразующий раствор наливали с одного угла. В противоположный угол наносили образец, и затем проводили электрофоретическое разделение в двух перпендикулярных направлениях.

Двухмерный электрофорез с изменением рН По этому методу электрофорез в первом направлении проводят в цилиндрическом геле, заключенном в стеклянную трубку, а во втором – на пластине геля. После первого разделения гель необходимо уравновесить с буфером, используемом во втором направлении. Подобные системы применялись, в частности, для разделения рибосомальных белков.

Диск-электрофорез с последующим электрофорезом в ДСНполиакриламидном геле Настоящий метод дает превосходное разрешение, если первый этап электрофореза проводить в относительно разбавленных гелях при рН, подходящем для всех белков, присутствующих в смеси. Он не только обладает очень хорошей разрешающей способностью, но и позволяет определить молекулярные массы разделяемых компонентов, поскольку подвижность белков при миграции в гелях, содержащих ДСН, зависит лишь от размеров молекул. Методы такого рода широко используются для разделения природных смесей белков. После проведения диск-электрофореза при любом выбранном рН гель следует уравновесить с содержащей ДСН буферной системой, применяемой во втором направлении.

6. Техника первичной идентификации белков методом двухмерного гелеэлектрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

Успех в проведении 2Д ЭФ во многом зависит от того, насколько хорошо приготовлены исследуемые образцы. В процессе проведения 2Д ЭФ необходимо стремиться к достижению максимальной экстракции белков из образцов и поддержанию их в растворенном состоянии. Приготовление образцов облегчено, когда используют биологические жидкости организма или лизаты клеток, поскольку в этих препаратах белки уже находятся в растворенном состоянии. Клетки при анализе предварительно отмывают в Трис-буфере с сахарозой (10 мМ Трис, 250 мМ сахарозы, рН 7,0), а затем разрушают разными способами. Наиболее простой способ дезинтеграции клеток – использование стандартных лизирующих растворов. В некоторых случаях применяют процедуру «замораживание – оттаивание», обработку ультразвуком или использование фрэнчпресса, который механически разрушает клетки. Ткани и клетки с толстой стенкой растирают при низкой температуре в ступке с пестиком. Растительные клетки, содержащие толстую полисахаридную стенку, разрушают путем замораживания в жидком азоте и растиранием в ступке с дополнительной обработкой ультразвуком. После разрушения клеток все белки или максимально возможное их количество, содержащееся в изучаемом образце, подвергают сольюбилизации лизирующими растворами, в состав которых мочевины (хаотропный агент) в высокой концентрации, один или несколько детергентов (поверхностно-активные соединения), восстановители, ингибиторы протеаз. Для повышения эффективности сольюбилизации используют несколько родственных хаотропов, например, мочевины и тиомочевины. В качестве детергентов используют CHAPS (3-[(3-хололамидопропил)диметиламино]-1-пропансульфоновая кислота), NP-40, тритон X-100. Для сольюбилизации водорастворимых белков и разделения их в первом направлении методом изоэлектрофокусирования часто используют стандартный набор реактивов: 8М мочевины, 4% CHAPS, 0,1 – 0,2% амфолины, 3 – 10 и 10 – 100 мМ дитиотреитол (ДТТ) или дитиоэритрол (ДТЕ). ДТТ и ДТЕ используют в качестве восстановителей. Альтернативой ДТТ/ДТЕ являются фосфины, в частности трибутилфосфин (ТБФ). Использование фосфинов позволяет существенно снизить концентрацию восстанавливающих агентов. Возможные нежелательные окислительные модификации белков устраняются добавлением к образцам восстанавливающих агентов. Восстановители разрывают дисульфидные связи белков и тем самым способствуют полному разворачиванию глобулы белка. Использование в составе сольюбилизирующих растворов ингибиторов протеаз необходимо для предотвращения протеолитической деградации белков, которая приводит к появлению дополнительных пятен на геле и снижению количества белка в основном пятне. Большинство опубликованных протеомных карт содержат информацию о водорастворимых белках, которые хорошо сольюбилизируются с использованием стандартных наборов реактивов.

Использование детергентов CHAPS, NP-40, тритон X-100 в комбинации с мочевиной иногда оказывается достаточным для успешной солюбилизации мембранных белков (кроме интегральных). Используемые в растворах денатуранты и детергенты не несут заряда и поэтому они не смещают изоэлектрическую точку белков. Процедура солюбилизации унифицирует структурное состояние белка, предотвращает образование агрегатов и пептидных олигомеров, устраняет межбелковые взаимодействия. Возможные нежелательные окислительные модификации белков устраняются добавлением к образцам восстанавливающих агентов. Солюбилизирующие химические агенты и денатуранты разворачивают белковую глобулу с сохранением индивидуальной для каждого белка последовательности аминокислотных остатков. Хаотропные агенты – мочевина и тиомочевина разрушают водородные и гидрофобные связи в белках. Детергенты CHAPS, Тритон X-100, и некоторые другие, такие как сульфобетаин SB3-10 и амидосульфобетаин ASB-14, разрушают гидрофобные взаимодействия в белках. С целью обеспечения максимально возможного извлечения белков из исследуемых образцов применяют процедуру последовательной экстракции с использованием различных буферных растворов и детергентов. Для этого белки последовательно экстрагируют в растворах с возрастающей экстрагирующей способностью и каждый раз разделяют их с помощью 2D ЭФ. Оставшиеся нерастворимыми после процедуры первой экстракции белки подвергают новой процедуре экстракции в растворах с повышенной экстрагирующей способностью. Однако даже такой методический прием с последовательной экстракцией в некоторых случаях не обеспечивает экстракции белков. Это относится к сильно гидрофобным трансмембранным белкам.

Проблемы с большим количеством белков при осуществлении метода 2D-электрофореза можно минимизировать путем предварительного использованием дополнительных методов очистки и хроматографии белков. Например, низкое исходное содержание белка может быть увеличено в первичном лизате клетки путем применения аффинной хроматографии с использованием специфических к исследуемым белкам антител. Могут быть применены и другие методы хроматографии. Экстракты белков могут содержать различные мешающие проведению анализа примеси, такие как нуклеиновые кислоты, фосфолипиды, полисахариды, ионы солей, твердые частицы. Они могут мешать проведению анализа и нежелательным образом модифицировать белки. Так, например, нуклеиновые кислоты способны связываться с белками и увеличивать вязкость исследуемых растворов. Посторонние примеси необходимо удалить из исследуемых образцов. Нуклеиновые кислоты удаляют путем обработки проб РНК и ДНК-

нуклеазами, которые добавляют к экстрагирующей смеси. Липиды могут быть удалены преципитацией. Соли удаляют диализом или с помощью гель-фильтрации, твердые частицы – центрифугированием.

7. Проведение фракционирования по двум независимым друг от друга физико-химическим свойствам полипептидной цепи.

Первая стадия 2D-электрофореза белков – изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) в присутствии мочевины и неионного детергента (третон X-100, нонидет Р-40). Эту процедуру проводят в градиенте рН. В результате изоэлектрического фокусирования белки электрофоретически разделяются в градиенте рН. Белки обладают амфотерными (кислотными и щелочными) свойствами благодаря присутствию в них карбоксильных аминокислотных групп. В зависимости от рН среды эти группы могут протонироваться или депротонироваться. В кислой среде щелочные аминокислотные группы заряжены положительно. В щелочной среде кислотные карбоксильные группы заряжены отрицательно. Итоговый заряд макромолекулы белка определяется суммой положительных и отрицательных зарядов остатков аминокислот. Поскольку каждый индивидуальный белок содержит только ему присущий набор аминокислотных остатков, зависимость его заряда от рН среды будет индивидуальной. Изоэлектрическая точка (рI) представляет собой значение рН, при котором на белке отсутствует электрический заряд. При осуществлении ИЭФ создают градиент рН, в котором белки мигрируют в область, где значение рН эквивалентно изоэлектрической точке. После попадания белков в зону рН, соответствующую значению их изоэлектрических точек, движение белков прекращается, и они накапливаются в этой зоне. Следовательно, в результате ИЭФ происходит разделение белков в первом направлении согласно их изоэлектрической точке. Белки накапливаются (фокусируются) в узких полосах в соответствии с их значениями рI, при котором макромолекулы не несут заряда. Поскольку значение рI белка определяется последовательностью аминокислотных остатков полипептидной цепи, техника ИЭФ обеспечивает хорошее разрешение белков в их смеси. Градиент рН, необходимый для ИЭФ белков, создают разными способами. Первый способ – формирование его в электрическом поле с помощью амфолинов – синтетических соединений, обладающих амфотерными свойствами. Поскольку амфолины в геле находятся в свободном состоянии, создаваемый ими в электрическом поле градиент рН нестабилен и дрейфует во времени. Это снижает точность и воспроизводимость результатов. Данная проблема снимается путем создания иммобилизованного градиента рН, при котором группы с кислотными и

щелочными свойствами закреплены на геле. Имобилизованный (фиксированный в геле) градиент рН, необходимый для осуществления ИЭФ, создают путем реакции сополимеризации производных акриламида, содержащих карбоксильные и аминокислотные группы, с мономерами акриламида. С помощью специального устройства приготавливают пластины геля с имобилизованным градиентом рН, которые затем режут на узкие полоски и проводят в них ИЭФ. Имобилизованный градиент рН остается стабильным при действии высокого напряжения. В последние годы при проведении изоэлектрофокусирования вместо амфолинов используют более удобные коммерческие полоски («стрипы») с имобилизованным градиентом рН. Они обладают следующими преимуществами: полоски с имобилизованными градиентами рН (иммобилинами) в различной модификации (линейные, экспоненциальные) выпускаются серийно и готовы к употреблению после проведения процедуры их регидратации. Полоски с иммобилинами позволяют анализировать большие количества белков по сравнению с полиакриламидными носителями, содержащими нефиксированные амфолины. Фирмы-производители выпускают полоски, позволяющие работать в большом диапазоне рН, включая щелочную область до рН 12,5. Имеются полоски с узким (1 – 2) и сверхузким (0,2) диапазонами рН-градиентов. При использовании полосок с имобилизованным градиентом рН можно добиться лучших результатов разделения белковых препаратов по сравнению со случаями, при которых использовали амфолины. Перед использованием полосок для ИЭФ их необходимо подвергнуть процедуре регидратации. Для регидратации используют специальные растворы, в состав которых входят мочевины, детергент CHAPS, восстановительный агент дитиотреитол, обладающий буферными свойствами амфолин, глицерин, бромфеноловый синий. Регидратацию полосок проводят в специальных устройствах.

Существует два способа загрузки белками полосок с имобилизованным градиентом рН. При первом способе препараты белков в лизирующем буфере вносят вместе с регидратационным раствором. При этом сухой гель впитывает раствор белков вместе с регидратационным раствором. При втором способе раствор белков вносят после завершения процесса регидратации полосок. Белки входят в полоски электрофоретически. Время регидратации полосок с образцами белков составляет 12 часов, без образцов белков – 6 часов. Во время ИЭФ полоски покрывают парафиновым маслом для предотвращения высыхания геля, кристаллизации мочевины, окислительных повреждений белков кислородом. После регидратации полоски помещают в камеру для проведения ИЭФ. Величина электрического тока составляет 50 – 70 мкА на одну полоску. Напряжение зависит от времени проведения ИЭФ. Пример: 1 кВ при времени 5 часов и 5 кВ при

времени проведения фореа 1 час. Оптимальной температурой проведения ИЭФ является 20 °С. После окончания процедуры изоэлектрического фокусирования белки, находящиеся в полоске с рН-градиентом, подвергают процедуре уравнивания с анионным детергентом додецисульфатом натрия (ДСН). В результате этой процедуры белки денатурируются и приобретают отрицательный заряд. Затем переходят ко второй стадии 2D ЭФ. Основную трудность при осуществлении ИЭФ создают мембранные белки. Поскольку мембранные белки обладают гидрофобными свойствами, они плохо растворяются в водных растворах, которые используются при проведении изоэлектрофокусирования белков. Изоэлектрическая точка мембранных белков часто находится в щелочной области рН, что также осложняет проведение ИЭФ. С помощью разделения белков в первом направлении методом ИЭФ не удается достичь высокого разрешения. Этим методом можно получить лишь около 100 белковых полос.

8. Электрофорез на пластине ПААГ в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия.

Полоски с белками после завершения ИЭФ используют в дальнейшем в качестве стартовой зоны, от которой начинают фракционирование во втором направлении – электрофорез на пластине ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Для этого полоску, содержащие белки в гелевом градиенте рН, помещают поверх пластины ДСН ПААГ и заливают для фиксации агарозой. Комплексованные с ДСН белки покидают гель с градиентом рН, в котором произошло их разделение в первом направлении, и переходят в ДСН ПААГ, где затем они разделяются во втором направлении. Стандартная толщина геля составляет 1 – 1.5 мм. Гели большего размера позволяют поместить в них большее количество препарата белков и обеспечивают лучшее разрешение. Для улучшения разрешающей способности используют пластины с градиентом концентрации акриламида. Устройства для проведения ДСН-гель-электрофореза в горизонтальном (А) и вертикальном (В) положениях представлены на рисунке 2. К пластине геля через электроды подают постоянный электрический ток. Заряженные отрицательно белки под действием электрического тока движутся к аноду и разделяются в соответствии с их размерами (радиусом Стокса). Белки с молекулярной массой 200 кДа мигрируют в геле на расстояние 1-2 см, а 10 кДа – 14-15 см. В результате проведения 2DЭФ в геле хорошо разрешаются пятна белков с молекулярными массами от 10 до 250 кДа и значениями изоэлектрических точек от 3,8 до 8. (Спектр значений изоэлектрических точек локализуется в интервале рН 3 – 13.) Существуют технические проблемы при разделении и выявлении белков со значениями рI выше 11,5.

Белки с молекулярной массой выше 250 кДа трудно или вообще нельзя анализировать методом 2D-электрофореза.

9. Детекция белков.

После разделения белков методом 2D-электрофореза необходимо их обнаружить на пластине геля. Визуализация белков достигается применением техники их окрашивания. Для этих целей используют Кумаси синий, серебро (нитрат серебра с тиосульфатом натрия), флуоресцентные красители (SYPRO красный, SYPRO оранжевый). Важной проблемой методов детекции белков является повышение их чувствительности и линейности. Она связана с тем, что белки экспрессируются клеткой в очень широком динамическом диапазоне концентраций. Однако возможности определения концентраций белков с помощью окрашивания Кумаси синим или серебром ограничены.

Эти красители хорошо окрашивают белки, присутствующие в достаточно большой концентрации, в то время как белки с низкой концентрацией могут не окрашиваться или давать слабые пятна и таким образом плохо выявляться. Окрашивание серебром – наиболее чувствительный нерадиоактивный метод визуализации белков. Он позволяет определять белки с содержанием в пятне менее 1 нг. Однако диапазон линейности между интенсивностью окраски и содержанием белка в пятне не очень большой – менее двух порядков. Кроме того, данный метод очень чувствителен к температуре. Полученные методом окрашивания серебром результаты менее воспроизводимы по сравнению с другими. С целью повышения точности анализа белки прокрашивают более чем одним красителем, например, проводят окрашивание Кумаси синим и серебром. При этом детектируется больше пятен. Для окрашивания белков можно использовать флуоресцентный краситель SYPRO красный или SYPRO оранжевый, которые нековалентно связываются с белками. Процедура окрашивания красителями может быть выполнена с помощью одной операции после завершения электрофоретических стадий. Данные красители обладают малой специфичностью к белкам различных видов, что обеспечивает стандартные условия окрашивания практически всех белков и существенно снижает количество артефактов. Минимальное количество белка, которое может быть определено с использованием флуоресцентных красителей, составляет 1 – 2 нг на пятно. Указанные красители обеспечивают линейность в пределах трех порядков концентрации белка. Флуоресцентные красители удобно использовать при окрашивании гелей, содержащих белки клеток, выращенных в различных условиях. Прокрашенные нефлуоресцентными красителями пятна белков в геле анализируют в

видимом свете с помощью сканирующего денситометра. Пятна белков, окрашенных флуоресцентными красителями, детектируют с помощью устройств с лазерным возбуждением флуоресценции. Флуоресцентный сигнал регистрируют ФЭУ. Размер анализируемого белкового пятна составляет 100 – 150 мкм. Расположение пятен на геле можно оценить качественно (визуально) и количественно. Для этого изображение геля предварительно переводят в цифровую форму и проводят анализ с помощью специальных компьютерных программ. Использование техники окрашивания позволяют обнаруживать на 2D-электрофореграмме многие тысячи белковых фракций.

10. Анализ распределения белков на двумерных электрофореграммах с использованием прямоугольных координат

Положение каждой выявленной белковой фракции на 2D-электрофореграммах можно охарактеризовать по вертикальной и горизонтальной координатам. Позиция по первой из них является функцией молекулярной массы, а по второй – по заряду. Таким образом, установление координат белковой фракции на двумерных электрофореграммах становится первым шагом к системному объективному описанию белковых продуктов генной экспрессии конкретного объекта. Важным этапом данной стадии анализа является получение по многим адекватным двумерным электрофореграммам обобщенного (синтетического) изображения распределения белков – «белкового портрета» изучаемого объекта, на основании которых строятся «двумерные карты» – стандартизованные схемы распределения белков. Для построения таких карт используются специальные программы компьютерного анализа изображений.

Информативность и возможности использования «двумерных карт» возрастает при идентификации на них уже известных белков. Итоговый массив информации о выявленных белках систематизируют и обобщают в форме специализированного компьютерного банка (или банков).

11. Протеомный анализ

Получаемые с помощью электрофореза карты сложных белковых смесей – основной метод протеомики. Далее проводят анализ изображения двумерного гель-электрофореза с помощью методов биоинформатики.

Сравнивают карты 2D-ПААГ-ЭФ для тканей (клеток, органов) на различных этапах развития либо этапах определенного процесса, либо, когда процесс идет в различных условиях. Для этого осуществляют следующее:

- Выравнивание (поиск одинаковых белковых зон)
- Сопоставление
- Статистический анализ (оценка достоверности изменений)

Количественные характеристики пятен: координаты пятна; площадь пятна; оптическая плотность пятна; объем пятна.

12. Заключение

Двумерный электрофорез является одним из главных методов исследования белкового состава биоматериалов, что очень важно при исследовании генома живых организмов.

Список литературы

1. Молекулярная биология клетки Том 5 (1987)
2. Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика. Методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Беккер. - М.: Техносфера, 2009. - 472 с