

Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий учебной практики  
«Профильная учебная практика по биохимии»

на тему:

«Электрофорез вертикального и горизонтального типов. Принцип  
постановки»

Выполнили:

студенты 3 курса 2 группы

Медико-биологического факультета

Направления подготовки Биология

Профиль Биохимия

Черняева Мария Владимировна

Машина Ангелина Александровна

Филиппова Юлия Михайловна

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной

медицины и биологии

Толкачев Борис Евгеньевич

*Лорано (82 балла)  
сш. замечания  
в течение работы  
Маш (Толкачев)  
24.04.2015*

## Содержание

Введение

Техника приготовления буфера и аппаратура

Метод горизонтального электрофореза

Метод вертикального электрофореза

Список литературы

## Введение

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. Со временем эти зоны распределяются по длине канала

## 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 (12-18 штук) 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

## *оакуптмвие иуиерацши атрашиу*

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 парафином 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 наслаивают 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 12 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 съезживается 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

*незамоченная шпатель*  
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 заполнил 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 прилипнуть 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 Стаднером. 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, невырезанная, 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.



## Метод горизонтального электрофореза

Наиболее распространенным на сегодняшний день является метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, - например, бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенок в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят продукты амплификации. Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияет концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 мин до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254, 310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Яркость полос продуктов амплификации может быть различной. Поэтому часто в ПЦР-лабораториях принято оценивать результат по трех-, четырех- или пятибалльной системе. Однако, как уже отмечалось ранее, это нельзя связывать с начальным количеством ДНК-мишени в образце. Часто уменьшение яркости свечения полос связано со снижением эффективности амплификации под влиянием ингибиторов или других факторов.

## Метод вертикального электрофореза

Метод вертикального электрофореза принципиально схож с горизонтальным электрофорезом. Их отличие заключается в том, что в данном случае вместо агарозы используют полиакриламид. Его проводят в специальной камере для вертикального электрофореза. Электрофорез в полиакриламидном геле имеет большую разрешающую способность по сравнению с агарозным электрофорезом и позволяет различать молекулы ДНК разных размеров с точностью до одного нуклеотида. Приготовление полиакриламидного геля несколько сложнее агарозного. Кроме того, акриламид является токсичным веществом. Поскольку необходимость определить размер продукта амплификации с точностью до 1 нуклеотида возникает редко, то в рутинной работе этот метод не используют.

### Список литературы:

1. Л. А. Остерман. “Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и центрифугирование”. М. “Наука”, 1981.
2. Л. А. Остерман. “Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами”. М., “Наука”, 1983. 12. Л. А. Остерман. “Хроматография белков и нуклеиновых кислот”. М., “Наука”, 1985.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.