

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Отчетная работа

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

на тему:

«Принципы димерного электрофореза и его значение в протеомных  
исследованиях»

Выполнили:

студентки 3 курса

Медико-биологического факультета

направления подготовки: Биология

(профиль Биохимия), 302 гр

Синельникова Виктория Александровна

Бондарева Анна Александровна

Проверил:

Доцент кафедры фундаментальной

медицины и биологии, к.м.н.

Морковин Е.И.

*Отлично (52)*  
*Тема раскрыта подробно*  
*и ясно.*  
*Морковин Е.И.*  
*20.04.2018*

## Содержание

Введение.....	3
Двумерный электрофорез. Принцип метода.....	6
Разновидности двумерного электрофореза.....	7
Техника первичной идентификации белков методом двумерного гельэлектрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).....	15
Области применения двухмерного электрофореза.....	24
Список литературы.....	26

## **Введение**

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. Этот метод позволяет разделить макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как:

- размеры (молекулярная масса);
- пространственная конфигурация;
- вторичная структура;
- электрический заряд.

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

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

канал заполняют гелем. Достаточно чистая и гидрофильная сетка такого геля удерживает жидкость от вытекания и препятствует конвекции. Между тем, при наличии сетки любые молекулы при миграции сталкиваются с нитями полимера, что увеличивает эффективное трение о среду.

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

Есть, разумеется, и свои трудности. Разделяемые молекулы все же находятся в растворе, поэтому неизбежна их диффузия, приводящая к размыванию зон. Ее повышает и выделение тепла, происходящее при протекании через жидкость электрофоретического тока. Проблема теплоотвода и, главное, его равномерного распределения по всему гелю очень важна еще и потому, что скорость миграции макромолекул в электрическом поле зависит от температуры.

В ходе электрофореза зоны растворенных молекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в препарат добавляют краситель, движущийся в электрическом поле аналогично разделяемым молекулам (имеющий сходную электрическую подвижность), но в виде окрашенной зоны. Когда эта зона доходит до конца рабочего канала, электрофорез останавливают. Разделившиеся зоны во избежание диффузии немедленно фиксируют. Зоны наблюдают, как правило, с помощью метки, связывающейся с макромолекулами (обычно, флуоресцентной, радиоактивной).

Используют как цилиндрические гели в трубках, так и тонкие заполимеризованные пластины. Кроме ПААГ и агарозы в качестве носителя

жидкостной фазы для разделения макромолекул иногда применяют сефадекс, вязкий раствор сахарозы и др. Однако одномерный гель-электрофорез ПААГ не способен фракционировать смеси, содержащие более 100 белков. Поэтому он не пригоден для анализа сложной смеси белков, полученных от целых клеток, тканей или биологических жидкостей, содержащих намного большее число белков. Чтобы решить проблему фракционирования протеома используют двумерный гель-электрофорез (2Д-электрофорез). При осуществлении 2Д-электрофореза белки разделяют по двум различным физико-химическим свойствам. Вначале белки разделяют в первом направлении по заряду согласно их изоэлектрической точке путем изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), а затем во втором направлении – согласно их молекулярной массе с помощью электрофореза в ПААГ. Обе процедуры проводят в полиакриламидном геле. В результате проведения 2БД-электрофореза получают электрофореграмму, на которой представлено много пятен белков.

## **Двумерный электрофорез. Принцип метода**

Эффективность электрофоретических методов зависит от многих факторов, в т. ч., от суммарного заряда молекул, ситового эффекта используемого для электрофореза носителя, присутствия денатурирующих агентов и т. п. Благодаря такой вариабельности электрофорез обладает высокой разрешающей способностью. Однако при исследовании сложной смеси, состоящей из многих белков (а такие исследования приходится проводить довольно часто) некоторые белковые зоны могут перекрываться. В подобных случаях электрофорез во втором направлении может привести к более полному разделению анализируемых веществ, и этот принцип лежит в основе методов двухмерного электрофореза. Электрофорез в первом направлении проводят обычным способом, а затем полученную электрофореграмму используют без фиксации и окрашивания в качестве стартовой зоны для электрофореза во втором направлении, перпендикулярном первому. Если оба этапа электрофореза осуществляются в идентичных условиях, то скорость миграции белков в обоих направлениях одинакова и зоны разделения молекул располагаются по диагонали. Очевидно, что такие системы улучшают разделение лишь постольку, поскольку оно зависит от удлинения пути миграции разделяемых белков. Чтобы повысить разрешение в значительной степени, необходимо на втором этапе изменить по крайней мере один из электрофоретических параметров.

## Разновидности двухмерного электрофореза

Основные принципы двумерного электрофореза в полиакриламидном геле были сформулированы Раймондом. Он показал, что электрофорез на пластинах полиакриламидного геля в двух направлениях (ортакрильная методика – от англ. *orthogonal* и *acrylamide*) позволяет получить информацию о разделении сходных белков по зарядам и размерам. Если концентрация полиакриламидного геля во втором направлении выше, чем в первом, а значения рН одинаковы, то скорость миграции всех компонентов данного размера будет изменяться одинаково, и в результате эти белки будут располагаться на прямой, проходящей через старт. Если же при электрофорезе во втором направлении применяют буферную систему с другим рН, то наблюдается иная электрофоретическая картина. В этом случае на разделение влияют изменения в характере диссоциации определенных групп белковых молекул. Все белки с идентичными кривыми титрования будут располагаться на прямой, проходящей через точку нанесения пробы, а компоненты с другими кривыми титрования будут находиться вне этой линии. На практике следует менять и концентрацию геля, и буферную систему.

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

В зависимости от изменений, вводимых при электрофорезе во втором направлении, можно выделить следующие типы двухмерного электрофореза:

1. Двухмерный электрофорез без изменений рН;
2. Двухмерный электрофорез с изменением рН;

3. Диск-электрофорез с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН;
4. Изоэлектрофокусирование с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН.

### **1. Двухмерный электрофорез без изменений рН**

В данном методе используется эффект молекулярного сита, свойственный полиакриламидным гелям различной концентрации. Чтобы улучшить разрешение, рекомендуется на первом этапе проводить электрофорез в геле низкой концентрации полиакриламида, а на втором – электрофорез в градиенте концентрации полиакриламида. Такие системы были применены при разделении белков сыворотки крови. Марголис и Кенрик для электрофореза в первом направлении использовали 2,7%-ный гель, а Райт - 4,75%-ный. Электрофорез во втором направлении проводили в градиенте концентрации 4 - 20%-ного или 2 - 30%-ного полиакриламида. В первом направлении применение 2,7% - ногополиакриламидного геля улучшало разделение белков с большой молекулярной массой, тогда как при электрофорезе во втором направлении разделение было лучше при использовании более крутого градиента. Об эффективности указанных методов свидетельствует то, что при разделении с их помощью белков сыворотки человека на электрофореграмме было получено более ста зон.

В обоих описанных выше методах электрофорез в первом направлении проводили в цилиндрических гелях, а во втором – на пластинах. Чтобы предотвратить смешивание разделенных белковых зон в тот момент, когда они в процессе электрофореза выходят из первого геля и проникают во второй, пространство между этими двумя гелями также должно быть заполнено гелем. Один из способов его заполнения состоит в том, что столбик первого геля помещают в кювету для формирования второго геля,



наливают в нее гелеобразующий раствор и дают ему заполимеризоваться. По другому способу полимеризацию пластин геля проводят уже во время электрофореза в первом направлении. В этом случае на готовую пластину геля наливают сверху свежий гелеобразующий раствор и погружают в него столбик первого геля. Когда для этой цели используют полиакриламид, то, чтобы уменьшить возможность образования артефактов, проводят, как правило, фотополимеризацию. Существует также простой и быстрый способ заполнения пространства между гелями расплавленной агарозой. Преимущество этого способа заключается в том, что благодаря быстрому застыванию агарозного геля сокращается время операции и уменьшается степень расширения разделенных зон в результате диффузии.

Был описан также метод двухмерного электрофореза, осуществляемый в обоих направлениях на одной пластине геля. Вейн проводил такой электрофорез в сигмоидном вогнутом градиенте концентрации полиакриламидного геля. Для его формирования использовали квадратную ячейку, в которую гелеобразующий раствор наливали с одного угла. В противоположный угол наносили образец, и затем проводили электрофоретическое разделение в двух перпендикулярных направлениях.

## **2. Двухмерный электрофорез с изменением рН**

По этому методу электрофорез в первом направлении проводят в цилиндрическом геле, заключенном в стеклянную трубку, а во втором – на пластине геля. После первого разделения гель необходимо уравновесить с буфером, используемом во втором направлении. Один способ такого уравновешивания состоит в простом вымачивании геля в буферном растворе. Однако в этом случае для достижения нужного рН требуется несколько часов, а за это время может произойти расширение зон за счет диффузии и частичное вымывание белков из геля. Другой путь изменения рН предложили Авитал и Элсон. После первого разделения при щелочном рН гель подкисляли, помещая его на несколько минут в пары

концентрированной соляной кислоты или в ее разбавленный раствор. После уравнивания цилиндрический столбик геля заправляют в пластину геля и проводят электрофорез во втором направлении обычным способом. Разрешающую способность обсуждаемого метода можно повысить, используя на двух последовательных этапах электрофореза гели разной концентрации. Подобные системы применялись, в частности, для разделения рибосомальных белков.

### **3. Диск-электрофорез с последующим электрофорезом в ДСН-полиакриламидном геле**

Настоящий метод дает превосходное разрешение, если первый этап электрофореза проводить в относительно разбавленных гелях при рН, подходящем для всех белков, присутствующих в смеси. Он не только обладает очень хорошей разрешающей способностью, но и позволяет определить молекулярные массы разделяемых компонентов, поскольку подвижность белков при миграции в гелях, содержащих ДСН, зависит лишь от размеров молекул. Методы такого рода широко используются для разделения природных смесей белков.

После проведения диск-электрофореза при любом выбранном рН гель следует уравновесить с содержащей ДСН буферной системой, применяемой во втором направлении. Простейшим способом, опять же, является вымачивание геля в буфере, содержащем ДСН в значительно более высокой концентрации (ок. 1 – 2%), чем в пластине (ок. 0,1%). При этом следует иметь в виду, что во время уравнивания может происходить потеря белка и расширение зон.

Другой способ осуществления реакции между белками и ДСН после первого этапа электрофореза предложили Метц и Богорад. Они применили процедуру, в которой буфер, используемый при электрофорезе в первом направлении, играет роль концентрирующего буфера в неоднородной

системе, применяемой во втором направлении. Сразу же после первого этапа электрофореза гель заправляют в пластину геля и начинают электрофорез в направлении, перпендикулярном первому. В верхний электродный буфер добавляют ДСН, который под действием электрического поля входит в гель и образует комплексы с белками, разделенными при электрофорезе в первом направлении.

Электрофорез во втором направлении можно также проводить в геле с градиентом концентрации полиакриламида в присутствии ДСН. Такая система была использована для разделения рибосомальных белков. Применение градиента геля во втором направлении целесообразно, по-видимому, в тех случаях, когда разделяемые белки имеют молекулярные массы, различающиеся в широких пределах.

#### **4. Изоэлектрофокусирование с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем ДСН**

Вскоре после первых сообщений об ИЭФ в геле этот метод в сочетании с электрофорезом был использован для разделения белков сыворотки крови и пероксидаз из сока клубней картофеля. Электрофорез во втором направлении можно проводить не в полиакриламидном, а в крахмальном геле. В 1975 году О'Фаррелл опубликовал сенсационные результаты двумерного фракционирования радиоактивно меченных белков *E. coli*. В первом направлении он использовал ИЭФ, а во втором – ступенчатый электрофорез в присутствии ДДС-На с использованием градиента концентрации ПААГ. По окончании фракционирования на пластине было выявлено около 1100 пятен различных белков.



Кенрик и Марголис применили для разделения белков сыворотки крови сочетание ИЭФ с электрофорезом в градиенте концентрации полиакриламида. Разделение в первом направлении они проводили в градиенте рН 3 – 10, а во втором – в градиенте концентрации геля вогнутой формы (4,5 - 26% Т).

Так как в данном случае разделение белков в первом направлении проводится в соответствии с их изоэлектрическими точками, а во втором – в соответствии с размерами молекул и так как эти параметры не зависят друг от друга, комбинация двух указанных методов является одним из лучших способов получения фингерпринтов белковых смесей. Метод имеет высокую разрешающую способность и позволяет одновременно определять ИЭТ и молекулярные массы разделяемых компонентов.

Системы этого типа были использованы для разделения негистоновых белков хроматина. Точность метода составляла  $\pm 3000$  Да для молекулярной массы и 0,2 единицы рН для ИЭТ. На разрешение сильно влияет количество белка в нанесенной пробе. Получение числа фракций порядка тысяч может быть достигнуто только при разделении нескольких микрограммов белка.

Рассмотрим подробно методику О'Фаррелла по разделению суммарного белка *E. coli*. ИЭФ проводили в геле, находящемся в трубке длиной 130 мм с внутренним диаметром 2,5 мм. В полиакриламидный гель, используемый в

первом направлении, добавляли амфолины с диапазоном рН 3 – 10 и мочевины. После ИЭФ гель уравнивали с ДСН или помещали на пластину без всякой обработки. Как до уравнивания, так и после него гель может храниться при - 700С в закрытой пробирке, заполненной буфером с ДСН. Уравнивание геля проводили в течение по крайней мере 30 мин, встряхивая его в 5 мл буфера, содержащего 10% глицерина, 5% 2-меркаптоэтанола, 2,3% ДСН и 62,5 мМ буфер трис-НСl (рН 6,8). Наилучшие результаты были отмечены при уравнивании в течение 2 ч. Если необходимо полностью избежать потери белка, гель не следует подвергать какой-либо обработке. В этом случае гель после ИЭФ переносится на пластину второго геля (164×164 мм), причем делают это очень быстро, чтобы предотвратить кристаллизацию мочевины, в результате чего гель становится жестким. Электрофорез проводят так же, как с уравновешенными гелями, но в верхний резервуар наливают буфер, содержащий 2%, а не 0,1% ДСН, как в случае уравновешенных гелей. Чтобы быстро заплавить первый цилиндрический гель во второй, применяют 1%-ный раствор агарозы. На втором этапе электрофореза наилучшие результаты были получены при использовании экспоненциального градиента концентрации полиакрилаимдного геля.

Описанный метод обладает высокой воспроизводимостью и большой разрешающей способностью. Он позволяет обнаружить и количественно определить с помощью радиографии белок, составляющий  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  общего количества белков в образце, что свидетельствует о его высокой чувствительности. Проведение двухмерного электрофореза не требует специального оборудования. Первый этап разделения осуществляют обычно в цилиндрических гелях, для которых подходит любой прибор, предназначенный для диск-электрофореза. Точно также на втором этапе используют любой тип приборов, пригодных для электрофореза на пластинах

геля. Сконструированы также специальные приборы для двухмерного электрофореза.

Для разделения белков в первом направлении можно использовать не только электрофорез, но и другие методы. Так, например, Пиндер и Гратцер описали простой и прямой способ последовательного сочетания центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и электрофореза в геле.

Ясно, что заранее трудно сказать, какая из разновидностей двухмерного электрофореза даст наилучшие результаты при разделении той или иной сложной смеси белков. Однако, зная основные принципы электрофоретических методов и некоторые характеристики белков разделяемой смеси, можно довольно хорошо подобрать систему, пригодную для разделения большинства компонентов. В дальнейшем же на основании результатов предварительных опытов электрофоретическая система может быть еще более усовершенствована.

## Техника первичной идентификации белков методом двумерного гелеэлектрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

### 1. Основные стадии исследования белков методом 2ДЭФ. Подготовка образцов для анализа

В процессе проведения 2Д ЭФ необходимо стремиться к достижению максимальной экстракции белков из образцов и поддержанию их в растворенном состоянии. Приготовление образцов облегчено, когда используют биологические жидкости организма или лизаты клеток, поскольку в этих препаратах белки уже находятся в растворенном состоянии. Клетки при анализе предварительно отмывают в Трис-буфере с сахарозой (10 мМ Трис, 250 мМ сахарозы, рН 7,0), а затем разрушают разными способами. Наиболее простой способ дезинтеграции клеток – использование стандартных лизирующих растворов. В некоторых случаях применяют процедуру «замораживание – оттаивание», обработку ультразвуком или использование фрэнчпресса, который механически разрушает клетки. Ткани и клетки с толстой стенкой растирают при низкой температуре в ступке с пестиком. Растительные клетки, содержащие толстую полисахаридную стенку, разрушают путем замораживания в жидком азоте и растиранием в ступке с дополнительной обработкой ультразвуком. Существуют специальные устройства для дезинтеграции клеток и тканей. После разрушения клеток все белки или максимально возможное их количество, содержащееся в изучаемом образце, подвергают солюбилизации лизирующими растворами, в состав которых мочеви́на (хаотропный агент) в высокой 10 концентрации, один или несколько детергентов (поверхностно-активные соединения), восстановители, ингибиторы протеаз. В качестве детергентов используют NP-40, тритон X-100. Для солюбилизации водорастворимых белков и разделения их в первом направлении методом изоэлектрофокусирования часто используют стандартный набор реактивов: 8М мочеви́ну, 4% CHAPS, 0,1 – 0,2% амфолины, 3 – 10 и 10 – 100 мМ

дитиотреитол (ДТТ) или дитиоэритрол (ДТЕ). ДТТ и ДТЕ используют в качестве восстановителей. Альтернативой ДТТ/ДТЕ являются фосфины, в частности трибутилфосфин (ТБФ). Использование фосфинов позволяет существенно снизить концентрацию восстанавливающих агентов. Возможные нежелательные окислительные модификации белков устраняются добавлением к образцам восстанавливающих агентов. Восстановители разрывают дисульфидные связи белков и тем самым способствуют полному разворачиванию глобулы белка. Использование в составе солюбилизирующих растворов ингибиторов протеаз необходимо для предотвращения протеолитической деградации белков, которая приводит к появлению дополнительных пятен на геле и снижению количества белка в основном пятне. Большинство опубликованных протеомных карт содержат информацию о водорастворимых белках, которые хорошо солюбилизируются с использованием стандартных наборов реактивов. Используемые в растворах денатуранты и детергенты не несут заряда и наборов реактивов. Используемые в растворах денатуранты и детергенты не несут заряда и поэтому они не смещают изоэлектрическую точку белков. Процедура солюбилизации унифицирует структурное состояние белка, предотвращает образование агрегатов и пептидных олигомеров, устраняет межбелковые взаимодействия. Возможные нежелательные окислительные модификации белков устраняются добавлением к образцам восстанавливающих агентов. Хаотропные агенты – мочевины и тиомочевина разрушают водородные и гидрофобные связи в белках. С целью обеспечения максимально возможного извлечения белков из исследуемых образцов применяют процедуру последовательной экстракции с использованием различных буферных растворов и детергентов. Для этого белки последовательно экстрагируют в растворах с возрастающей экстрагирующей способностью и каждый раз разделяют их с помощью 2Д ЭФ. Оставшиеся нерастворимыми после процедуры первой экстракции белки подвергают новой процедуре экстракции в растворах с повышенной экстрагирующей



способностью. Однако даже такой методический прием с последовательной экстракцией в некоторых случаях не обеспечивает экстракции белков. Это относится к сильно гидрофобным трансмембранным белкам. Проблемы с большим количеством белков при осуществлении метода 2Д-электрофореза можно минимизировать путем предварительного использования дополнительных методов очистки и хроматографии белков. Экстракты белков могут содержать различные мешающие проведению анализа примеси, такие как нуклеиновые кислоты, фосфолипиды, полисахариды, ионы солей, твердые частицы. Посторонние примеси необходимо удалить из исследуемых образцов. Нуклеиновые кислоты удаляют путем обработки проб РНК- и ДНК-нуклеазами, которые добавляют к экстрагирующей смеси. Липиды могут быть удалены преципитацией. Соли удаляют диализом или с помощью гель-фильтрации, твердые частицы – центрифугированием.

## **2. Проведение фракционирования по двум независимым друг от друга физико-химическим свойствам полипептидной цепи**

Первая стадия 2Д-электрофореза белков – изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) в присутствии мочевины и неионного детергента (тритон X-100, нонидет Р-40). Эту процедуру проводят в градиенте рН. В результате изоэлектрического фокусирования белки электрофоретически разделяются в градиенте рН.

Белки обладают амфотерными (кислотными и щелочными) свойствами благодаря присутствию в них карбокси- и аминогрупп. В зависимости от рН среды эти группы могут протонироваться или депротонироваться. В кислой среде щелочные аминогруппы заряжены положительно. В щелочной среде кислотные карбоксильные группы заряжены отрицательно. Итоговый заряд макромолекулы белка определяется суммой положительных и отрицательных зарядов остатков аминокислот. Поскольку каждый индивидуальный белок содержит только ему присущий набор аминокислотных остатков, зависимость его заряда от рН среды будет

индивидуальной. Изоэлектрическая точка ( $pI$ ) представляет собой значение  $pH$ , при котором на белке отсутствует электрический заряд. При осуществлении ИЭФ создают градиент  $pH$ , в котором белки мигрируют в область, где значение  $pH$  эквивалентно изоэлектрической точке. После попадания белков в зону  $pH$ , соответствующую значению их изоэлектрических точек, движение белков прекращается и они накапливаются в этой зоне. Следовательно, в результате ИЭФ происходит разделение белков в первом направлении согласно их изоэлектрической точке. Белки накапливаются (фокусируются) в узких полосах в соответствии с их значениями  $pI$ , при котором макромолекулы не несут заряда. Поскольку значение  $pI$  белка определяется последовательностью аминокислотных остатков полипептидной цепи, техника ИЭФ обеспечивает хорошее разрешение белков в их смеси. Градиент  $pH$ , необходимый для ИЭФ белков, создают разными способами. Первый способ – формирование его в электрическом поле с помощью амфолинов – синтетических соединений, обладающих амфотерными свойствами. Поскольку амфолины в геле находятся в свободном состоянии, создаваемый ими в электрическом поле градиент  $pH$  нестабилен и дрейфует во времени. Это снижает точность и воспроизводимость результатов. Данная проблема снимается путем создания иммобилизованного градиента  $pH$ , при котором группы с кислотными и щелочными свойствами закреплены на геле. Иммобилизованный (фиксированный в геле) градиент  $pH$ , необходимый для осуществления ИЭФ, создают путем реакции сополимеризации производных акриламида, содержащих карбоксильные и аминогруппы, с мономерами акриламида. С помощью специального устройства приготавливают пластины геля с иммобилизованным градиентом  $pH$ , которые затем режут на узкие полоски и проводят в них ИЭФ. Иммобилизованный градиент  $pH$  остается стабильным при действии высокого напряжения. В последние годы при проведении изоэлектрофокусирования вместо амфолинов используют более удобные коммерческие полоски («стрипы») с иммобилизованным градиентом  $pH$ .

Имеются полоски с узким (1 – 2) и сверхузким (0,2) диапазонами рН-градиентов. При использовании 14 полосок с иммобилизованным градиентом рН можно добиться лучших результатов разделения белковых препаратов по сравнению со случаями, при которых использовали амфолины. Перед использованием полосок для ИЭФ их необходимо подвергнуть процедуре регидратации. Для регидратации используют специальные растворы, в состав которых входят мочевины, детергент CHAPS, восстановительный агент дитиотреитол, обладающий буферными свойствами амфолин, глицерин, бромфеноловый синий. Регидратацию полосок проводят в специальных устройствах.

Существует два способа загрузки белками полосок с иммобилизованным градиентом рН. При первом способе препараты белков в лизирующем буфере вносят вместе с регидратационным раствором. При этом сухой гель впитывает раствор белков вместе с регидратационным раствором. При втором способе раствор белков вносят после завершения процесса регидратации полосок. Белки входят в полоски электрофоретически. Время регидратации полосок с образцами белков составляет 12 часов, без образцов белков – 6 часов. Во время ИЭФ полоски покрывают парафиновым маслом для предотвращения высыхания геля, кристаллизации мочевины, окислительных повреждений белков кислородом. После регидратации полоски помещают в камеру для проведения ИЭФ. Величина электрического тока составляет 50 – 70 мкА на одну полоску. Напряжение зависит от времени проведения ИЭФ. Оптимальной температурой проведения ИЭФ является 20 °С. После окончания процедуры изоэлектрического фокусирования белки, находящиеся в полоске с рН-градиентом, подвергают процедуре уравнивания с анионным детергентом додецисульфатом натрия (ДСН). В результате этой процедуры белки денатурируются и приобретают отрицательный заряд. Затем переходят ко второй стадии 2Д ЭФ. Основную трудность при осуществлении ИЭФ создают мембранные

белки. Поскольку мембранные белки обладают гидрофобными свойствами, они плохо растворяются в водных растворах, которые используются при проведении изоэлектрофокусирования белков. Изоэлектрическая точка мембранных белков часто находится в щелочной области рН, что также осложняет проведение ИЭФ.

С помощью разделения белков в первом направлении методом ИЭФ не удается достичь высокого разрешения. Этим методом можно получить лишь около 100 белковых полос.

### **3. Электрофорез на пластине ПААГ в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия**

Полоски с белками после завершения ИЭФ используют в дальнейшем в качестве стартовой зоны, от которой начинают фракционирование во втором направлении – электрофорез на пластине ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Для этого полоску, содержащие белки в гелевом градиенте рН, помещают поверх пластины ДСН ПААГ и заливают для фиксации агарозой. Комплексируемые с ДСН белки покидают гель с градиентом рН, в котором произошло их разделение в первом направлении, и переходят в ДСН ПААГ, где затем они разделяются во втором направлении.

Стандартная толщина геля составляет 1 – 1.5 мм. Гели большего размера позволяют поместить в них большее количество препарата белков и обеспечивают лучшее разрешение. Для улучшения разрешающей способности используют пластины с градиентом концентрации акриламида.

К пластине геля через электроды подают постоянный электрический ток. Заряженные отрицательно белки под действием электрического тока движутся к аноду и разделяются в соответствии с их размерами (радиусом Стокса). Белки с молекулярной массой 200 кДа мигрируют в геле на расстояние 1-2 см, а 10 кДа – 14-15 см. В результате проведения 2ДЭФ в геле хорошо разрешаются пятна белков с молекулярными массами от 10 до 250

кДа и значениями изоэлектрических точек от 3,8 до 8. (Спектр значений изоэлектрических точек локализуется в интервале pH 3 – 13.) Существуют технические проблемы при разделении и выявлении белков 16 со значениями pI выше 11,5. Белки с молекулярной массой выше 250 кДа трудно или вообще нельзя анализировать методом 2Д-электрофореза.

#### 4. Детекция белков

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

Эти красители хорошо окрашивают белки, присутствующие в достаточно большой концентрации, в то время как белки с низкой концентрацией могут не окрашиваться или давать слабые пятна и таким образом плохо выявляться.

Окрашивание серебром – наиболее чувствительный нерадиоактивный метод визуализации белков. Он позволяет определять белки с содержанием в пятне менее 1 нг. Однако диапазон линейности между интенсивностью окраски и содержанием белка в пятне не очень большой – менее двух порядков. Кроме того, данный метод очень чувствителен к температуре. Полученные методом окрашивания серебром результаты менее воспроизводимы по сравнению с другими. С целью повышения точности анализа белки прокрашивают более чем одним красителем, например, проводят окрашивание Кумасси синим и серебром. При этом детектируется больше пятен. Для окрашивания белков можно использовать флуоресцентный краситель SYPRO красный или SYPRO оранжевый, которые нековалентно связываются с белками. Процедура

окрашивания красителями может быть выполнена с помощью одной операции после завершения электрофоретических стадий. Данные красители обладают малой специфичностью к белкам различных видов, что обеспечивает стандартные условия окрашивания практически всех белков и существенно снижает количество артефактов. Указанные красители обеспечивают линейность в пределах трех порядков концентрации белка. Флуоресцентные красители удобно использовать при окрашивании гелей, содержащих белки клеток, выращенных в различных условиях.

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

#### **5. Анализ распределения белков на двумерных электрофореграммах с использованием прямоугольных координат**

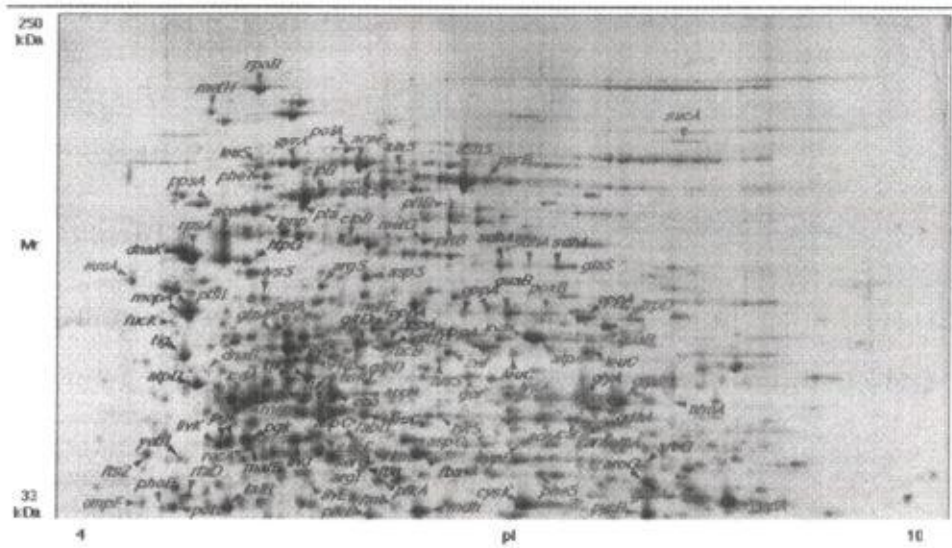
Положение каждой выявленной белковой фракции на 2Дэлектрофореграммах можно охарактеризовать по вертикальной и горизонтальной координатам. Позиция по первой из них является функцией молекулярной массы, а по второй – по заряду. Таким образом, установление координат белковой фракции на двумерных электрофореграммах становится первым шагом к системному объективному описанию белковых продуктов генной экспрессии конкретного объекта. Важным этапом данной стадии анализа является получение по многим адекватным двумерным электрофореграммам

обобщенного (синтетического) изображения распределения белков – «белкового портрета» изучаемого объекта, на основании которых строятся «двумерные карты» – стандартизованные схемы распределения белков. Для построения таких карт используются специальные программы компьютерного анализа изображений. Информативность и возможности использования «двумерных карт» возрастает при идентификации на них уже известных белков. Итоговый массив информации о выявленных белках систематизируют и обобщают в форме специализированного компьютерного банка (или банков).

## Области применения двумерного электрофореза

### Протеомный анализ

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



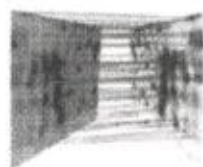
### Фрагмент протеомной карты E. coli

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

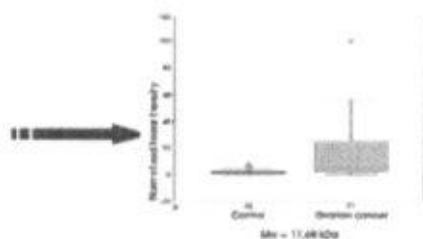
1. Выравнивание (поиск одинаковых белковых зон)
2. Сопоставление
3. Статистический анализ (оценка достоверности изменений)



## Анализ изображений электрофореграмм



Выравнивание,  
сопоставление  
изображений



Статистический  
анализ различий  
экспрессии белка

Количественные характеристики пятен:

- координаты пятна;
- площадь пятна;
- оптическая плотность пятна;
- объем пятна.