

Методы выделения белков. ПААГ-электрофорез.

Преподаватель: старший преподаватель
кафедры молекулярной биологии и генетики,
PhD, Смекенов И.Т.

Дисциплина: Рекомбинация ДНК

(Лекция 10)

Цель

Изучить методы выделения белков и их анализ с помощью ПААГ-электрофореза для понимания характеристик белков и их поведения в различных условиях.

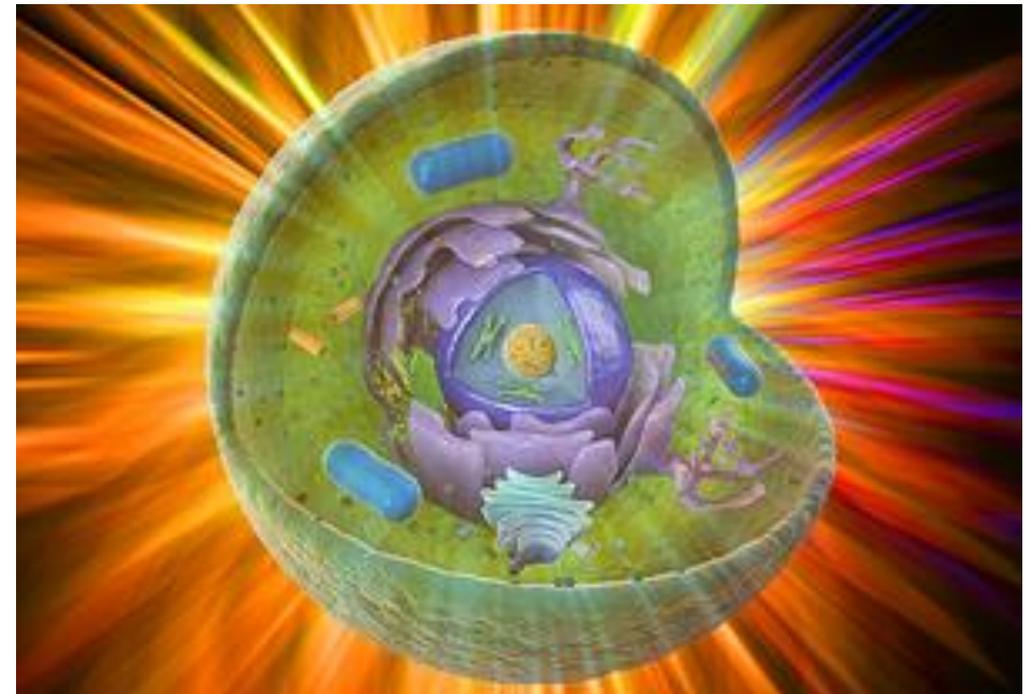
Задачи

1. Рассмотреть основные методы выделения белков, включая осаждение, хроматографию и центрифугирование.
2. Описать принципы работы ПААГ-электрофореза и его применение для разделения белков по молекулярной массе и зарядов.
3. Объяснить процесс подготовки образцов для ПААГ-электрофореза и методы их окрашивания для визуализации.
4. Изучить интерпретацию результатов ПААГ-электрофореза и значение полученных данных для дальнейших исследований.

Ключевые слова: выделение белков, ПААГ-электрофорез, осаждение, хроматография, центрифугирование, разделение белков, визуализация белков

- Прежде чем образец белка может быть выделен и идентифицирован с помощью **электрофореза** и **вестерн-блоттинга**, белки должны быть отделены от составляющих частей клетки.
- Это означает, что клеточные стенки и мембраны должны быть разбиты или лизированы.
- Ниже приведены некоторые из наиболее распространенных и надежных методов лизиса клеток.

- **Соникация**
- **Помол жидким азотом**
- **Гомозенизация «стекл. шариками»**
- **Лизирующие буферы**



Соникация - разрушение ультразвуком

- Обработка ультразвуком включает в себя введение наконечника в пробирку или эппендорф и передачу звуковой волны высокой интенсивности по всему образцу для разрушения клеточных стенок и разрушения тканей.
- Обработка ультразвуком проста, и ее можно применять к образцам практически любого размера, но ее следует использовать с осторожностью, поскольку этот метод может вызвать перегрев и денатурацию белков (разрушение).
- Рекомендуется использовать несколько коротких звуковых импульсов, а не один длинный. Все обработки ультразвуком должны проводиться на льду, а образцы должны отдыхать и охлаждаться между соникациями.



- Ультразвуковой электронный генератор преобразует мощность линии переменного тока в сигнал 20 кГц, который управляет пьезоэлектрическим преобразователем / преобразователем.
- Коллапс пузырьков преобразует звуковую энергию в механическую энергию в виде ударных волн, эквивалентных давлению в несколько тысяч атмосфер (300 МПа).



Accessory Tips



PRODUCT	INTENSITY	TIP SIZE	VOLUME RANGE	ORDER NO.
Stepped Micro Processing Tip	Very High	Diameter: 5/32" (3.8 mm) Length: 10.1" (25.6 cm)	250 µL - 10 mL	OR-T-156
Intermediate Processing Tip	High	Diameter: 3/8" (9.5 mm) Length: 8.6" (21.8 cm)	10 mL - 250 mL	OR-T-375
1/2" Processing Tip	Medium-High	Diameter: 1/2" (12.7 mm) Length: 5.38" (13.65 cm)	10 mL - 300 mL	OR-T-500
Standard Processing Tip	Medium	Diameter: 3/4" (19 mm) Length: 4.1" (10.5 cm)	25 mL - 500 mL	OR-T-750
Full Size Processing Tip	Low	Diameter: 1" (25.4 mm) Length: 4.85" (12.3 cm)	50 mL - 1 L	OR-T-1000

Лизис бактериальных клеток

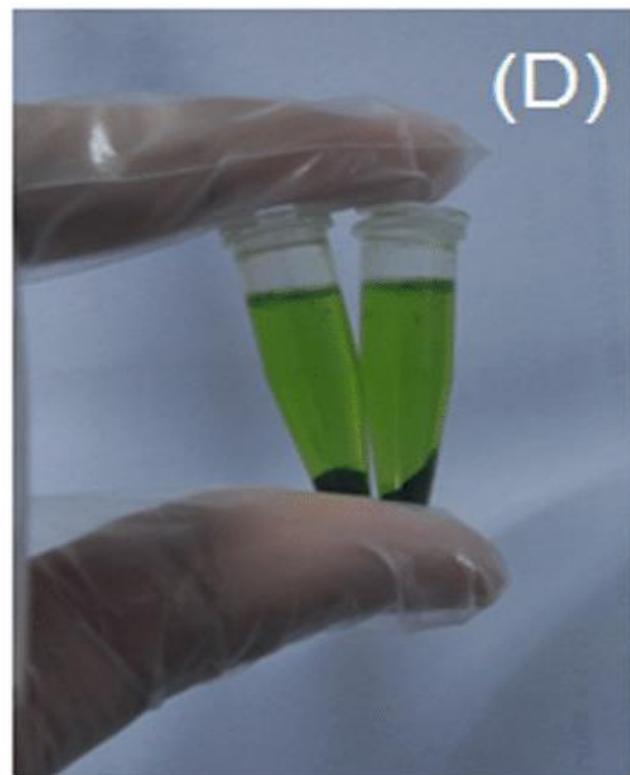
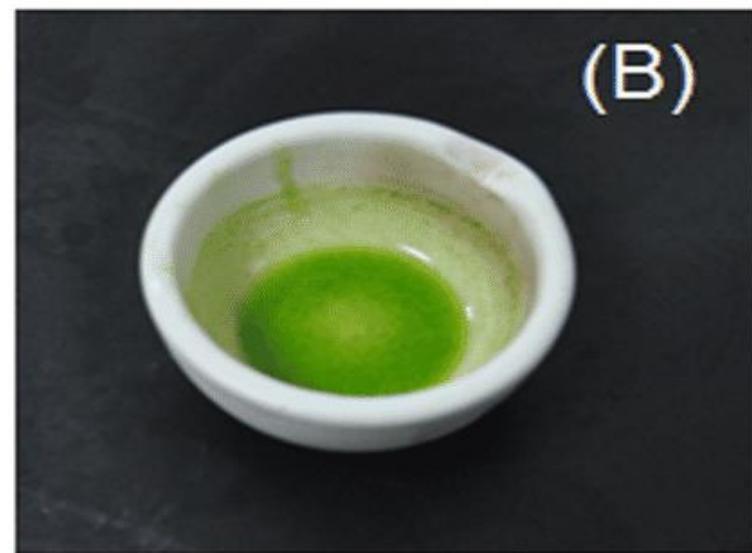
1. Центрифугирование клеток в течение 5 минут при 270 x g в микроцентрифуге.
2. Удалите оставшуюся среду и ресуспендируйте клетки в 30 - 100 мкл буфера RIPA.
3. Инкубируйте осадок на льду в течение 30 минут.
4. ***Соникируйте образцы следующим образом.***
5. Поместите зонд соникатора на частоте 20 кГц.
6. Поместите клетки в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и осторожно переместите под кончик зонда соникатора.
7. Зонд начнет вибрировать буфер в течение 2 × 10 секунд, чтобы уменьшить вязкость (это может привести к вспениванию образцов).
8. Однако в этом протоколе пенообразование образцов не было проблемой после обработки ультразвуком, когда продолжали иммунопреципитацию, Вестерн-блоттинг или анализы ELISA.
9. В зависимости от образцов и вязкости образцов клетки можно снова обрабатывать ультразвуком в течение еще 10 с.
10. Как только образцы обрабатывают ультразвуком, инкубируют на льду в течение 5 минут.
11. Центрифуга при 10000 x g в течение 20 мин для осаждения осадка (мусор может содержать нелизируемые клетки, ядра или не лизированные органеллы).
12. Перенесите супернатанты в новую микроцентрифужную пробирку и наклейте этикетку.
13. Хранить при -20 ° C.

Помол жидким азотом

- Используя этот метод, исследователи смешивают образцы белка с жидким азотом, пока они не замерзнут и не станут хрупкими. Образцы могут быть размолоты ступкой и пестиком.
- Измельчение сопряжено с низким риском целостности белков, но жидкий азот может быть опасным. Измельчение в жидком азоте является отличной техникой для сложных образцов, таких как образцы растений и грибов.

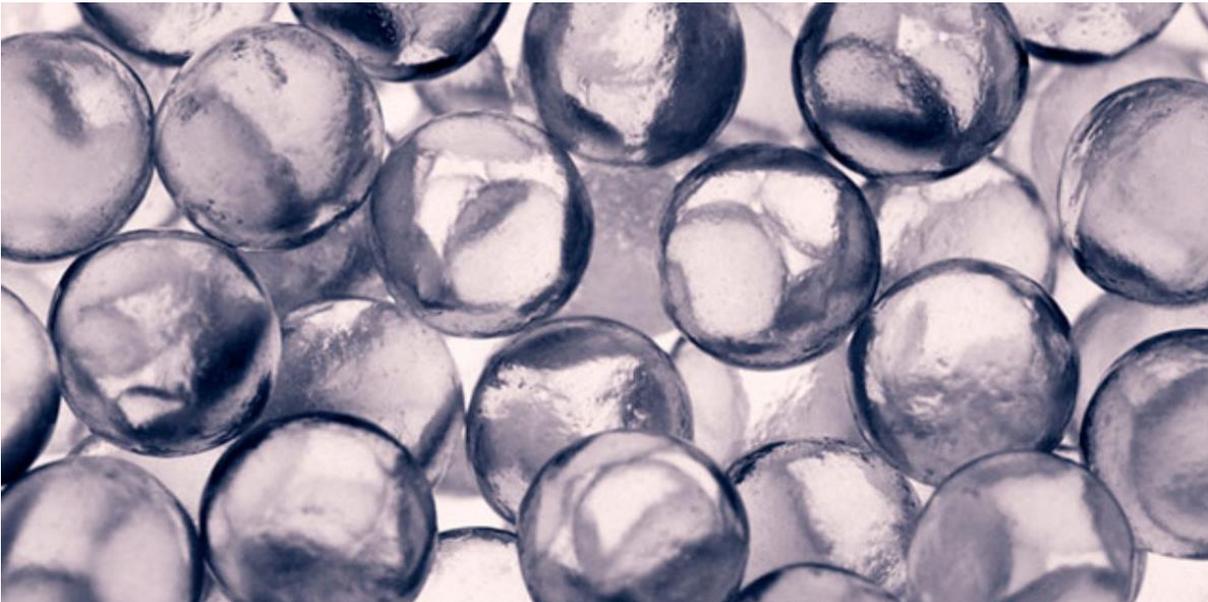






Использование стеклянных шариков

- Этот метод включает в себя объединение образца клеток с крошечными шариками в миске, которую затем механически перемешивают, чтобы разбить клетки на части. Чтобы избежать перегрева образца, это следует делать в холодной среде, и между циклами взбивания образцу нужно дать остыть.



Glass beads, acid-washed (425-600 μm)

Подготовка стеклянных шариков

1. Замочить стеклянные шарики на 16 часов в концентрированной HCl.
2. Тщательно промыть в дистиллированной воде.
3. Выпекайте их в течение 16 часов при температуре выше 150 ° C.
4. Охладите стеклянные шарики до 4 ° C или на льду перед использованием.

Lysis buffer

50 mM Tris-HCl pH 8.0

1% DMSO

50-200 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM PMSF

1 µg/ml leupeptin

1 µg/ml pepstatin A

Процедура выделения белков с дрожжевых клеток

1. Приготовьте стеклянные шарики, промыв их в концентрированной соляной кислоте, затем тщательно промойте (убедитесь, что pH затем нейтрален) и высушите. Высушенные шарики должны быть охлаждены перед использованием.
2. Ресуспендируйте клетки в равном количестве охлажденного лизирующего буфера и поместите суспензию в прочную пробирку (желательно не в стакан). Добавить PMSF (10 мкл PMSF (100 мМ) на мл суспензии) в этой точке.
3. Добавьте 1 - 3 г охлажденных стеклянных шариков на грамм массы сырой клетки. (или $\frac{1}{3}$ от объема).
4. Vortex 3 - 5 раз в течение 1 минуты, каждый раз, сохраняя клетки на льду в течение 1 минуты между встряхиваниями. используйте самую высокую настройку вихревого смесителя.
5. Удалить стеклянные шарики.
6. Удалите клеточный мусор ультрацентрифугированием при 4 ° C в течение 30 минут при 45000 об/мин.

Лизирующие буферы

- Самый простой, но и самый дорогой способ лизировать клетки и ткани - использовать специальный буфер для лизиса. Буферы для лизиса предназначены для химического разрушения клеток и тканей.
- Доступен большой выбор буферов, от умеренных буферов лизиса до сильных, хаотропных, денатурирующих буферов .
- Буферы для лизиса используют комбинацию буферных агентов, солей, детергентов, восстановителей, хаотропов и литических ферментов для высвобождения белков. Использование химического лизиса также может быть объединено с вышеуказанными методами механического лизиса для улучшения экстракции белков.

Важно!

- Не забывайте, что со всеми этими методами, предназначенными для высвобождения интересующего белка, также высвобождаются эндогенные клеточные протеазы. Так что не забывайте ВСЕГДА использовать коктейль ингибитора протеазы .
- **Четыре основных класса протеолитических ферментов обычно используются для описания протеаз.**
- Сериновые протеазы, вероятно, лучше всего охарактеризованы. Этот класс протеаз включает трипсин, химотрипсин и эластазу.
- Класс цистеиновых протеаз включает папаин, кальпаин и лизосомальные катепсины.
- Аспарагиновые протеазы включают пепсин и ренин.
- Металлопротеазы включают термолизин и карбоксипептидазу А.

Коктейли с ингибиторами протеазы (μM - mM)

- **Компоненты:**
- AEBSF
- Апротинин
- Бестатин
- E-64
- ЭДТА
- Лейпептин
- Пепстатин
- Апротинин
- Фосфорамидон
- PMSF



Ингибитор протеазы	концентрация	стоковая конц.	растворитель	ингибирование
Апротинин	1-2 мкг / мл	10 мг / мл	воды	сериновые протеазы
бензамидина	15 мкг / мл	10 мг / мл	воды	сериновые протеазы
ЭДТА, ЭГТА	1-10 мМ	0,5 М (рН 8)	воды	металло протеазы
лейпептина	1-2 мкг / мл	10 мг / мл	воды	цистеиновые и сериновые протеазы
PMSF	0,1-1,0 мМ	100 мМ	изопропиловый спирт	сериновые протеазы
Пепстатин А	1 мкг / мл	1 мг / мл	метанол	аспарагиновые протеазы

Буферная система

- **Первый выбор, который мы должны сделать, это выбор природы и рН буферной системы, которую мы хотим использовать. Это зависит от:**
- стабильности целевого белка по отношению к рН и буферному соединению.
- последующей методики. Чтобы избежать потери времени и белка, вызванной дополнительной стадией замены буфера, рекомендуется выбирать буфер, который совместим с последующим методом работы.

Буферы и их диапазоны рН перечислены в таблице ниже. Наиболее часто используемые буферы обозначены красным . Они обычно используются в концентрациях 20-50 мМ .

Примечания:

- HEPES мешает анализу белка Лоури (не анализу Брэдфорда). Он может образовывать радикалы в различных условиях и не должен использоваться в системах, где изучаются радикалы.
- Фосфатные буферы несовместимы с использованием двухвалентных катионов (например, ионов Mg^{2+}).

буфер	диапазон рН
Лимонная кислота - NaOH	2,2 - 6,5
Цитрат натрия - лимонная кислота	3,0 - 6,2
Ацетат натрия - уксусная кислота	3,6 - 5,6
Натриевая соль какодиловой кислоты - HCl	5,0 - 7,4
МЧС - NaOH	5,6 - 6,8
Натрий дигидрофосфат - динатрий гидрофосфат	5,8 - 8,0
Имидазол - HCl	6,2 - 7,8
MOPS - KOH	6,6 - 7,8
Триэтаноламин гидрохлорид - NaOH	6,8 - 8,8
Трис - HCl	7,0 - 9,0
HEPES - NaOH	7.2 - 8.2
Трицин - NaOH	7,6 - 8,6
Тетраборат натрия - борная кислота	7,6 - 9,2
Бицин - NaOH	7,7 - 8,9
Глицин - NaOH	8,6 - 10,6

Наиболее используемые добавки , их эффективные концентрации и их общее назначение перечислены в таблице ниже.

Класс добавки	пример	концентрация	цель
Соли	NaCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50-150 мМ	поддерживать ионную силу среды
Моющие средства	Дезоксихолат, тритон х-100	0,1-1%	солюбилизация плохо растворимых белков
глицерин		5-10%	стабилизация
Глюкоза или сахароза		25 мМ	Стабилизировать лизосимальные мембраны, уменьшить высвобождение протеазы
Металлические хелаторы	ЭДТА, ЭГТА	1 мМ	уменьшить окислительное повреждение, хелатные ионы металлов
Восстановители	DTT, DTE 2-меркаптоэтанол	1-10 мМ 0,05%	уменьшить окислительный ущерб
Лиганды, ионы металлов	Mg^{2+} , АТФ, ГТФ	1-10 мМ	стабилизация

Наиболее часто используемые буферы - это RIPA и NP-40. Жесткие свойства буфера RIPA лучше всего подходят для трудно растворимых белков.

- **RIPA:**

- 25mM Tris, HCl (pH 7.6)
- 150mM NaCl
- 1% NP-40
- 1% sodium deoxycholate
- 0.1% SDS

- **NP-40:**

- 50 mM Tris, HCl (pH 8.5)
- 150 mM NaCl
- 1% detergent

Приготовьте лизирующий буфер на 50 мл, если известна конечная концентрация компонентов.

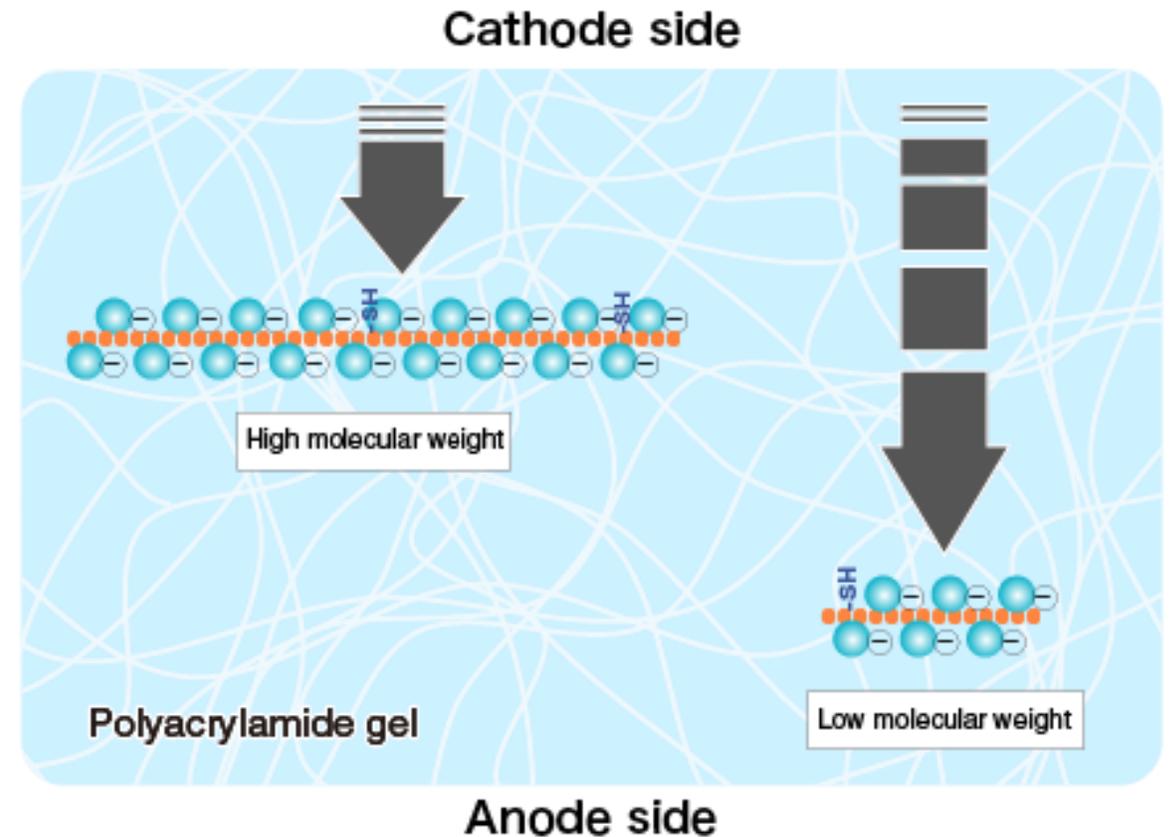
- **RIPA:**

- 25mM Tris, HCl (pH 7.6) - ? g - ? ml (1M)
- 150mM NaCl - ? g - ? ml (4M)
- 1% NP-40 - ? ml (10%)
- 1% sodium deoxycholate - ? ml (15%)
- 0.1% SDS - ? ml (10%) - ? g

ПААГ-электрофорез.

- Под действием электрического поля заряженные частицы, растворенные или диспергированные в растворе электролита, передвигаются в направлении электрода противоположной полярности. При электрофорезе в геле движение частиц замедляется взаимодействием с окружающей гель-матрицей, действующей как молекулярное сито.

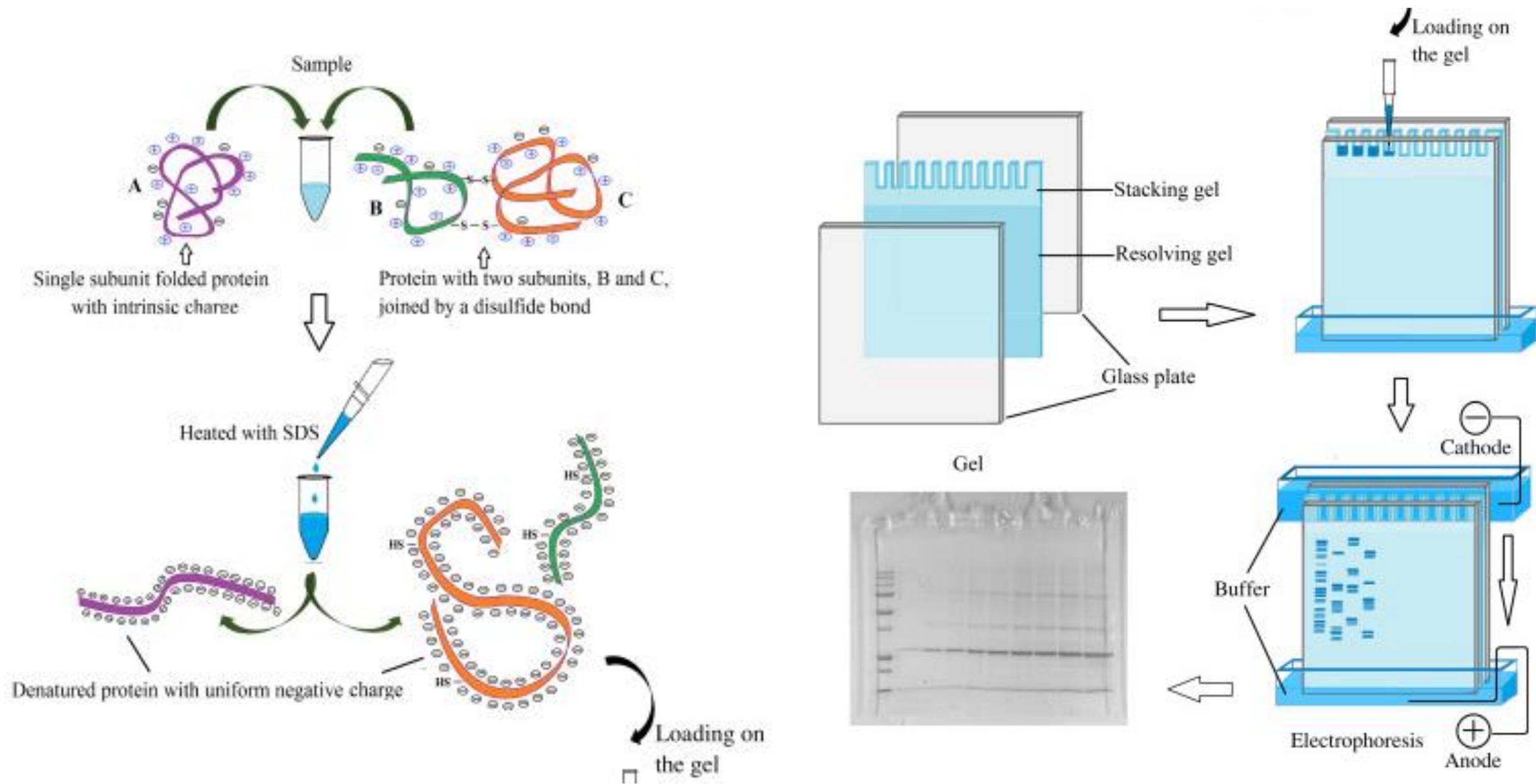
Proteins are separated based on their polypeptide chain length by electrophoresis in a polyacrylamide gel with an appropriate mesh size.



ДСН-ПААГ — ГЕЛИ С ОДНОРОДНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ

- Электрофорез в полиакриламидном геле применяется для качественной идентификации белков в биологических препаратах, контроля их чистоты и количественных определений.
- Данный метод позволяет анализировать мономеры полипептидов с молекулярной массой от 14 000 дальтон до 100 000 дальтон.
- Как правило аналитический электрофорез белков проводят в полиакриламидных гелях в условиях, обеспечивающих их диссоциацию на отдельные полипептидные субъединицы и минимизирующих агрегацию. Чаще всего перед нанесением на гель белки подвергают диссоциации нагреванием с сильным анионным детергентом — натрия додецилсульфатом (ДСН).

Денатурированные полипептиды связываются с ДСН, превращаясь в отрицательно заряженные частицы с постоянным отношением массы к заряду независимо от типа белка.



Подготовка форезного аппарата

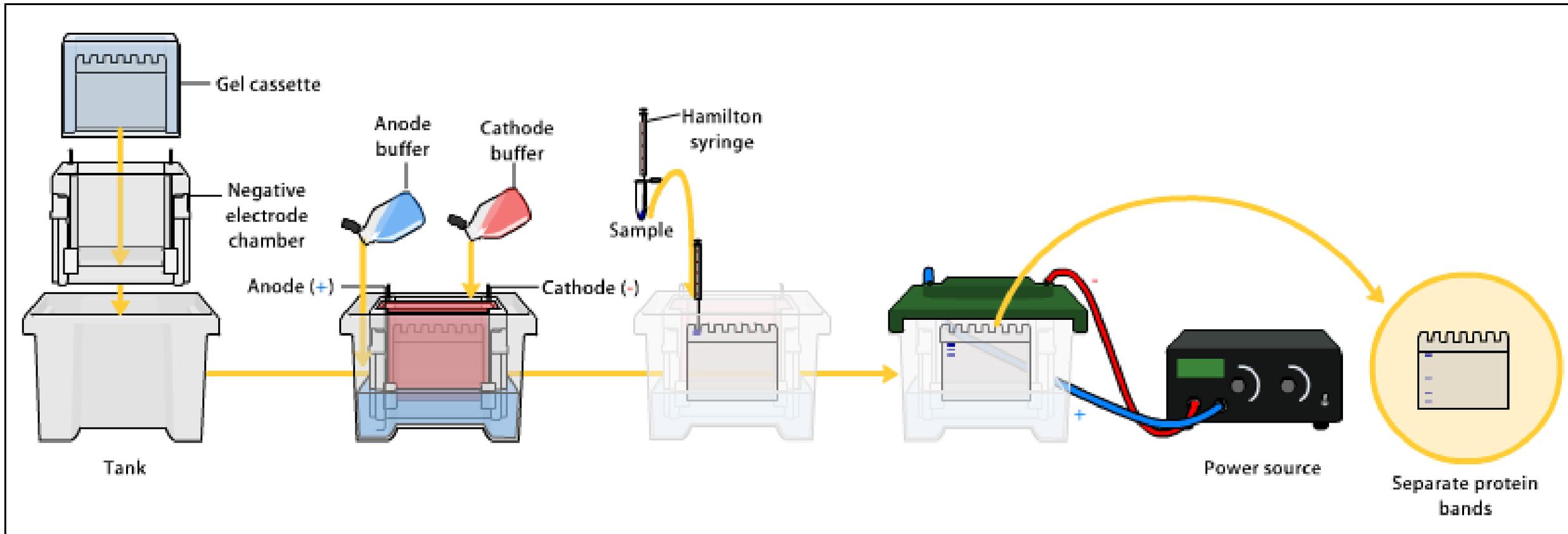
1. вымыть камеры детергентом, хорошо сполоснуть;
2. мыть стекла детергентом (если очень грязные или из сомнительного источника - хромпиком); если хочется, чтобы гель легко снимался со стекол - силиконизировать (достаточно 1 раз на ~10 прогонов);
3. оценить объем геля:

гель:	камера:	
	мини	миди
концентр.	~2ml	~4ml
разреш.	~10ml	~15ml

4. приготовить нижний/разрешающий гель (без TEMED);
5. дегазировать ~10', во время дегазации заняться форезным прибором:
 - * собрать форезный прибор, отметить фломастером уровень концентрирующего геля (длина зубчиков гребенки + 1cm);
 - * ~5-10ml расплавленной 1.5% агарозы (в GTB-буфере) налить на ровную горизонтальную поверхность. Сразу же установить прибор со стеклами (агароза поднимется между стеклами на ~2-10mm).
 - * "пролить" агарозой внешние края спейсеров;
6. залить разрешающий гель до отметки;
7. наслоить сверху бутанол (~3-10mm);
8. во время полимеризации дегазировать концентрирующий гель;
9. после завершения полимеризации отсосать бутанол, 2-3 раза сполоснуть получившийся карман дистиллированной водой, отсосать остатки вытянутым типом;
10. вставить (не полностью) гребенку между стеклами;
11. залить концентрирующий гель, вставить полностью гребенку;
12. после полимеризации установить верхнюю камеру в нижнюю, залить буфер, вытащить гребенку;
13. немедленно промыть лунки шприцом, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (либо плоским типом, либо иглой шприца);

Форез

- материал + буфер для нанесения, смешать, перед форезом прокипятить 5';
- перед нанесением промыть лунки шприцом;
- гнать при напряжении (для мини- и миди-камеры) $\sim 10\text{V}/\text{cm}$ в концентрирующем геле, $\sim 180\text{V}$ в разрешающем.



Реактивы

- 30% раствор полиакриламида (29 г акриламида + 1 г бисакриламида в 50 мл воды, полностью растворить с помощью магнитной мешалки, довести объем до 100 мл). Держите раствор вдали от солнечного света.
- 1,5 М Трис, pH 8,8
- 1 М Трис, pH 6,8
- 10% SDS (10 г SDS в 100 мл дистиллированной воды).
- 10% персульфат аммония (0,1 г в 1 мл воды). Это должно быть свежеприготовленным.
- TEMED 100%

- Выбор % разрешающего геля

• Размер белка, kDa	%AA
• 36-205	5%
• 24-205	7.5%
• 14-205	10%
• 14-66	12.5%
• 10-45	15%

Stacking Gel (4 %)

	2 gels
DDI H ₂ O	3.9 ml
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 (SG Bfr.)	500 μ l
40% Acrylamide Stock	500 μ l
20 % SDS	100 μ l
30% Ammonium Persulfate	16 μ l
TEMED	8 μ l

Resolving Gel

	1 gel	2 gels	1 gel	2 gels
DDI H ₂ O	1.8 ml	3.6 ml	1.6 ml	3.2 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (RG Bfr.)	1.3 ml	2.6 ml	1.3 ml	2.6 ml
40% Acrylamide Stock	800 μ l	1.6 ml	1.0 ml	2.0 ml
20 % SDS	100 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l
30% Ammonium Persulfate	10 μ l	20 μ l	10 μ l	20 μ l
TEMED	4 μ l	8 μ l	4 μ l	8 μ l

10x SDS-PAGE Running Buffer

- 30.3 g Tris base
- 144.0 g Glycine
- 10.0 g SDS

4x SDS-PAGE Sample Buffer

- 125 mM Tris•HCl, pH 6.8 (1 M) 5 ml
- 20% Glycerol 8 ml
- 4% SDS (20%) 8 ml
- 10% β -Mercaptoethanol 4 ml
- 0.5 mg/ml Bromophenol Blue 20 mg
- DDI H₂O 15 ml
- Total 40 ml

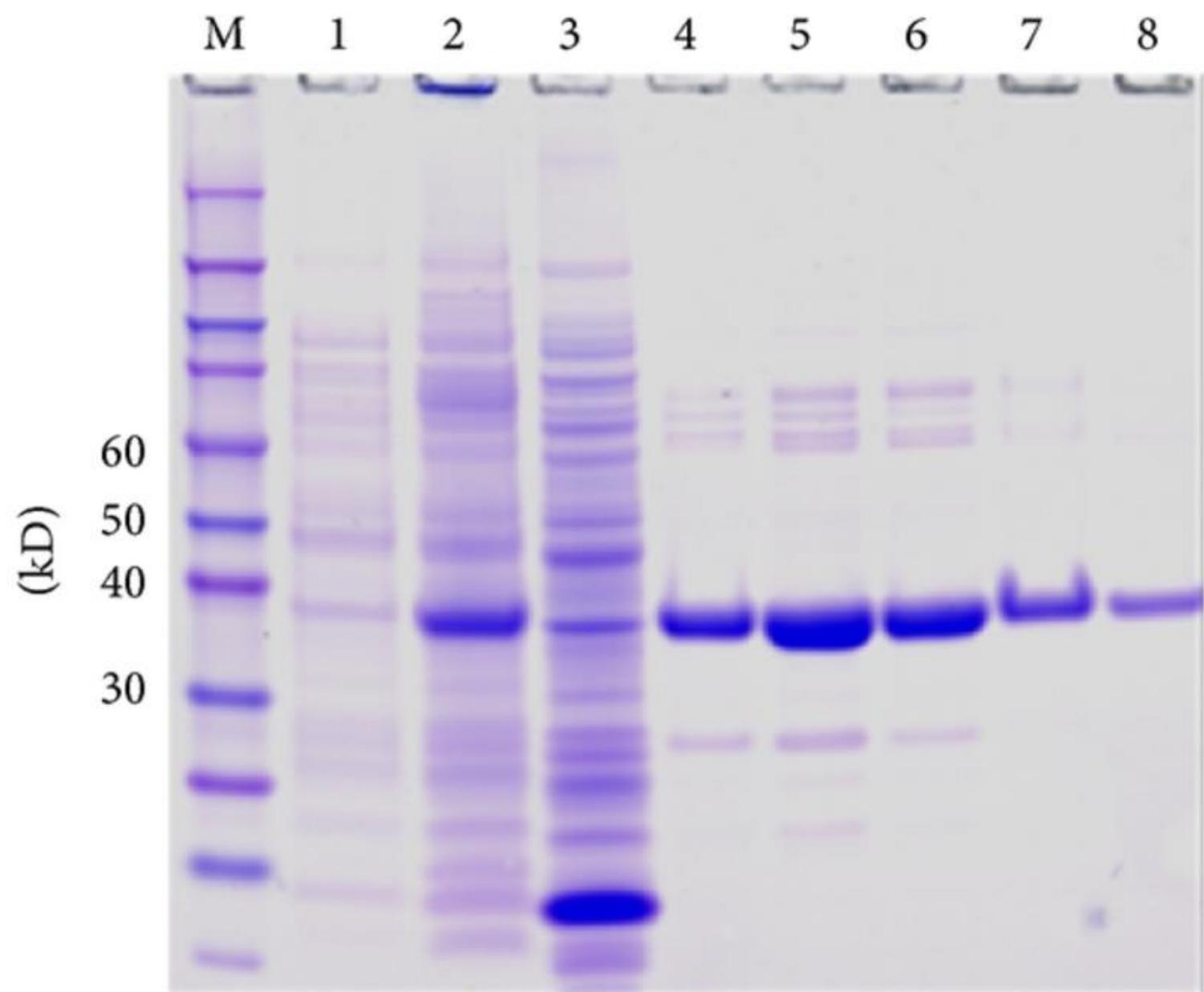
Coomassie Stain Solution:

- Ethanol 150 ml
- Glacial Acetic Acid 50 ml
- DDI H₂O 300 ml
- Coomasie Brilliant Blue–R-250 1 g

Coomassie Stain Solution:

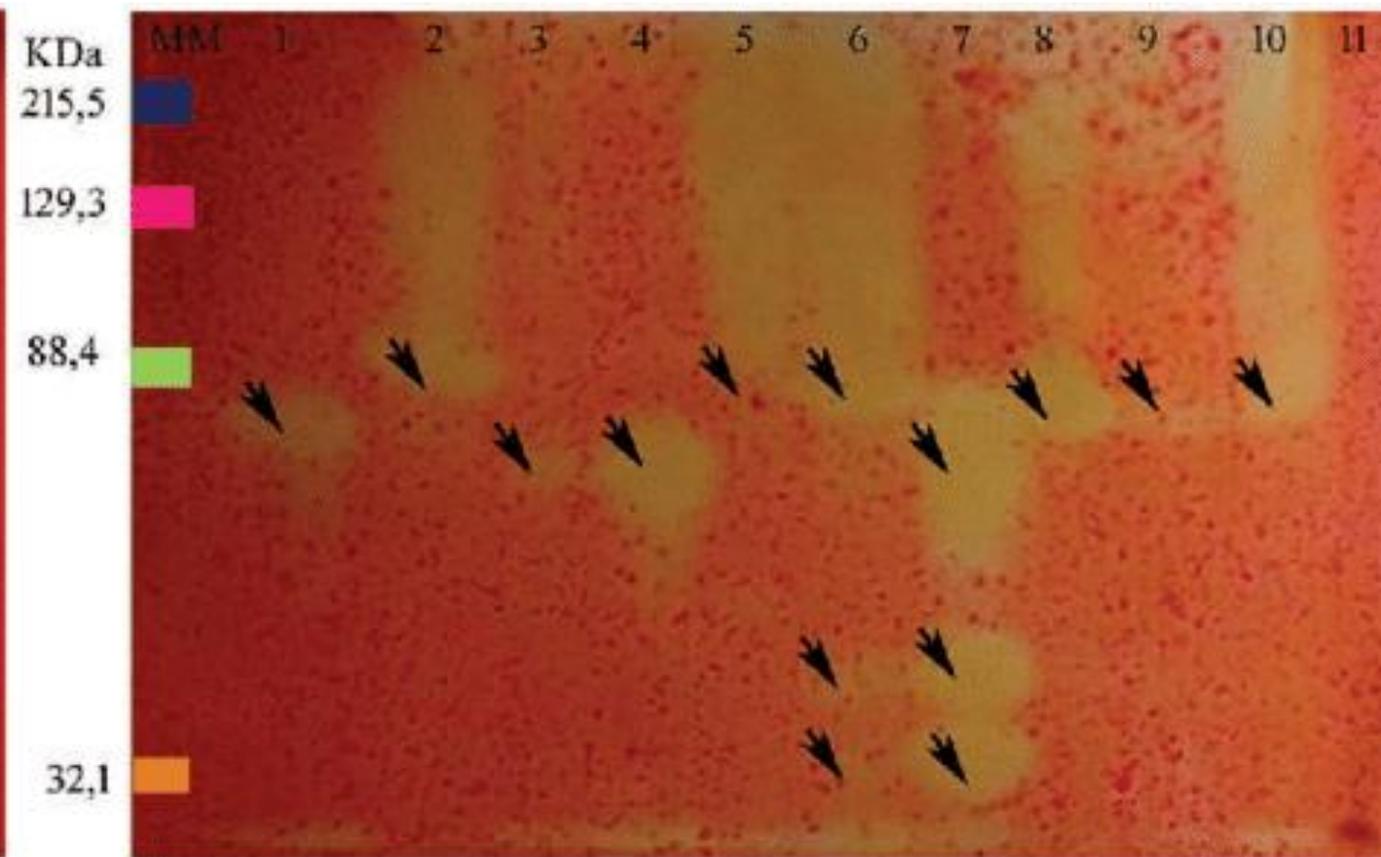
- Ethanol 1200 ml
- Glacial Acetic Acid 400 ml
- DDI H₂O 2.4 l

pI глицина – 6,06





a



b