

## ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. В современной научной литературе редко можно встретить статью, в которой бы на той или иной стадии фракционирования или характеристики этих биополимеров не был использован электрофорез. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры 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, заключенный в канал из изолирующего материала, например стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом — сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. В современных приборах рабочий канал заполняют гелем, наличие сетки которого вносит важную дополнительную деталь в электрофоретическую миграцию молекул. Фракционируемые молекулы сталкиваются с нитями полимера, образующую сетку геля, что увеличивает сетку геля и снижает скорость движения молекул. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний размер пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и степень деления оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы белков или нуклеиновых кислот вообще не

могут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратиться.

В настоящее время используют ПААГ и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза исключительную гибкость.

В ходе электрофореза зоны макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже передвигается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси, кислоты выпадают в осадок в том месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют. Вместо окрашивания или наряду с ним часто используют методы обнаружения разделенных зон по их радиоактивности. К ним относятся приемы регистрации полос на фотопленке посредством автордиографии или флюорографии и различные способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Вместо цилиндрических часто используют гели в виде тонких пластин, заполимеризованные между двумя плоскими стеклами. Такие пластины имеют важное преимущество: на них можно одновременно фракционировать несколько препаратов. Обычно их вносят с одного края геля на равных расстояниях друг от друга. Каждый препарат разделяется в электрическом поле независимо от своих соседей, образуя свой набор зон. Кроме того, поскольку гель заливают в форму для полимеризации жидким, то его концентрация, состав буфера и содержание добавок строго одинаковы по всему сечению геля. Следовательно, плотность тока и напряжение электрического поля также одинаковы. Это обеспечивает строго идентичные условия фракционирования разных препаратов и дает возможность достоверного сопоставления их состава путем сравнения положения полос в параллельных треках.

## ГЕЛИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

### ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ (ПААГ)

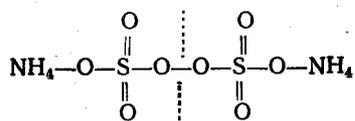
#### Исходные материалы

Акриламид ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH}_2$ ) представляет собой белый кристаллический порошок. Хорошо очищенный продажный препарат содержит не более 0,05% акриловой кислоты. Его 5%-ный водный раствор должен иметь pH не ниже 5, а оптическая плотность 1%-ного раствора при 290 нм ( $A_{290}$ ) не должна превышать 0,15. Такой препарат можно использовать без дополнительной очистки или перекристаллизации. Акриламид следует хранить сухим, в темной посуде, предпочтительно на холоду. В этих условиях он может храниться до года. Акриламид токсичен (воздействует на кожу и нервную систему), поэтому отвешивать и растворять его следует в перчатках и под тягой.

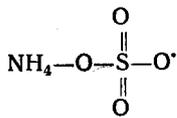
NN'-Метиленбисакриламид («Бис») —  $(\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH})_2 - \text{CH}_2$  — используют в качестве «сшивки» линейных полимеров акриламида. Продажные препараты, содержащие не более 0,02% акриловой кислоты, не нуждаются в дополнительной очистке.

В качестве «сшивки» иногда используют этилендиакрилат —  $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$ , а также NN'-диаллилтартардиамид (ДАТД) —  $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$ . С их помощью получают «растворимые» гели. В первом случае эфирную связь можно разорвать обработкой геля щелочью или водным раствором пиперидина. Гели, сшитые ДАТД, растворяются за 20 — 30 мин при комнатной температуре в 2%-ной йодной кислоте.

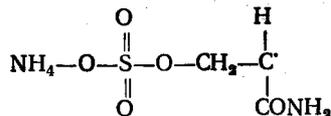
Персульфат аммония производится в виде белого кристаллического порошка или гранул. Его используют в качестве инициатора процесса полимеризации. Гомолитический разрыв связи между атомами кислорода в молекуле персульфата аммония



приводит к образованию двух достаточно долго живущих свободных радикалов с одним неспаренным электроном у атома кислорода:



Такой радикал стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней таким образом, что снова образуется радикал с неспаренным электроном, но уже у атома углерода:



Этот 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 тому же механизму в растущую цепочку линейного полимера может одной из своих концевых винильных групп встроиться и метиленбисакриламид. Вторым его конец может точно так же оказаться в составе другой линейной полимерной цепочки, и образуется «сшивка».

Рибофлавин представляет собой кристаллы в виде желто-оранжевых игл. Он малорастворим в воде, но хорошо растворяется в слабощелочных водных буферах; растворы имеют желто-зеленую окраску.

Рибофлавин также может служить инициатором полимеризации. При освещении его водного раствора видимым светом (445 нм) он присоединяет водород и восстанавливается до лейкорибофлавина. Последний снова легко окисляется растворенным в воде кислородом, образуя перекись водорода. За счет разложения перекиси продуцируются свободные радикалы (НО·), инициирующие цепную реакцию полимеризации акриламида.

Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) —  $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$  — представляет собой бесцветную жидкость с плотностью 0,78 г/см<sup>3</sup>. Концентрация неразбавленного ТЕМЕД — около 6,7 М.

ТЕМЕД не является, собственно говоря, инициатором полимеризации акриламида, но служит катализатором этого процесса, заметно ускоряя его протекание. Он эффективен только в своей неионизированной форме, поэтому при полимеризации акриламида в кислой среде содержание ТЕМЕД следует значительно увеличить. В нейтральной или щелочной средах ТЕМЕД можно вносить в количестве, эквимолярном по отношению к персульфату.

В качестве катализатора в нередко используют диметиламинопропионитрил —  $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$  (M = 102). Он более эффективен, чем ТЕМЕД, поэтому его вносят в три-четыре раза меньше, чем персульфата

аммония.

## Процесс полимеризации ПААГ

При подготовке определенной серии опытов удобно заранее приготовить концентрированный (30 — 40%) водный раствор акриламида и метиленбисакриламида с определенным соотношением обоих мономеров. Такой раствор можно хранить в холодильнике в течение нескольких недель. ТЕМЕД хранится хорошо, а персульфат аммония растворяют в воде непосредственно перед началом опыта.

Для приготовления геля маточные растворы мономеров и буфера смешивают в такой пропорции, чтобы получить нужную конечную концентрацию акриламида и буфера, дополняют до расчетного объема водой и вносят ТЕМЕД. После этого раствор деаэрируют в колбе Бунзена, присоединенной к водоструйному насосу, добавляют расчетный объем раствора персульфата и заливают в трубку или между стеклами для формирования пластин. При правильном выборе концентраций персульфата и ТЕМЕД полимеризация занимает 30 — 40 мин. Ее следует вести вдали от яркого источника света.

Рассмотрим некоторые факторы, влияющие на этот процесс. Наибольшую опасность для нормального протекания полимеризации акриламида представляет растворенный в воде кислород, молекула которого является определенного рода бирадикалом и потому способна оборвать цепную реакцию свободнорадикальной полимеризации акриламида. Деаэрация смеси растворов необходима именно для удаления из нее растворенного кислорода.

Кислород воздуха в контакте с раствором мономеров может помешать полимеризации, поэтому на поверхность раствора осторожно настилают до высоты 3 — 5 мм деаэрированную кипячением воду или изобутанол.

Если в качестве инициатора используют рибофлавин, то форму с раствором мономеров освещают люминесцентной лампой «дневного света» с расстояния около 5 см в течение 30 — 45 мин. Уже указывалось, что рибофлавин является более эффективным инициатором, чем персульфат. В тех случаях, когда это существенно, персульфат удаляют путем предварительного электрофореза («преэлектрофореза») геля до внесения в него препарата, однако полностью это сделать не удастся. Тем не менее в большинстве случаев в качестве инициатора предпочтение отдают персульфату, поскольку при работе с рибофлавином довольно трудно подобрать оптимальную степень деаэрирования растворов.

Полимеризация — экзотермический процесс, поэтому в случае высокой концентрации акриламида во избежание образования пузырей газа и нарушения однородности геля необходимо обеспечить отвод тепла. Вместе с тем скорость полимеризации увеличивается с ростом температуры за счет ускорения образования свободных радикалов. Этим можно воспользоваться для замедления полимеризации: при охлаждении геля на  $1^{\circ}$  ее продолжительность увеличивается примерно на 2 мин. Полимеризацию гелей, содержащих более 15% акриламида, лучше вести на холоду.

Гель получается наиболее однородным, если время полимеризации составляет 30 — 40 мин. Обычно этого добиваются эмпирически, подбирая оптимальную концентрацию персульфата. Она может варьировать в пределах от 0,02 до 0,2% в зависимости от концентрации акриламида и качества самого персульфата. С увеличением содержания акриламида концентрацию персульфата приходится уменьшать. Имеет смысл предварительно внести различные количества данного препарата персульфата в ряд пробирок с рабочим раствором мономеров акриламида, наблюдая продолжительность полимеризации в них.

Количество ТЕМЕД в объемных процентах можно брать примерно вдвое меньшим, чем персульфата. С учетом различия молекулярных масс и плотности ТЕМЕД это обеспечит их приблизительную эквимоллярность.

Состав буферов, используемых для электрофореза белков и нуклеиновых кислот, не влияет на процесс полимеризации акриламида.

Весьма существенно обеспечить чистоту поверхности стеклянных форм для геля. Их тщательно моют лабораторными детергентами и обильно споласкивают водой. Неплохо дополнительно погрузить пластины или трубки на 1 — 2 ч в хромпик. Иногда их моют горячей азотной кислотой. По хорошо промытой стеклянной поверхности вода должна стекать, не оставляя капель.

ПААГ хорошо прилипает к стеклу даже при малой концентрации акриламида (менее 5%). Это существенно для поддержания геля в устройствах с вертикальным расположением трубок или пластин. Прокладки из тефлона, плексигласа или чистой силиконовой резины не мешают полимеризации геля вблизи их поверхности. Однако некоторые сорта резины с наполнителями, а также смазки, которыми нередко герметизируют прокладки, могут препятствовать полимеризации. Смазку (лучше всего силиконовую) следует наносить тонким валиком из шприца со снятой иглой на таком расстоянии от внутреннего края прокладки, чтобы она не выдавливалась внутрь формы

при ее сжатии пружинными зажимами. Для достаточно ровных стекол тефлоновые прокладки можно использовать без смазки.

Гели с высоким содержанием акриламида могут настолько прочно связываться со стеклом, что их последующее извлечение из трубок или снятие стеклянных пластин с геля становится затруднительным. В этом случае можно силиконировать стекло или использовать формы, изготовленные из плексигласа, к которому ПААГ прилипает хуже, чем к стеклу, но при высокой концентрации акриламида — вполне надежно. Полимеризацию геля между тонким стеклом и толстой (для жесткости) пластиной плексигласа удобно проводить для последующего горизонтального электрофореза. После окончания полимеризации плексиглас можно легко снять, а гель на стекле перенести на охлаждающий столик прибора. Полимеризацию ПААГ для горизонтального электрофореза можно вести просто в тонком слое, налитом на строго горизонтальное стекло, если его поместить в камеру, заполненную азотом.

### **Выбор концентраций мономеров**

Для удобства изложения используются следующие обозначения:  $T$  — процентное отношение суммарной массы обоих мономеров к объему их раствора,  $C$  — процентное отношение массы метиленбисакриламида к общей массе обоих мономеров. Величина  $T$  практически варьирует в пределах 3—30%, а  $C$ , как правило, составляет 1—5%, что соответствует отношению акриламид/Бис в пределах от 99 : 1 по 19 : 1. Однако в некоторых особых случаях, рассмотренных ниже, имеет смысл увеличивать  $C$  до 20% и более. При указании значений  $T$  и  $C$  значок «%» далее будет опущен.

Чем же диктуется выбор значений  $T$  и  $C$ ? Прежде всего, на этот выбор накладывают ограничения механические и адсорбционные свойства геля. Например, гели с  $T \leq 5$  и  $C = 1$  оказываются слишком мягкими и липкими — их невозможно извлечь из стеклянной формы. Для крупнопористых гелей надо увеличивать степень сшивки (повышать величину  $C$  до 3—5), т. е. отношение акриламид/Бис брать в пределах от 35 : 1 до 20 : 1. При этом происходит одновременное повышение прочности геля и ухудшение его способности прилипать к стеклу — гель как бы «замыкается». Мелкопористые гели ( $T$  около 20) при высоком содержании «сшивки» оказываются хрупкими и мутными, поэтому для них величина  $C$  не должна превышать 1—2.

Чем больше содержание акриламида (а величина  $T$ , в основном, определяется им), тем гуще нити полимера, меньше проме-

жутки между ними и сильнее трение. Увеличение содержания «сшивки» ( $C$ ) сначала повышает жесткость геля так как средняя длина свободных участков нитей уменьшается. Трение при этом увеличивается, а миграция биополимеров в геле замедляется, — именно этого и можно было ожидать. Однако далее картина меняется. Эксперимент обнаруживает, что с увеличением  $C$  выше 10 тормозящий эффект геля (при одних и тех же значениях  $T$ ) ослабляется. При  $C > 15$  гель ведет себя как крупнопористый даже при высоких значениях  $T$ . Дело в том, что внутренняя структура геля в этом случае приобретает, по-видимому, совсем иной характер. Благодаря частым сшивкам, расположенным теперь на расстоянии всего лишь нескольких мономерных единиц друг от друга, оказывается энергетически выгодным и вероятным многократное связывание нескольких параллельно идущих нитей в своего рода пучки, которые также образуют хаотически сшитую пространственную сетку. Однако эта сетка оказывается действительно жесткой — нити в пучках раздвинуть невозможно. Зато между пучками полимерных нитей образуются достаточно большие пустоты, заполненные жидкой фазой геля, по которым могут свободно мигрировать молекулы биополимеров.

Возвращаясь к ПААГ, следует указать, что гели с очень высоким содержанием метиленбисакриламида ( $C > 15$ ) хрупки, легко отстают от стенок, непрозрачны и сильно окрашиваются. Этих недостатков лишены гели, сшитые  $NN'$ -диаллилтартардиамидом. Например, гель с  $T = 5$  и  $C = 15$ , сшитый ДАТД, оказывается настолько крупнопористым, что не тормозит миграцию биополимеров с молекулярной массой 0,5 млн. дальтон; при этом он механически прочен, хорошо сцепляется со стеклом и прозрачен. Вспомним, что такой гель к тому же растворим в йодной кислоте. Описано успешное использование для электрофореза белков еще сильнее сшитого геля этого типа. В нем величина  $C$  достигала 27, т. е. отношение акриламид/ДАТД не превышало 4 : 1.

Рассмотрим теперь подробнее влияние выбора значений  $T$  и  $C$  для обычного ПААГ на скорость миграции в нем биополимеров. Тормозящий эффект трения о гель проявляется в снижении электрофоретической подвижности заряженных макромолекул в геле ( $u'$ ) по сравнению с их подвижностью в свободной жидкости с такими же, как у буфера геля, значениями  $pH$  и ионной силы раствора ( $u_0$ ). Электрофоретическую подвижность определяют как величину скорости миграции заряженных молекул (см/ч) при напряженности поля 1 В/см. Величина  $u_0$  зависит от соотношения суммарного электрического заряда макромолекулы (при данном  $pH$ ) и ее массы. Сила, действующая на молекулу в элект-

трическом поле, пропорциональна заряду, а противодействующая миграции вдоль силовых линий поля сила трения о жидкость пропорциональна линейному размеру молекулы, а следовательно, кубическому корню из ее массы. Для ориентировки заметим, что электрофоретическая подвижность большинства кислых белков в свободной жидкости при рН 8,8 лежит в пределах 0,1—0,5 см/ч на 1 В/см. Прямой корреляции между массой молекулы и величиной  $u_0$ , очевидно, быть не должно.

В геле трение существенно возрастает, причем тем сильнее, чем больше масса молекул и меньше средний размер пор, т. е. чем больше величина  $T$  (для малых значений  $C$ ). Показано, что имеет место соотношение:  $\ln(u'/u_0) = -k_R T$ . Величина коэффициента торможения  $k_R$  (порядка 0,1—0,4) зависит от среднего радиуса молекулы  $R$  и степени сшивки геля  $C$ , слабо увеличиваясь с ростом последней в пределах от 1 до 7. Для глобулярных белков  $R$  лежит в диапазоне от 1,57 нм для лактальбумина ( $M = 12400$ ) до 3,61 нм для церулоплазмينا ( $M = 151\ 000$ ).

Для эффективного разделения белков при электрофорезе в ПААГ соотношение  $u'/u_0$  должно составлять 0,1—0,2. Отсюда следует, что оптимальная электрофоретическая подвижность белков в ПААГ лежит в пределах 0,01—0,1 см/ч на 1 В/см. При напряженности поля 10—20 В/см этому соответствуют скорости миграции белков в диапазоне 0,1—2 см/ч. Таким образом, при рабочей длине геля 10 см за 5 ч электрофореза наиболее быстрые белки могут достигнуть конца геля, в то время как наименее подвижные продвинулись лишь на 0,5 см. Цифры эти — сугубо приближенные и приведены здесь лишь для общей ориентировки. В конкретных случаях возможны существенные отклонения от них. Например, если заранее известно, что разделяемые белки сильно различаются между собой по заряду или размерам, то можно вести электрофорез в условиях более высоких подвижностей ( $u'$ ), т. е. в более крупнопористых гелях, и тем сократить время фракционирования в 2—3 раза.

Выбор значения  $T$  зависит от природы различия электрофоретических подвижностей белков в геле. Если сильно различаются размеры молекул, а отношение заряда к массе у них более или менее одинаково, то имеет смысл выбрать  $T$  максимальным. Разделение в этом случае будет происходить только за счет трения о гель, причем тем эффективнее, чем больше  $T$ , хотя при этом в связи с увеличением продолжительности электрофореза усилится диффузия белков. Если же компоненты анализируемой смеси имеют различные отношения заряда к массе, то может оказаться выгодным вести разделение в крупнопористом геле при малых значениях  $T$ ), т. е. как бы в свободной жидкости,

почти не используя эффект трения молекул о гель. По крайней мере, это обеспечит выигрыш во времени фракционирования.

Ориентировочно о характере различия электрофоретических подвижностей двух белков в данных условиях разделения можно судить в том случае, когда известны их молекулярные массы и изоэлектрические точки, а также содержание в них ионогенных аминокислот. Чаще всего бывают, хотя бы приблизительно, известны молекулярные массы. Если они различаются незначительно, то имеет смысл ориентироваться сначала на крупнопористый гель и попробовать поварьировать рН буфера.

Пожалуй, самый существенный вывод из проведенного качественного рассмотрения — заключение об определенной свободе выбора концентрации ПААГ и, особенно, содержания в нем «сшивки» (С в пределах 2 — 5). В любом случае выбор значений Т должен быть сделан на основе ряда пробных опытов, в которых, в частности, следует варьировать рН буфера и продолжительность электрофореза (электрофорез белков в присутствии додецилсульфата натрия пока не рассматривается).

В качестве сугубо ориентировочной можно рекомендовать следующую полученную на практике таблицу соответствия молекулярных масс разделяемых белков (М) и концентраций ПААГ (Т):

М, тыс. Дальтон	Т, %	М, тыс. Дальтон	Т, %
10–40	15– 20	100–300	5– 10
40–100	10– 15	>300	5

Приступая к электрофоретическому фракционированию биополимеров, необязательно в точности воспроизводить значения Т и С, приведенные в литературе для сходного типа экспериментов, но выбранные однажды условия следует, разумеется, точно воспроизводить в собственной серии опытов для надежной идентификации и сопоставления положения соответствующих полос.

## ***ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГЕЛЕЙ И АППАРАТУРА***

Рассмотрим основные технические приемы приготовления и использования гелей для электрофореза. Это рассмотрение

целесообразно провести отдельно для трех вариантов аналитического электрофореза: вертикального в трубках, вертикального в пластинах и горизонтального в пластинах.

### **Вертикально расположенные трубки**

Вертикальное расположение гелей имеет то преимущество, что препарат, наносимый на гель сверху, при любом его объеме равномерно покрывает всю рабочую поверхность геля. Затруднение при вертикальном расположении могут возникать при недостаточной сцепленности геля со стеклом, он будет сползать вниз.

Все приборы с вертикальным расположением гелей конструктивно сложнее, чем аппараты с горизонтальным расположением, т.к. верхний электродный резервуар должен быть поднят над гелем. Необходимо уплотнение в местах сочленения его с трубками или пластинами.

Трубки (12-18штук) с уже заполимеризованным в них гелем вставляют снизу в резиновые прокладки так, чтобы их верхние концы выступали над дном резервуара. Если используют не все трубки, то на их место ставят заглушки. Собранный вместе с трубками верхний электродный резервуар устанавливают на нижний так, чтобы концы трубок оказались на некотором расстоянии от дна последнего и заполняют нижний резервуар электродным буфером до такого уровня, что трубки оказываются почти полностью погруженными в буфер. Это делается для улучшения теплоотвода в процессе электрофореза. С этой же целью нижний буфер перемешивают магнитной мешалкой или вводят дополнительную охлаждающую систему. Оба резервуара цилиндрической или прямоугольной формы изготавливают из плексигласа, что позволяет следить за продвижением фронта красителя. В резервуарах должны быть закреплены электроды из платиновой проволоки. Нижний электрод при этом должен располагаться так, чтобы поднимающиеся от него пузырьки газа не попадали на нижние торцы трубок, что создавало бы помехи протекания через них тока. Объемы электродных резервуаров достаточно велики, чтобы рН находящегося в них буфера не изменялся под влиянием продуктов электролиза.

Для заливки и полимеризации геля нижние торцы трубок заклеивают парафильмом и устанавливают строго вертикально в штатив. Заливают гель. Собрав прибор, заливают буфер в верхний электродный резервуар. При полимеризации геля часть трубки с верхнего ее конца оставляют свободной, и туда при заливке попадает буфер. Затем под него, на поверхность геля, пипеткой накладывают препарат, в который добавляют предварительно 5-10% сахарозы. При любом варианте электрофореза надо быть уверенным в том, что исходный препарат свободен от взвешенных частиц (пыли или

осадков), которые будут собираться на торце геля и однородность тока по его сечению, что повлечет за собой деформацию разделяющихся зон. В этом случае препарат следует отфильтровать или очистить центрифугированием.

По окончании электрофореза гель из трубки извлекают. В большинстве случаев это легко сделать с помощью длинной и затупленной иглы шприца, которую вводят с одного из концов трубки, круговыми движениями отслаивая гель от ее стенок. Если необходимо такую операцию проводят и с другого конца. Через иглу при этом поступает вода из закрепленного выше резервуара. Если гель отслаивается с трудом, в воду можно добавить 0,5-1% раствор детергента. Во избежание поломки следует дать гелю возможность выскользнуть из трубки в сосуд с водой, над которым проделывают эти манипуляции. Иногда для удаления геля из очень длинных трубок по его периферии с концов впрыскивают глицерин, а сам гель выталкивают водой из присоединяемого к трубке шприца. Если гель высокой концентрации вынуть не удастся, его приходится замораживать, а трубку разбивать молотком. Иногда можно решить проблему путем вымачивания трубки с гелем в метаноле: гель постепенно сжижается и отстает от стенки.

Основным недостатком электрофореза в трубках является затрудненный отвод тепла даже при диаметре 5мм. На оси геля температура оказывается выше, чем у его прилегающей к стеклу поверхности. Это приводит к изгибу зон и соответственно окрашенных полос, поскольку электрофоретическая подвижность зависит от температуры. В условиях хорошего теплоотвода можно вести микроэлектрофорез в капиллярах диаметром 0,7-1,5мм.

### **Вертикально расположенные пластины**

Для электрофореза белков обычно используют пластины шириной 8-14 см и длиной (в направлении электрофореза) 8-28 см.

Полимеризацию акриламида или застывание агарозы, а затем и электрофорез ведут в форме, образованной двумя пластинами зеркального стекла толщиной 5-6мм. Расстояние между пластинами задается толщиной прокладок из тефлона или плексигласа («спейсеров») и определяет толщину геля. Прокладки шириной 10-15мм устанавливают вдоль боковых краев стекол. Эти же прокладки можно использовать и для уплотнения формы во время нахождения в ней еще не затвердевшего геля. Для этого устанавливают еще одну прокладку точно такой же толщины по нижнему краю стекол и плотно прижимают ее к фрезерованным торцам боковых прокладок.

Собранную и уплотненную форму устанавливают вертикально и заливают в нее раствор мономеров ПААГ или расплавленную агарозу.

В аналитических опытах на каждой пластине обычно ведут электрофорез нескольких препаратов, состав которых можно затем сопоставить при идентичных условиях разделения. Сопоставляемые препараты фракционируют в параллельных друг другу «треках». В ходе полимеризации на верхнем крае геля формируют ряд одинаковых углублений прямоугольной формы - «карманов», в которые затем вносят исследуемые препараты. Для этого в еще незаполимеризовавшийся гель или горячую агарозу вставляют гребенку из тефлона или плексигласа. Прямоугольные зубцы гребенки и формируют карманы.

Гель или агарозу заливают между пластинами с таким расчетом, что при опускании гребенки до упора жидкий гель заполнит промежутки между ее зубцами. Гребенку начинают вставлять с некоторым перекосом, чтобы под ее зубцами не задерживались пузырьки воздуха. Когда гель готов, вынимают нижнюю прокладку или снимают липкую ленту и осторожно вытаскивают гребенку. При работе с концентрированным ПААГ гель может прилипать к зубцам гребенки и нижние плоскости карманов могут оказаться неровными. Это ухудшает условия формирования исходных полос в геле. В таком случае имеет смысл ввести еще один слой геля пониженной концентрации, и гребенку устанавливают в него.

Для проведения электрофореза чаще всего используются приборы конструкции, предложенной Стадиером. Верхний и нижний резервуары прямоугольной формы соединены вертикальной стенкой, в которой имеется вырез, ведущий в полость верхнего резервуара. Такой же вырез имеет и одна из двух стеклянных пластин, между которыми полимеризуется гель. Пластины прижимаются пружинными зажимами к вертикальной стенке так, чтобы оба выреза совпадали. Буфер в верхний резервуар заливают до такого уровня, чтобы он через вырез покрывал верхний торец геля. При этом вторая, не вырезанная, стеклянная пластинка выступает в роли передней стенки резервуара. В месте совмещения двух вырезов, между стеклянной пластиной и стенкой, должно быть осуществлено уплотнение, препятствующее вытеканию верхнего буфера. В оба резервуара вмонтированы электроды из платиновой проволоки. При установке в прибор форму с гелем частично погружают в буфер нижнего резервуара, так что она опирается на разнесенные по сторонам выступы и ее нижний торец оказывается приподнятым над дном резервуара. После погружения необходимо удалить пузырьки воздуха.

По окончании электрофореза пластины разнимают, отслаивая одну из них от геля с помощью шпателя. Его всовывают между пластинами со стороны карманов и слегка поворачивают. Со второй пластины гель

снимают руками и переносят в ванночку для фиксации или окраски. Необходимо проводить манипуляции в перчатках, т.к. случайное прикосновение кожи рук к рабочей поверхности геля при современных чувствительных методах окрашивания может оставить на геле артефактное белковое пятно.

### **Горизонтально расположенные пластины**

Преимущество-отсутствие проблемы уплотнения. Оба электродных буфера находятся в резервуарах, расположенных ниже уровня горизонтального столика, на который кладут гель.

Гель, полимеризованный на тонкой стеклянной пластинке или плашке из плексигласа, помещают на столик открытой поверхностью кверху, поскольку препарат вносят не с торца, а в ряд специальных «колодцев», расположенных на некотором расстоянии от края. Электрофорез проводят в форезных камерах. Препараты вносят в «колодцы» вместе с красителем - бромфеноловым синим, содержащим также глицерин, который «прижимает» краситель и препарат, не позволяя им диффундировать в геле или в буфере.

## **ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ**

### **Миграция белков в геле**

Ранее было показано, что электрофоретическая подвижность биополимеров в геле ( $u'$ ) пропорциональна их подвижности в свободной жидкости ( $u_0$ ), которая определяется отношением суммарного заряда макромолекулы к ее массе. Фактором, обуславливающим отличие  $u'$  от  $u_0$ , является сила трения о гель, которая зависит от соотношения линейных размеров макромолекул и пор геля, а следовательно, от молекулярных масс белков и концентрации ПААГ. Молекулярные массы подавляющего большинства индивидуальных белков не превышают 500 000. Поэтому использование гелей агарозы оказывается нецелесообразным, кроме тех случаев, когда разделение белков хотят вести только по величине отношения заряда к массе. Как правило, электрофорез белков проводят в ПААГ, содержащем 5 — 20% акриламида.

Белки являются, цвиттерионами. Их суммарным зарядом, а следовательно и отношением заряда к массе, можно управлять путем изменения рН буфера, в котором полимеризуют ПААГ и ведут электрофорез и который далее будем именовать рабочим. Очевидно, что оптимальное значение рН рабочего буфера обус-

ловливает не максимальный заряд, а максимальное различие зарядов разных белков, составляющих исходную смесь. Поэтому в большинстве случаев нецелесообразно использовать экстремальные величины рН рабочего буфера, слишком удаленные от изоэлектрических точек всех белков смеси. Для обычных кислых белков оптимальные значения рН буфера оказываются в нейтральной или слабощелочной области; миграция белков идет в направлении от катода к аноду. Для щелочных белков (гистонов, белков рибосом и др.) целесообразно использовать слабокислые буферы (рН 4 — 5). Эти белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода к катоду.

Несмотря на малое количество фракционируемого белка, от рабочего буфера требуется существенная емкость, так как при образовании зоны локальная концентрация белка может оказаться значительной. Поэтому приходится использовать буферы с концентрацией 0,1 — 0,2 М и более. При этом следует учитывать, насколько близко к границе буферной области лежит рабочее значение рН. Если такое приближение к границе необходимо, то для обеспечения достаточной буферной емкости молярность буфера приходится еще увеличивать. Вопрос об электропроводности буферов рассмотрен ниже.

Отметим далее, что эффект трения о гель зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости белковой макромолекулы. Глобулярные белки, неспособные к агрегации или диссоциации на субъединицы, ведут себя более или менее одинаково, хотя их размеры зависят от плотности упаковки глобулы. Рыхлые глобулярные и, особенно, фибриллярные белки могут деформироваться при взаимодействии с гелем и тем самым облегчать себе миграцию между его нитями. Этот эффект особенно сильно выражен у высокомолекулярных нуклеиновых кислот.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе бывает целесообразно распрямить полипептидную цепочку белка и придать ей жесткость. Именно такой прием используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия (подробно это будет рассмотрено ниже).

### **Напряженность электрического поля (H)**

Разность потенциалов, или напряжение, приходящееся на весь гель, обозначим через  $E$ ; тогда для однородного участка геля длиной  $l$   $E = Hl$ . В проводящей ток жидкости приложенному напряжению  $E$  всегда отвечает некоторая сила тока  $I$ , которая в соответствии с законом Ома определяется суммарным

сопротивлением цепи  $R$  ( $I=E/R$ ). В ПААГ проводящей жидкостью служит буфер, находящийся между нитями полимера. Свой вклад в проводимость вносят и мигрирующие в геле заряженные макромолекулы, но ввиду их низкой концентрации этим вкладом можно пренебрегать.

Электрическое сопротивление буфера определяется двумя факторами: концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью. Второй фактор играет очень важную роль. Например, при одинаковых концентрациях в двух буферах ионов  $Cl^-$  и  $CH_3COO^-$  электропроводность первого буфера будет заметно выше, чем второго. Следует также помнить о том, что электрический ток одинаков по всей длине электрической цепи, т. е. в любом сечении трубки или пластины. Разрывов или скачков тока по длине геля физически быть не может, это аксиома. Иначе обстоит дело с напряжением или напряженностью электрического поля.

Если в любой электрической цепи последовательно включены два различных по своей величине сопротивления  $R_1$  и  $R_2$ , то одинаковый для всей цепи ток  $I$  протекает через первое из них за счет падения на нем напряжения  $E_1=IR_1$ , а через второе — за счет  $E_2=IR_2$ . Полное напряжение по всей электрической цепи  $E=E_1+E_2$ . Если  $R_1$  сильно отличается от  $R_2$ , то и  $E_1$  также отличается от  $E_2$ . При изменении сопротивлений двух участков распределение напряжений на них может существенно измениться, оставаясь в сумме своей неизменным.

Такая ситуация может возникать в ПААГ, состоящем из двух последовательно расположенных участков, где при полимеризации были использованы разные буферы (содержащие ионы с разной подвижностью или просто различающиеся по концентрации). Сопротивления этих участков могут оказаться разными: следовательно, различными могут быть и падения напряжения на них, но эти параметры зависят от длины участков. Однако заведомо будут различаться в рассматриваемом случае значения напряженности поля на двух участках. Действительно, падение напряжения на участке пропорционально его сопротивлению, а следовательно, длине участка. Напряженность же поля есть результат деления падения напряжения на длину, поэтому соотношение напряженностей поля на двух участках геля не зависит от их длины и определяется только концентрациями и подвижностями содержащихся в них ионов. Это — очень важный вывод. В реальных буферных системах геля такую ситуацию можно себе представить в двух простейших вариантах.

Вариант 1. Предположим, что буферы и, соответственно, ионы на двух участках геля (А и В) одинаковы, но концентра-

ция буфера на участке А в 10 раз меньше. Это приведет к тому, что напряженность поля в А будет вдесятеро больше, чем в В. Скорость миграции ионов пропорциональна напряженности поля, и ионы на участке А будут мигрировать в 10 раз быстрее, чем такие же ионы на участке В; это компенсирует разницу в их концентрациях. Число ионов, проходящее за 1 с через любое сечение обоих участков, а также через границу между ними, будет одинаковым, что и означает неизменность тока  $I$  по всей длине составного (ступенчатого) геля. При этом предполагается, что количество ионов в А не истощается — оно пополняется за счет ионов, поступающих из электродного буфера.

Вариант 2. Теперь допустим, что концентрации ионов на обоих участках одинаковы, но ионы на участке А отличаются на много меньшей электрофоретической подвижностью. Речь идет о подвижности в свободной жидкости ( $u_0$ ), так как сетка геля не препятствует миграции малых ионов. Например, пусть в геле А содержатся отрицательные ионы глицина (при щелочном рН), а в геле В — ионы хлора. Меньшая подвижность ионов обуславливает большую величину сопротивления. Суммарное напряжение распределится между участками А и В так, что напряженность поля в А будет соответственно выше, причем именно настолько, чтобы скорость миграции ионов глицина, пропорциональная произведению подвижности на напряженность поля, стала точно такой же, как и у ионов хлора. Этого опять требует условие неизменности величины тока вдоль всего геля.

В более сложных случаях могут различаться как подвижности ионов, так и их концентрации, но в любом случае напряженности электрического поля в двух последовательно расположенных участках геля устанавливаются такими, что они компенсируют все различия и обеспечивают постоянство тока во всем геле. Значения напряженности могут при этом оказаться очень разными. Очень важно, что это различие существенным образом влияет и на соотношение скоростей миграции одних и тех же белков (или нуклеиновых кислот) в двух участках геля. На том участке, где напряженность поля выше, белки будут двигаться быстрее, чем на соседнем. Эта любопытная ситуация будет рассмотрена ниже при обсуждении проблемы сужения белковых зон для противодействия диффузии. В заключение заметим, что сам процесс электрофореза в рабочем геле следует вести в однородном по напряженности электрическом поле, чтобы разделение белков отражало истинное различие их собственных характеристик — молекулярных масс и электрического заряда.

### **Выбор буфера рабочего геля**

Вернемся к зависимости тока и напряженности поля в геле от природы и концентрации рабочего буфера. Заметим сразу, что

сама по себе величина рН практически не сказывается на электропроводности геля. Даже при рН 4 концентрации протонов (0,1 мМ) не даст заметного вклада в электропроводность по сравнению с ионами буфера, концентрация которых, как будет видно дальше, как минимум в 100 раз выше. То же относится и к ионам  $\text{OH}^-$  в реально используемом диапазоне рН щелочных буферов.

В то же время косвенным образом выбор рН может сильно влиять на электропроводность данного буфера, определяя степень диссоциации его ионов. Рассмотрим широко используемый Трис-НСI-буфер. В нем всегда находятся ионы  $\text{Трис}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и незаряженные молекулы Триса. Для этого буфера  $\text{pK}_a = 8,1$ . Это означает, что при рН 8,1 ровно половина молекул Триса несет положительный заряд, практически целиком за счет протонов соляной кислоты, которой титровали буфер. Очевидно, что в растворе находится такое же количество ионов  $\text{Cl}^-$ . Таким образом, при рН 8,1 0,1 М Трис-НСI содержит 0,05 М  $\text{Трис}^+$  и 0,05 М  $\text{Cl}^-$ . Электропроводность этого буфера будет определяться, в основном, ионами  $\text{Cl}^-$ , так как их подвижность намного выше, чем у тяжелых ионов  $\text{Трис}^+$ . 0,05 М  $\text{Cl}^-$  обеспечивает достаточно высокую электропроводность. Трис-ацетатный буфер такой же концентрации и рН имеет значительно меньшую электропроводность, так как подвижность аниона  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  явно ниже, чем  $\text{Cl}^-$ .

При рН 6,7 электропроводность 0,1 М Трис-НСI увеличится примерно вдвое, так как этот рН лежит вблизи границы буферной емкости Триса и почти все его молекулы будут ионизированы; следовательно, концентрация  $\text{Cl}^-$  составит около 0,1 М. Наоборот, при рН 8,9 электропроводность этого буфера значительно ниже, чем при рН 8,1, так как для титрования до рН 8,9 требуется заметно меньше НСI.

Существенную роль в определении электропроводности играет выбор природы буфера, т. е. характера его ионов. Легко понять, что К- или Na-фосфатные буферы, как и Трис-НСI, отличаются высокой электропроводностью за счет ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ . То же относится к К- или Na-ацетатным буферам. Между тем электрофорез в чистой уксусной кислоте умеренной концентрации не связан с высокой электропроводностью. Имидазол-фосфатный буфер той же молярности, что и К-фосфатный, отличается меньшей электропроводностью. Относительно низкую электропроводность имеют Трис-боратный, Трис-глициновый и Трис-барбитуратный буферы. Вообще, можно утверждать, что электропроводности буферных систем, в которых не участвуют легкоподвижные ионы сильных неорганических кислот и щело-

чей, относительно невелики. К сожалению, такие буферы нередко отличаются и меньшей емкостью.

Таким образом, электропроводность рабочего буфера определяется тремя факторами: концентрацией, необходимой для поддержания нужного рН в белковых зонах, степенью диссоциации буферных веществ при этом рН и характером участвующих в диссоциации ионов.

Очевидно, что буфер геля не должен содержать посторонних солей даже в малых концентрациях. Соль, зачастую присутствующую в исходном препарате, несмотря на его малый объем, следует предварительно удалить или хотя бы снизить ее концентрацию до 0,05 М. На избыток соли в препарате указывает, между прочим, размытый характер передней границы и резкая задняя граница полосы препарата сразу после его вступления в гель. При нормальном разделении должна иметь место как раз обратная картина — резкая передняя и более диффузная задняя граница полосы. Это можно проконтролировать путем окрашивания пробного геля через 20 — 30 мин после начала электрофореза или при использовании люминесцентных маркеров.

Помимо суммарной электропроводности, определенную роль играет электрофоретическая подвижность ионов буфера, мигрирующих в том же направлении, что и разделяемые макромолекулы. Качество полос выигрывает, если эти ионы по своей подвижности приближаются к самим макромолекулам. Таковы большие органические ионы: Трис<sup>+</sup> (катион), остатки барбитуровой и какадилловой кислот (анионы) и такие цвиттерионы, как глицин и аланин. Следовательно, при прочих равных условиях Трисовый буфер следует предпочесть при фракционировании щелочных белков, а барбитуратный — для кислых белков вблизи нейтральной области рН буфера.

### **Выделение тепла при электрофорезе**

Высокая электропроводность буфера нежелательна, поскольку ограничивает возможность повышения напряженности электрического поля в геле из-за увеличения тока и связанного с этим выделения тепла. Между тем, именно напряженность поля обеспечивает всегда желательное ускорение миграции белков.

Электрическая мощность, рассеиваемая в виде тепла в геле, равна произведению силы тока на падение напряжения по длине геля (IE). Ранее было отмечено, что разумной продолжительности электрофореза соответствует напряженность поля 10 — 20 В/см. Кстати, как показывает практика, при заметном превышении этих значений качество полос в обычных условиях охлаждения ухудшается. Для геля длиной 20 см такой напря-

женности соответствует напряжению 200 — 400 В. При воздушном охлаждении вертикально расположенных пластин эффективный теплоотвод возможен при рассеиваемой мощности не более 20 Вт, что соответствует силе тока 50 — 100 мА на пластину. В приборах с принудительным жидкостным охлаждением пластин уровень мощности может быть увеличен до 100 Вт с соответствующим повышением напряженности поля и ускорением фракционирования белков. Приборы для электрофореза в горизонтальных пластинах успешно осуществляют теплоотвод при мощности до 40 Вт.

В процессе электрофореза электрическое сопротивление геля может изменяться (чаще всего увеличивается). Причиной этого является замена более подвижных ионов буфера в геле на менее подвижные, например при ступенчатом электрофорезе.

Как уже отмечалось, для сокращения продолжительности разделения и уменьшения диффузии зон электрофорез желательно вести при максимальном напряжении. Его начальное значение ограничивается требуемой вначале силой тока и максимально допустимой для данного прибора мощностью. По мере роста сопротивления в геле сила тока снижается, и напряжение можно увеличивать. Современные источники напряжения делают это автоматически, поддерживая заданный постоянный уровень мощности, рассеиваемой в геле. От опасного (с точки зрения надежности изоляции) повышения напряжения при этом можно застраховаться, ограничив максимально допустимую его величину. Достигнув ее, прибор переключается на режим поддержания постоянного напряжения, поэтому при дальнейшем возрастании сопротивления сила тока и расходуемая в геле мощность начинают снижаться.

В некоторых случаях сопротивление всей цепи электрофореза может и уменьшаться. В частности, это может происходить как из-за нагревания геля (напомним, что подвижность ионов с температурой возрастает), так и за счет накопления ионов в электродных резервуарах. В этих случаях источник тока, отрегулированный на постоянную мощность, автоматически снижает напряжение, а максимально допустимая сила тока может быть заранее ограничена.

### **Загрузка геля. Ширина белковых зон**

Очевидно, что разделение близко идущих зон белков будет тем успешнее, чем уже сами эти зоны, поэтому при электрофорезе следует заботиться о максимальном сужении белковых зон (полос). Это накладывает ограничения на допустимую загрузку

геля. Разумеется, строгость таких ограничений зависит от состава белковой смеси и характера разделения полос. В качестве ориентировочного максимума можно принять загрузку порядка 1 мг суммарного препарата белка на 1 см<sup>2</sup> сечения геля. Для кармана шириной 5 мм в пластине толщиной 1,5 мм это соответствует примерно 75 мкг белка, а для трубки диаметром 6 мм — до 200 мкг. Идентификацию полос белка по их окраске можно проводить при нагрузках, в 10 раз меньших. При перегрузке белковые полосы бывают резкими в передней своей части и размытыми сзади. При этом следует всегда считаться с возможностью преципитации белка в момент вступления его в гель, когда все макромолекулы стягиваются в узкую полосу и локальная концентрация их сильно увеличивается.

Чем меньше загрузка геля, тем лучше разделение близких зон. Ограничения в этом случае накладываются только методами обнаружения слабых полос. Поскольку диффузия зон идет во времени, всегда желательно сокращение продолжительности электрофореза, но не за счет чрезмерно высокой силы тока, вызывающей неравномерный нагрев геля и искажение полос. Электрофорез при пониженной температуре в этом плане дает немного. Интенсивность диффузии уменьшается, но вместе с тем снижается и электрофоретическая подвижность белков, а следовательно, увеличивается продолжительность электрофореза.

В простом варианте электрофореза желательно наносить белковую смесь на гель в минимальном объеме, чтобы высота исходного слоя препарата была не более 2—3 мм. Выполнить это условие нередко бывает затруднительно ввиду недостаточной концентрации исходного препарата. На основании приведенных выше цифр легко рассчитать, что концентрация белка в препарате должна составлять 3—5 мг/мл. Ряд мер позволяет обойти эту трудность; они направлены на концентрирование белкового препарата в узкую зону в момент вступления его в рабочий гель. Основным приемом заключается в том, чтобы создать перед гелем область с повышенной напряженностью поля, где белки мигрируют намного быстрее, чем в рабочем геле. В момент перехода из этой области в рабочий гель они будут стягиваться в узкую полосу, так как находившиеся первоначально далеко позади молекулы белка «догонят» впереди идущие молекулы, замедлившие свое движение при вступлении в рабочий гель.

Область с повышенной напряженностью поля можно создать в крупнопористом геле, полимеризованном в буфере с малоподвижными ионами (см. выше, вариант 2). Такой подход использован в системе ступенчатого электрофореза. Этого же можно добиться и путем растворения исходного препарата белка в том же рабочем буфере, но в

5 — 10 раз менее концентрированном (вариант 1). Нанесение препарата на гель в разбавленном рабочем буфере нашло широкое применение в силу простоты и достаточно хорошей эффективности этого приема.

Другой очень эффективный способ сужения полос — использование градиента пористого геля. В этом случае при миграции вдоль геля передний край каждой полосы все время оказывается в области чуть более концентрированного геля, чем задний. Молекулы белка, расположенные ближе к переднему краю полосы, тормозятся трением о гель сильнее, чем идущие сзади, что и приводит к непрерывному сужению полос в ходе их продвижения по гелю.

### **Введение мочевины и $\beta$ -меркаптоэтанола. Некоторые артефакты**

Высокая концентрация белков в зонах может привести к их осаждению или, по крайней мере, образованию агрегатов: димерных, тримерных и более крупных белковых комплексов, которые могут давать дополнительные полосы. Агрегация происходит, в основном, за счет водородных связей. Для ее предотвращения в рабочий буфер нередко добавляют мочевины в концентрации 4 — 8 М. Она должна быть хорошо очищена, в частности деионизована. Кроме того, следует всегда иметь в виду возможность частичного разложения мочевины с образованием циановой кислоты и карбамоилирования белков. Это особенно относится к долго хранящимся буферам, поэтому лучше добавлять сухую мочевины в буфер непосредственно перед приготовлением геля. Если все же возникает подозрение, что некая полоса появилась за счет карбамоилирования, то следует добавить в исходный препарат цианат и посмотреть, не усилится ли подозрительная полоса. Для предварительной деионизации маточный раствор мочевины (10 М) суспендируют с бифункциональной ионообменной смолой (например, AG 501  $\times$  8) в соотношении 5 г смолы на 100 мл раствора в течение часа при комнатной температуре.

$\beta$ -Меркаптоэтанол в концентрации 1 — 5% нередко вносят в исходный белковый препарат для предохранения его от окисления и образования лишних дисульфидных мостиков. Более энергичное воздействие с разрывом нативных дисульфидных связей и разделением белковых субъединиц производят путем нагревания белкового раствора до 90 — 100° в присутствии не только  $\beta$ -меркаптоэтанола или его аналогов, но и ДДС-Na.

В некоторых случаях при использовании боратного буфера или буферов, содержащих аминокислоты (глицин, аланин), воз-

можно образование комплексов компонентов буфера с белками. Их электрофоретическая подвижность может оказаться несколько иной, чем у чистых белков, и соответствующие белковые полосы раздвоятся. Проверить такого рода артефакт можно повторным электрофорезом. В силу равновесного характера процесса образования комплексов каждая из двух полос дублета при ее повторном электрофорезе в том же буфере даст снова две полосы.

Ранее уже упоминалось об опасности, которую представляют для белков сохраняющиеся в геле после полимеризации долгоживущие свободные радикалы. Указывалось также на способ их удаления — «преэлектрофорез», т. е. пропускание тока через гель без внесения препарата. Добавим, что в особых случаях для полной очистки от радикалов во время преэлектрофореза через гель пропускают такие связывающие их соединения, как цистеин, меркаптоуксусная (тиогликолевая) кислота или гидрохинон.

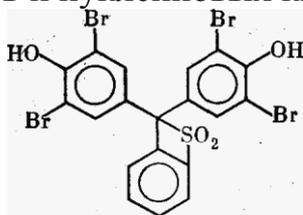
При фракционировании очень малых количеств белка может оказаться заметной сорбция их на геле (белки «размазываются» по гелю). Блокировать это явление можно, вводя в исходный препарат дополнительный быстро мигрирующий белок. Проходя через гель впереди всех остальных белков препарата, он насыщает собой центры неспецифической сорбции в геле.

### **Лидирующие красители**

Для наблюдения за ходом электрофореза в исходный препарат вносят краситель, мигрирующий в том же направлении, что и фракционируемые белки. Он не должен заметным образом связываться с белками, а скорость его продвижения по гелю должна быть заведомо больше, чем у наиболее быстро мигрирующего белка. Вместе с тем краситель не должен слишком сильно отрываться от белков, чтобы его прохождению до конца пластины или трубки соответствовало использование большей части находящегося в них геля для фракционирования белков. Быть может, по ассоциации с велосипедными гонками за лидером, этот краситель называют лидирующим («tracker dye»).

В щелочных и нейтральных буферах, когда кислые белки заряжены отрицательно и мигрируют к аноду, а также для любых белков в комплексе с ДДС-На используют отрицательно заряженные красители. Наибольшее распространение получил бромфеноловый синий, имеющий достаточно сложную структуру; в его состав, в частности, входят два дибромфенольных остатка. Иногда используют еще более сложно построенный краситель — ксиленцианол, электрофоретическая подвижность которого примерно вдвое ниже, чем бромфенолового сине-

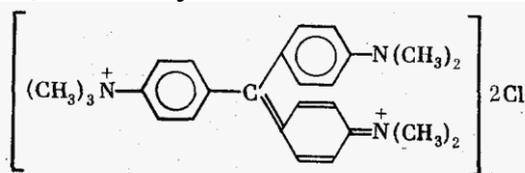
го, поэтому его используют при фракционировании крупных белков и нуклеиновых кислот.



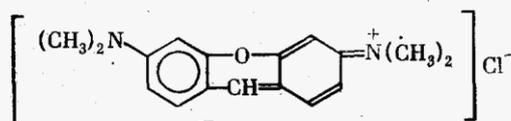
Бромфеноловый синий

Для характеристики электрофоретической подвижности белка в данных условиях электрофореза принято указывать отношение расстояния, пройденного белковой полосой от начала рабочего геля, к аналогичному расстоянию до полосы красителя в этом же геле. Это отношение, как и в хроматографии, обозначают  $R_f$ .

В качестве положительно заряженного красителя для электрофореза в кислой среде, когда белки мигрируют в направлении катода, используют метиловый зеленый или пиронин.



Метиловый зеленый



Пиронин

## РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО РАЗМЕРАМ И ЗАРЯДУ

В этом случае в электродных резервуарах и для полимеризации ПААГ используют один и тот же буфер, поэтому такую систему иногда называют непрерывной, или простой. Строго говоря, непрерывность нарушается тем, что буфер, в котором вносят белковый препарат, с целью концентрирования исходной зоны разбавляют в 5 — 10 раз водой.

Подбор оптимальных условий электрофореза сводится к выбору следующих параметров: пористости геля и степени его сшивки, т. е. значений  $T$  и  $C$  (см. выше); природы, концентрации и рН буфера; диссоциирующих добавок (если это необходимо); максимально допустимой мощности, напряжения и силы тока, а также продолжительности разделения; объема и концентрации исходного препарата; процедуры предварительной обработки препарата.

Выбор значений  $T$  и  $C$  в зависимости от молекулярных масс

разделяемых белков был подробно обоснован в выше. Чаще всего с белками работают при  $T = 3,5 — 20$  и  $C = 1 — 3$ .

### Выбор рабочего буфера

Для обеспечения хорошей электрофоретической подвижности и сохранения вместе с тем ощутимых различий в суммарных электрических зарядах белков выбирают рН буфера, отличающийся на 3 — 4 единицы от среднего значения рI для белков данного типа. Если эти значения неизвестны, то желательно составить себе представление о характере зарядов белков при различных рН по характеру их сорбции на ионообменных смолах.

Для кислых белков часто используют буфер с рН 8,9, для щелочных — с рН 4,3 — 4,5. В качестве слабощелочных буферов кислых белков применяют Трис-НСI, Трис-глициновый, Трис-боратный или Трис-барбитуратный. Для щелочных белков чаще всего используют К-ацетатный и Трис-ацетатный буферы, а иногда, если белок это выдерживает, то и просто уксусную кислоту в концентрации 0,9 М или 5% (0,9 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  имеет рН 2,4; 0,1 М — рН 2,87). О преимуществах буферов, не содержащих легко подвижных ионов ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ), было сказано выше.

Концентрацию буфера выбирают, исходя из допустимой мощности тепловыделения, и вместе с тем так, чтобы напряженность электрического поля в геле не превышала 15 В/см. При более высоких значениях напряженности возможны искажения формы белковых полос. Для 0,1 М Трис-глицинового буфера, например, такой напряженности отвечает плотность тока 20  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Это означает, что через трубку диаметром 6 мм и длиной 8 см в этом случае можно пропускать ток до 5,5 мА при напряжении 120 В. Поскольку трубки довольно трудно охлаждать, обычно используют меньшие величины тока — около 3 мА на трубку. Для вертикальной пластины размером 10 × 14 см и толщиной 1,5 мм в этих же условиях сила тока составит около 30 мА при напряжении около 210 В. Разумеется, эти цифры приведены лишь для ориентировки, и для других условий электрофореза они окажутся иными. Впрочем, вариации для хорошо выбранных систем оказываются не очень значительными, так как для любой буферной системы сохраняется одна и та же тенденция — использовать максимально возможную напряженность поля при максимально допустимой с точки зрения теплоотвода мощности тока.

В двух приведенных простейших примерах напряженность поля в геле можно рассчитывать просто путем деления напряжения, указываемого источником тока, на длину геля. При этом пренебрегают падением напряжения в электродных резервуа-

рах — на участке цепи между электродами и гелем. В том случае, когда электродные буферы находятся в непосредственном контакте с гелем, это вполне допустимо.

Иначе обстоит дело в приборах с горизонтально расположенными пластинами. Например, для электрофореза в приборе типа «Мультифор» при ширине пластины 20 см и толщине геля 1 мм плотности тока  $20 \text{ мА/см}^2$  соответствует его сила 40 мА. Падение напряжения в самом геле длиной 10 см при напряженности поля 15 В/см составит, очевидно, 150 В. Однако напряжение, которое надо установить на источнике тока, должно быть существенно выше ввиду значительного падения напряжения на фитилях, соединяющих буферные резервуары с гелем. Это падение напряжения трудно оценить, поэтому для выяснения значения напряженности поля в самом геле прибор «Мультифор» снабжен специальным вольтметром, измеряющим падение напряжения между двумя точками поверхности геля, находящимися на определенном расстоянии друг от друга. В рассмотренном примере использовали Трис-глициновый буфер с довольно высоким электрическим сопротивлением. Мощность, расходуемая в приборе «Мультифор», в этом случае составит всего лишь 6 Вт ( $150 \text{ В} \times 0,04 \text{ А}$ ). Иная картина получится, если тот же гель заполимеризовать в 0,1 М Na-фосфатном буфере с рН 7,1. Электропроводность этого буфера довольно высока за счет легко подвижных ионов  $\text{Na}^+$ . Измерения в том же приборе показывают, что уже при напряженности поля 5 В/см (падение напряжения — 50 В на пластину) плотность тока в геле возрастает до  $100 \text{ мА/см}^2$ . Если довести напряженность поля в геле до 15 В/см, то сила тока через пластину сечением  $2 \text{ см}^2$  ( $20 \times 0,1 \text{ см}$ ) составит 600 мА. При падении напряжения на геле, равном 150 В, это привело бы к совершенно неприемлемому уровню тепловыделения (мощность 90 Вт). Однако дойти до этого режима практически невозможно ввиду большого падения напряжения на фитилях, их разогрева, обсыхания и дальнейшего увеличения сопротивления. В итоге, при работе с фосфатным буфером приходится ограничивать силу тока ( $\sim 200 \text{ мА}$ ) и работать при пониженных значениях напряженности электрического поля. Соответственно увеличивается и продолжительность электрофореза.

Еще раз подчеркнем, что электропроводность любого буфера определяется не только концентрацией, но степенью и характером его ионизации (близостью рН к  $\text{pK}_a$  буфера и подвижностью образующих ионов). Концентрации рабочих буферов в пределах 0,05 — 0,1 М можно считать ориентировочно нормальными, хотя для слабо ионизированных буферов, используемых вблизи границы их буферной области, можно встретить в литературе и бо-

лее высокие значения концентрации — вплоть до 0,4 М.

В непрерывной системе сопротивление геля не должно заметным образом изменяться в процессе электрофореза. Как следствие этого, не должна изменяться и расходуемая мощность. Повышение напряжения источника, работающего в режиме постоянного тока, или уменьшение силы тока при постоянном напряжении говорят о каких-то неполадках в электрической цепи, например: о высыхании фитилей или нарушении контактов между ними и гелем.

### **Использование мочевины**

Уже указывалось, что для предотвращения агрегации белков в рабочий буфер геля нередко вводят мочевины в концентрации от 2 до 8 М. Ее, разумеется, добавляют и в исходный белковый препарат. В электродные буферы вносить мочевины не нужно, так как, не будучи заряженной, она не мигрирует в геле, а следовательно, и не нуждается в пополнении. На электропроводности буфера присутствие мочевины практически не сказывается. Однако под влиянием нового окружения могут изменяться рК отдельных групп и суммарный заряд белка. Это может заметно повлиять на конфигурацию, а следовательно, и на подвижность белков.

В концентрированных растворах мочевины происходит денатурация белков, часть дисульфидных мостиков рвется и полипептидная цепочка, утратив вторичную структуру, ведет себя как хаотический клубок. Денатурация не является полной и может быть обращена. Степень и обратимость денатурации зависят от природы белка и концентрации мочевины, поэтому при выборе этой концентрации иногда приходится искать компромисс между опасностью агрегации белков и угрозой их необратимой денатурации. Об очистке мочевины было сказано выше; добавим только, что образование цианата в растворах мочевины идет ускоренно при щелочных рН, поэтому щелочные буферы с добавкой мочевины следует использовать сразу после их приготовления.

Для составления геля пользуются обычно «маточными» растворами повышенной концентрации. Удобно, например, приготовить 40%-ный водный раствор смеси мономеров ( $T = 40$ ). Напомним, что  $T$  выражает процентное отношение массы обоих мономеров к конечному объему их раствора, а  $C$  — отношение массы  $NN'$ -метиленабисакриламида к сумме масс двух мономеров. Отсюда следует, что  $C$  не изменяется при разбавлении маточного раствора. Так, если предполагается иметь для рабочего геля параметры  $T = 10$  и  $C = 2,6$ , то при составлении маточного раствора можно взять  $T = 40$  и  $C = 2,6$ . Практически это означа-

ет, что надо отвесить  $(40 \times 2,6)/100 = 1,04$  г метиленбисакриламида и  $40 - 1,04 = 38,96$  г акриламида и растворить их в воде до конечного объема 100 мл. Маточный раствор буфера может иметь двух- или пятикратную концентрацию. В последнем случае полезно проверить, что рН буфера сохраняется при соответствующем разбавлении. Смесь расчетных объемов маточных растворов мономеров и буфера доводят до нужного объема водой.

Персульфат аммония лучше добавлять в минимальном объеме, который можно не учитывать. Для этого готовят концентрированный, обычно 10%-ный, маточный раствор персульфата, остатки которого вскоре придется выбрасывать, так как он не хранится. Объемом вносимого в смесь ТЕМЕД также всегда можно пренебрегать. Выбор содержания персульфата аммония и ТЕМЕД, порядок их внесения в раствор мономеров, необходимость деаэрации и контроль за процессом полимеризации геля были подробно рассмотрены ранее.

Для приготовления геля с высоким содержанием мочевины ее добавляют во все маточные растворы. При растворении мономеров до  $T = 40$  концентрацию мочевины приходится ограничивать значением 2—3 М. Зато маточный раствор буфера можно приготовить на 10 М мочевины и такой же концентрации раствор ее использовать для доведения до расчетного объема вместо воды.

Особо гидрофобные белки, например тяжелые цепи миозина, при концентрировании их в полосах агрегируют даже в присутствии 8 М мочевины. Во избежание этого их можно обработать фенолом, который играет роль мягкого детергента. Белок сначала растворяют в буфере до безопасной концентрации, а потом переводят в смесь, состоящую из 50% фенола, 25% уксусной кислоты, мочевины до концентрации 2 М и воды. Электрофорез проводят в ПААГ, полимеризованном в 35%-ной уксусной кислоте с 5 М мочевины.

В некоторых случаях бывает необходимо при электрофорезе сохранить ферментативную активность белка — либо для последующей его элюции и использования, либо для обнаружения с помощью биологического теста, т. е. по превращению субстрата ферментативной реакции. Использование в этом случае концентрированного раствора мочевины является нежелательным, и уменьшать опасность агрегации приходится за счет снижения загрузки геля. Чувствительность биологических тестов зачастую позволяет это сделать. Необходимо точно проверить устойчивость фермента при выбранной величине рН рабочего буфера. При этом следует иметь в виду, что истинная величина рН в геле примерно на 0,5 ед. больше, чем у используемого щелочного буфера, и на 0,5 меньше, чем у кислого.

Иногда следует проверить сохранность ферментативной активности белка в ходе электрофореза в связи с возможностью разобщения фермента с другими белками или необходимыми для его работы кофакторами. Такую проверку можно проводить следующим образом: на разных стадиях электрофореза вырезать и гомогенизировать участки геля, содержащие соответствующую белковую полосу, и прямо в гомогенате, в сопоставимых условиях, проверять сохранение активности фермента, используя возможность диффузии субстрата реакции в гель, а ее продукта — из геля.

### **Загрузка геля и подготовка препарата**

Исходный белковый препарат растворяют в том же рабочем буфере, но меньшей концентрации (в 5—10 раз). По рассмотренным выше причинам это приводит к значительному сужению исходной зоны белков при ее вступлении в гель. Если электрофорез идет в присутствии мочевины, то ее концентрация в разбавленном буфере должна быть такой же, как в рабочем буфере геля. Еще раз подчеркнем необходимость удаления солей из препарата; в противном случае эффект концентрирования белка при вступлении в гель будет смазан.

Иногда проводят предварительное полное восстановление белка путем прединкубации его в течение ночи при комнатной температуре в буфере с рН 8,5—9, содержащем 0,1 М ( $\beta$ -меркаптоэтанол) и 9 М мочевины (щелочное значение рН буфера способствует восстановительному эффекту  $\beta$ -меркаптоэтанол).

В раствор препарата добавляют до 10% глицерина или сахарозы, чтобы облегчить его подслаивание под электродный буфер (см. выше). Наконец, в препарат вносят еще и краситель, например бромфеноловый синий до концентрации 0,01%. Миграция этой «лидирующей» зоны до конца геля определяет момент окончания электрофореза. Заметим кстати, что при последующей фиксации белков бромфеноловый синий обесцвечивается. Если далее предполагается определение величины  $R_f$ , то положение окрашенной полоски сразу после извлечения геля из формы следует отметить (например, вколоть в гель тонкую проволочку).

Как уже подчеркивалось, препарат должен быть заведомо свободен от пыли, нерастворенных белков и других частиц. После внесения препарата в трубку или карман пластины на 5—15 мин включают напряжение, пониженное примерно вдвое против расчетного. За это время лидирующий краситель должен полностью войти в гель. Такая процедура улучшает условия формирования исходной белковой полосы в геле. Затем перехо-

дят на расчетный режим электрофореза по напряжению и силе тока.

## Окрашивание белков в ПААГ

Окрашивание и локализацию белковых зон после их разделения электрофорезом в ПААГ в большинстве случаев осуществляют путем их покраски в геле. Зоны проявляются как окрашенные полосы или пятна различной интенсивности, в зависимости от содержания в них белка. Для окраски гель вымачивают в растворе красителя, который диффундирует внутрь него и прочно связывается с белками. Процесс диффузии занимает несколько часов. Во избежание размывания полос белки фиксируют-вымачивают в 10-50%-ной ТХУ. Обычно фиксацию совмещают с окрашиванием, используя раствор красителя в смеси уксусной кислоты и метанола или в ТХУ.

Краситель связывается не только с белками, но и с гелем, поэтому проводят отмывку- вымачивание в большом объеме растворителя с несколькими сменами. Это происходит как за счет простого замещения буфера геля на раствор красителя, так и в результате некоторой сорбции его на геле. Однако связывание красителя с гелем значительно менее прочно, чем с белками, поэтому от «фона» удастся без особого труда избавиться «отмывкой» геля, например вымачиванием его в относительно большом объеме растворителя с несколькими сменами. Если отмывка идет только за счет диффузии красителя из геля, она занимает несколько часов, обычно ее ведут в течение ночи. Во избежание растворения осажденных белков краситель отмывают тоже уксусной кислотой, часто в смеси с метанолом, который улучшает растворимость красителя. Отмывка ускоряется при повышенной температуре (37- 50°) и перемешивании растворителя, однако при этом есть опасность ослабления окраски полос.

Все типы обычно используемых красителей для белков несут на себе электрический заряд того или иного знака, поэтому отмывку геля можно еще ускорить, если в растворителе суспендировать немного ионообменной смолы, связывающей краситель и тем самым сдвигающей равновесие диффузии. Часто используют для этой цели смолу смешанного типа AG 501x8.

Наконец, процесс отмывки можно сократить до десятков минут, если воспользоваться электрофорезом. Электрическое поле накладывают на гель в поперечном направлении - перпендикулярно оси трубки или поверхности пластины. Не связанные с белками молекулы красителя благодаря своему заряду быстро выходят из геля. Разумеется, для этой цели нужно иметь специальный, хотя и очень простой, прибор для поперечного электрофореза. Такие приборы («дестейнеры») имеются в продаже, но их легко изготовить и в лаборатории.

До сих пор речь шла о неспецифической окраске белков. Если в ходе электрофореза ферменты не утрачивают своей биологической активности,

то их локализацию в геле можно осуществить с помощью специфической ферментативной реакции или цепи реакций, дающих окрашенные продукты. В этом случае гель вымачивают в растворе соответствующих субстратов. Разумеется, фиксировать белки осаждением в этом случае нельзя и приходится мириться с некоторым размыванием белковых полос.

Впрочем, низкомолекулярные субстраты зачастую диффундируют в гель быстрее, чем довольно крупные молекулы красителей, и продолжительность вымачивания бывает можно сократить.

Иногда возникает необходимость вести наблюдение за миграцией белковых зон в ходе электрофореза. Для этого исходную смесь белков можно окрасить красителем «Remazol», который ковалентно связывается с белком и мигрирует вместе с ним. Чувствительность окрашивания белков многократно увеличивается при использовании перечисленных ниже флюоресцентных красителей. Многие из них связываются с белками или пептидами, в основном по концевым аминогруппам. Их также можно использовать для наблюдения за ходом электрофореза после предварительной обработки исходного препарата.

### **Кислые красители**

Для фиксации белковых полос окрашивание ведут в кислой среде. Какой бы буфер не использовался для электрофореза, к моменту окрашивания он заменяется на раствор ТХУ, поэтому преимущественный заряд любого белка оказывается положительным за счет остатков лизина, аргинина и гистидина, так что для белков используют преимущественно кислые красители, несущие остатки сульфокислоты. Они сохраняют свой отрицательный заряд и при низком рН.

Продолжительность окрашивания зависит от толщины геля и его пористости и занимает от 2 до 12 ч. Для ускорения процесса повышают температуру. Гель из трубки отмывают в пробирке, пластинки - в ванночке.

Окрашенный гель из трубки можно сканировать в специальном приборе или с помощью приставки к спектрофотометру. Но не следует слишком полагаться на соотношение размеров пиков такой электрофореграммы при оценке количественного соотношения белков в полосах, т.к. связывание красителя зависит не только от концентрации, но и от химического состава и конформации белка. Гели можно сканировать по УФ - поглощению белков.

Также для количественных измерений используется счет радиоактивности в белковых полосах при условии однородности радиоактивной метки по всем компонентам смеси.

Для фиксации основных белков, низкомолекулярных пептидов и гормонов, осаждающихся при традиционной обработке, применяется вымачивание в течение 1ч. в 5%-ном растворе формальдегида и 25%-ном этаноле с добавлением красителя.

## **Другие красители**

Для окраски кислых фосфопротеидов используют их высокую степень сродства к трехвалентным металлам, например  $Al^+$ .

Белки окрашивают ионами серебра в присутствии небольшой добавки ионов меди. К гелю, предварительно обработанному формальдегидом, вносят водный раствор нитратов серебра и меди с этанолом и пиридином. Этот метод имеет большую чувствительность. Существует несколько модификаций этого метода с использованием аммиачного серебра или с помощью фотохимического восстановления серебра, что удешевляет метод, упрощает и ускоряет его.

## **Флуоресцентные красители**

Данзилхлорид. В щелочной среде, отщепляя ион хлора, данзильный остаток присоединяется к аминокислотам, пептидам и белкам, главным образом, по их концевой аминогруппе. При этом его способность флюоресцировать сохраняется. Данзилирование белков позволяет следить за их миграцией при электрофорезе путем освещения гелей длинноволновым УФ светом. Скорость миграции практически не изменяется. Данзилирование не мешает протеолизу белков при пептидном анализе после элюции из геля.

Флюоресцамин. Присоединяется к концевым аминогруппам и остаткам лизина. Продукт дает два максимума поглощения (300 и 390 нм) и максимум флюоресценции при 480 нм. Ни сам флюоресцамин. Ни его продукты не флюоресцируют в растворе. Вносит дополнительный отрицательный заряд и изменяет электрофоретическую подвижность. Сходным препаратом является МДФФ, который, однако, не вносит дополнительного заряда.

Ортофталевый альдегид. Реагирует с первичными аминами белков и пептидов. Необходимо предварительно растворить в органическом растворителе и смешать с избытком водного буфера. Чувствительность значительно выше других красителей, но и фон флюоресценции побочных продуктов значителен.

## **Элюция белков из геля**

Простейший прием-извлечение белка из фрагмента геля за счет диффузии в течение длительного времени при  $37-40^0$ . Это приемлемо и для свободных белков и для комплексов с ДСН. Для этого гель измельчают, в суспензию добавляют ДСН (даже если проводили электрофорез без него). После окончания элюции гель удаляют центрифугированием. От ДСН и красителя отмывают ацетоном. Осажденный ацетоном белок высушивают или лиофилизируют. Существует огромное разнообразие методов и реактивов для элюции, предложенных различными авторами.

Возможен и другой подход. Сначала ДСН и краситель экстрагируют из ПААГ без растворения осажденного в полосах белка. Этого добиваются

пятикратной гомогенизацией геля в растворе, содержащем 10% ТХУ и 30% этанола. Гель осаждают центрифугированием. Из очищенного геля белки экстрагируют 0,1М NaOH в течение 2 ч. при 37<sup>0</sup> при встряхивании. Для малых концентраций белка не подходит.

Нефиксированные белки удобно извлекать из геля возобновлением электрофореза до выхода белка из геля. Вырезанный из геля участок помещают в трубку на небольшую «пробку» из крупнопористого ПААГ или агарозы и заливают буфером, а на нижний конец трубки надевают заполненный буфером диализный мешочек. Затем возобновляют электрофорез и ведут его до тех пор, пока белок не выйдет из трубки в мешочек.

Нитроцеллюлозные мембранные фильтры сорбируют щелочные белки, которые выходят из геля за счет диффузии. Белки на фильтре можно окрасить. Также используются различные виды блоттинга.