



Методы выделения белков. ПААГ-электрофорез.

Спецпрактикум по биохимической генетике - Лекция 6
Старший преподаватель: PhD, Сmekенов Изат Темиргалиевич
Кафедра молекулярной биологии и генетики



ЦЕЛЬ ЛЕКЦИИ

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

Задачи

- ✓ Рассмотреть основные методы выделения белков, включая осаждение, хроматографию и центрифугирование.
- ✓ Описать принципы работы ПААГ-электрофореза и его применение для разделения белков по молекулярной массе и заряду.
- выделить белков, ПААГ-электрофорез, осаждение, хроматография, центрифугирование, разделение белков, визуализация белков
- ✓ Объяснить процесс подготовки образцов для ПААГ-электрофореза и методы их окрашивания для визуализации.
- ✓ Изучить интерпретацию результатов ПААГ-электрофореза и значение полученных данных для дальнейших исследований.

Ключевые термины

выделение белков, ПААГ-электрофорез, осаждение, хроматография, центрифугирование, разделение белков, визуализация белков.

1) Выделение белков

- Белки извлекаются из клеток или тканей с помощью **буферов**, сохраняющих их стабильность и активность.
- Основная цель — получить **чистый белок для дальнейшего анализа или функциональных исследований**.

2) Методы осаждения и центрифугирования

- **Осаждение** (например, сульфатом аммония) позволяет концентрировать и частично разделять белки по солюбильности.
- **Центрифугирование** используется для разделения осадка и супернатанта, упрощая последующую очистку.

3) Хроматография

- Методы разделения белков по **заряду (ионообменная)**, **размеру (гель-фильтрация)**, **специфическому связыванию (аффинная)** и **гидрофобности (гидрофобная)**.
- Позволяет получать белки высокой чистоты для функциональных или структурных исследований.

4) ПААГ-электрофорез

- Используется для **разделения белков по размеру и/или заряду**.
- Может быть денатурирующим (SDS-PAGE) или нативным (native PAGE).

5) Разделение и визуализация белков

- После разделения белки визуализируют с помощью **окрашивания геля** (кумасси, серебро) или **Western blot**.
- Позволяет оценить **чистоту, размер и присутствие белка** в образце.

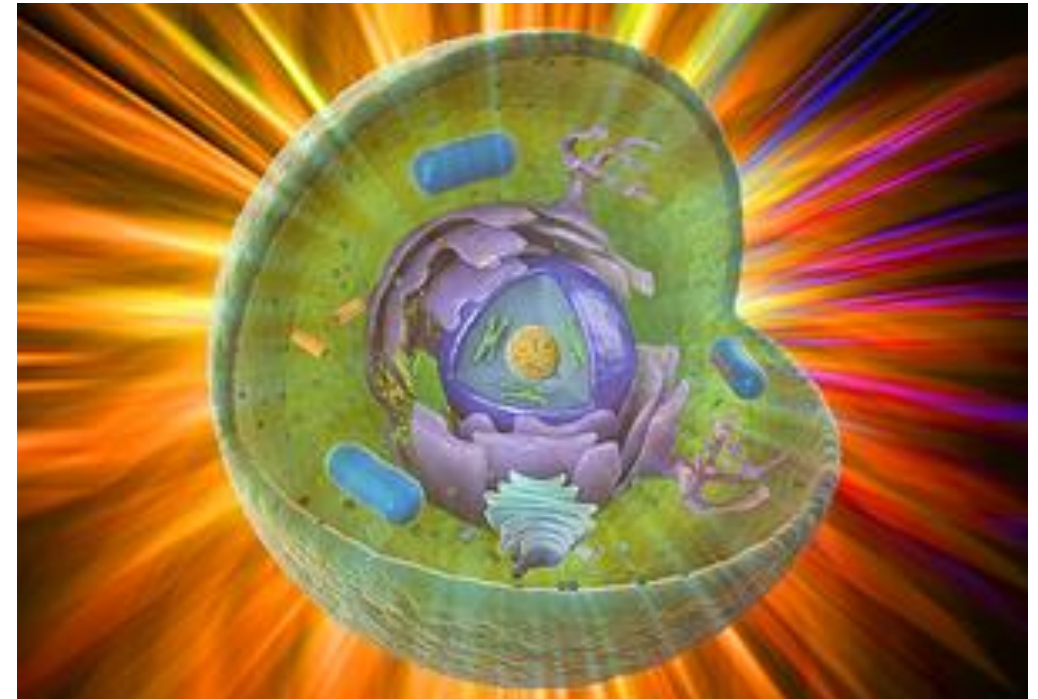


ОСНОВНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие методы применяются для первичного выделения белков из клеток или тканей?
2. Как работают осаждение и центрифугирование, и какую роль они играют в очистке белка?
3. Чем различаются методы хроматографии по принципу разделения белков?
4. Как ПААГ-электрофорез позволяет анализировать белки и чем различаются SDS-PAGE и нативный PAGE?
5. Какие методы визуализации белков применяются после разделения, и как они помогают оценить чистоту и размер белка?
6. Как сочетание выделения, хроматографии и электрофореза обеспечивает получение белка высокой чистоты?

- 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).



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

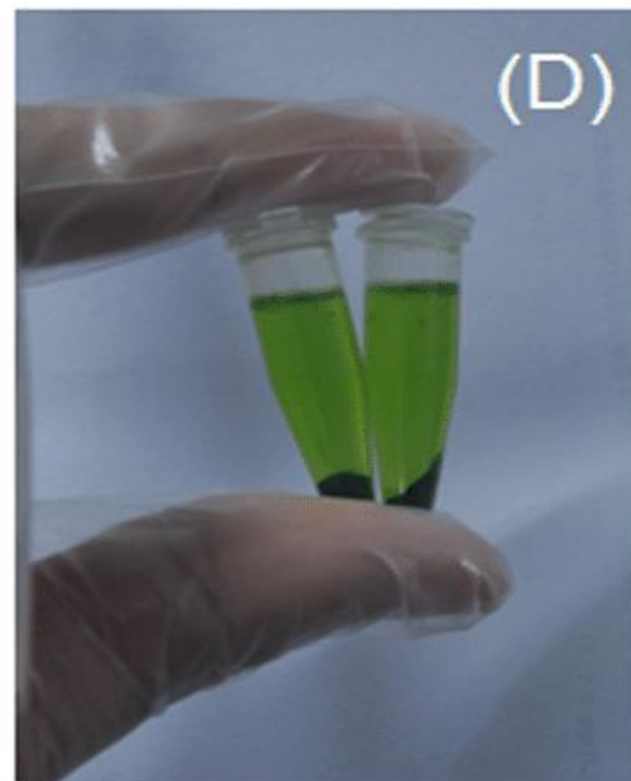
1. Центрифугирование клеток в течение 5 минут при 270 x g в микроцентрифуге.
2. Удалите оставшуюся среду и ресуспендируйте клетки в 30 - 100 мкл буфера RIPA.
3. Инкубируйте осадок на льду в течение 30 минут.
4. ***Соникируйте образцы следующим образом.***
5. Поместите зонд соникатора на частоте 20 кГц.
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.

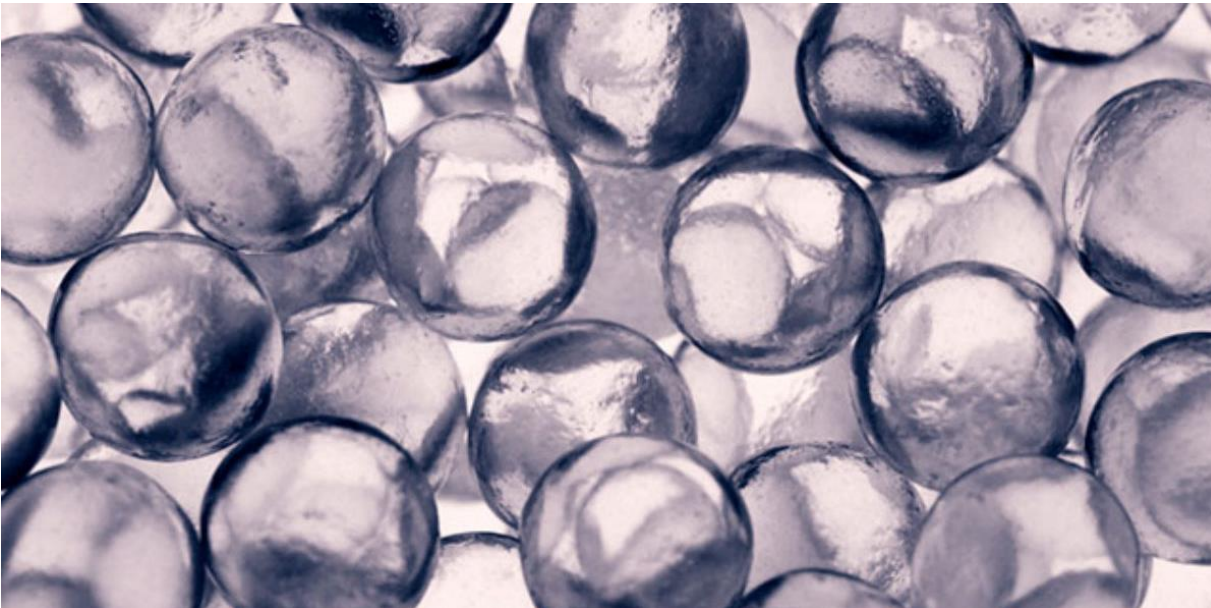






Использование стеклянных шариков

- 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 pH 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 pH
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 каодиловой 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, (NH ₄) ₂ 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.

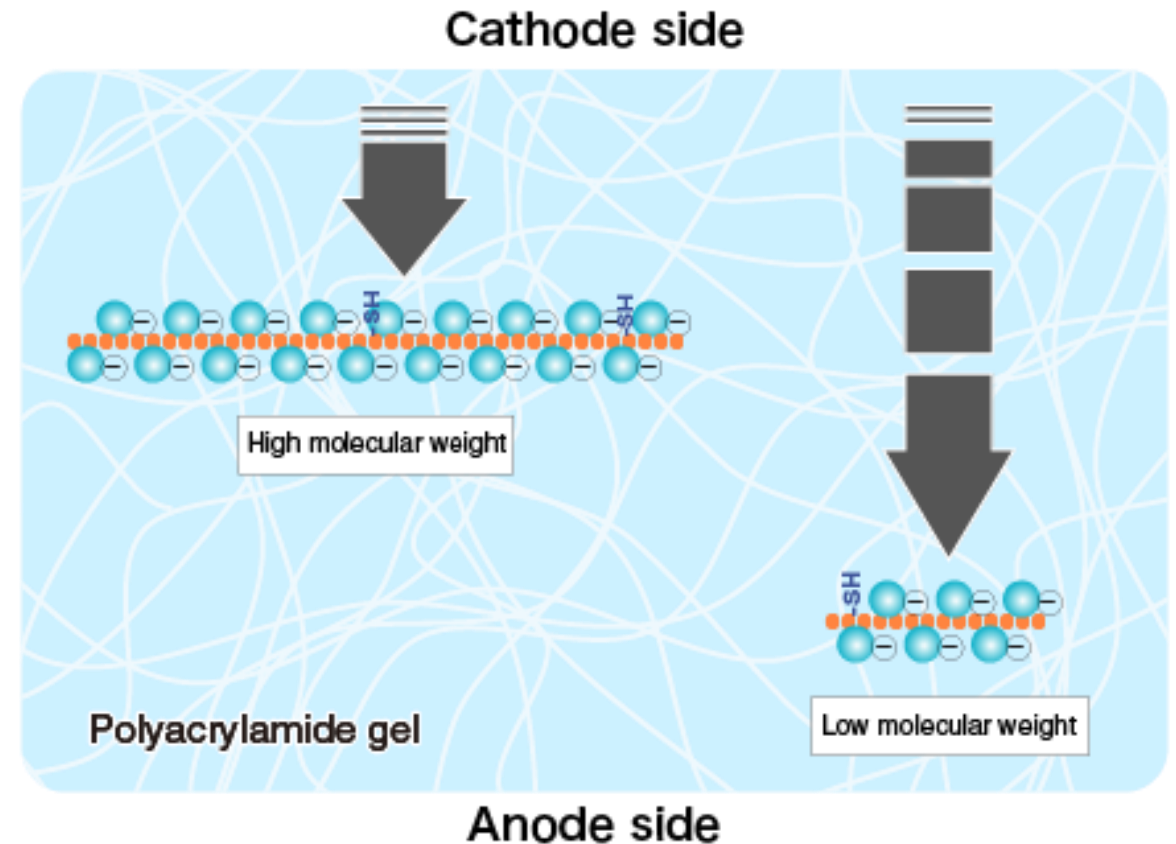
- **RIPA:**

- 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

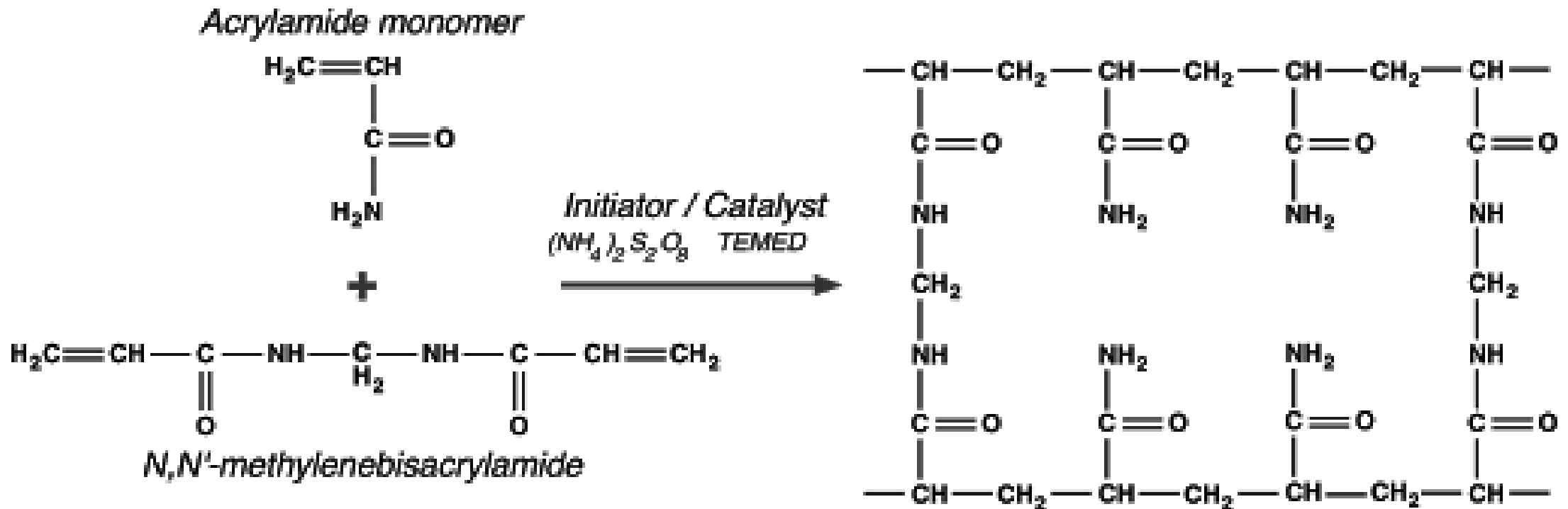
ПААГ-электрофорез.

- 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.



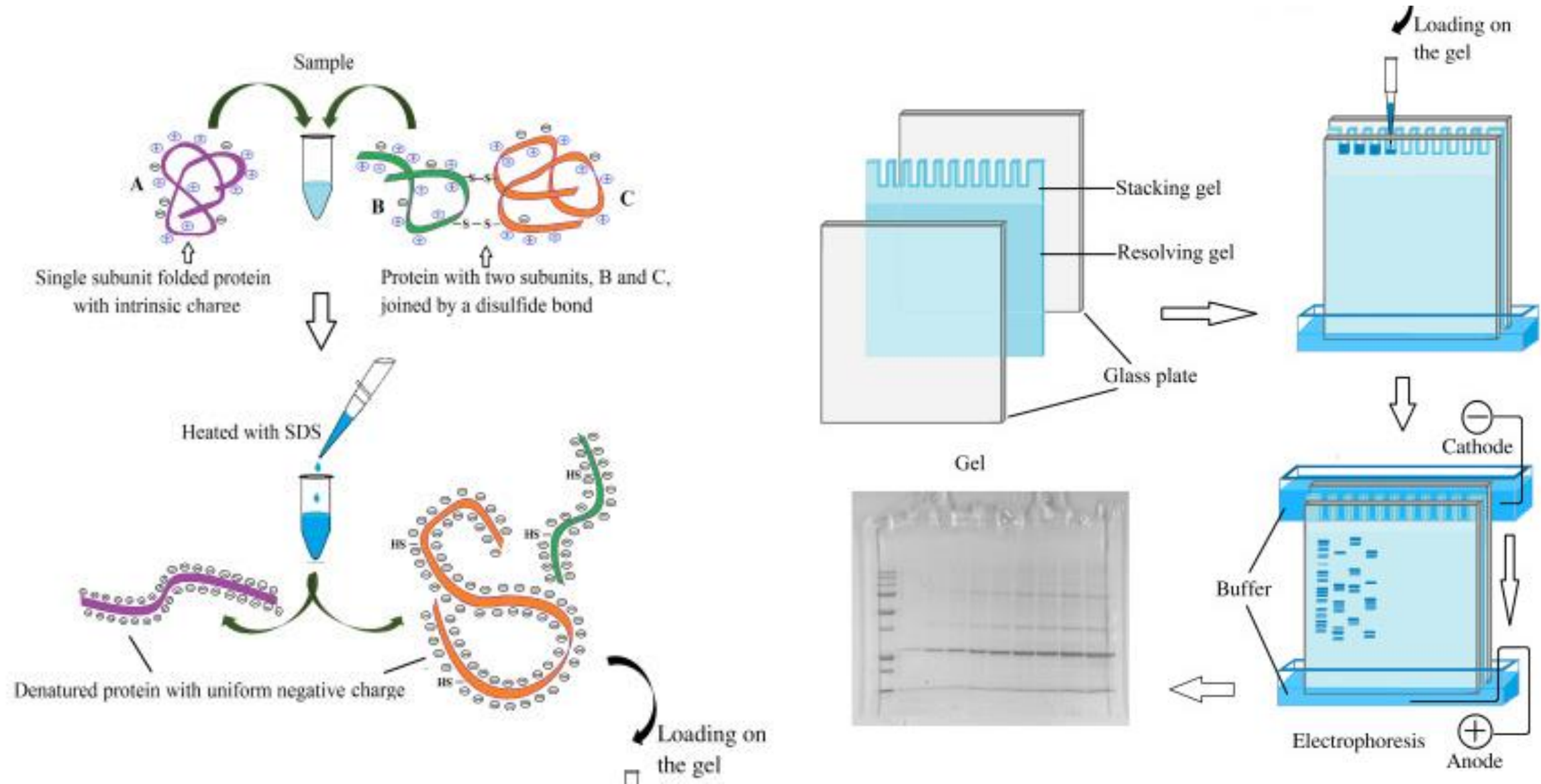
- При электрофорезе на колонках с полиакриламидным гелем стационарной фазой является гель, приготовленный из смеси акриламида и N,N'-метиленабисакриламида.



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

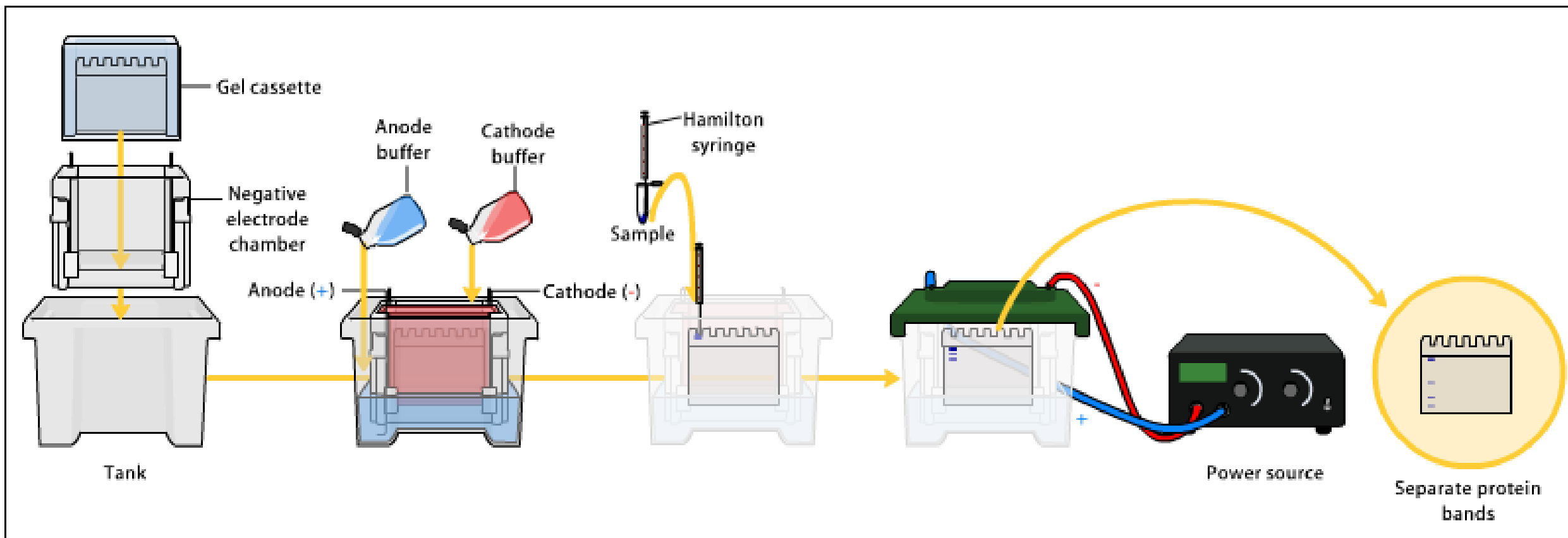
- 1.вымыть камеры детергентом, хорошо сполоснуть;
- 2.мыть стекла детергентом (если очень грязные или из сомнительного источника - хромпиком); если хочется, чтобы гель легко снимался со стекол - силиконизировать (достаточно 1 раз на ~10 прогонов);
- 3.оценить объем геля:

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 гребёнку;
- 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
DDI H ₂ O	1.8 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (RG Bfr.)	1.3 ml
40% Acrylamide Stock	800 μ l
20 % SDS	100 μ l
30% Ammonium Persulfate	10 μ l
TEMED	4 μ l

2 gels	1 gel	2 gels
3.6 ml	1.6 ml	3.2 ml
2.6 ml	1.3 ml	2.6 ml
1.6 ml	1.0 ml	2.0 ml
200 μ l	100 μ l	200 μ l
20 μ l	10 μ l	20 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 H ₂ O | 15 ml |
| • Total | 40 ml |

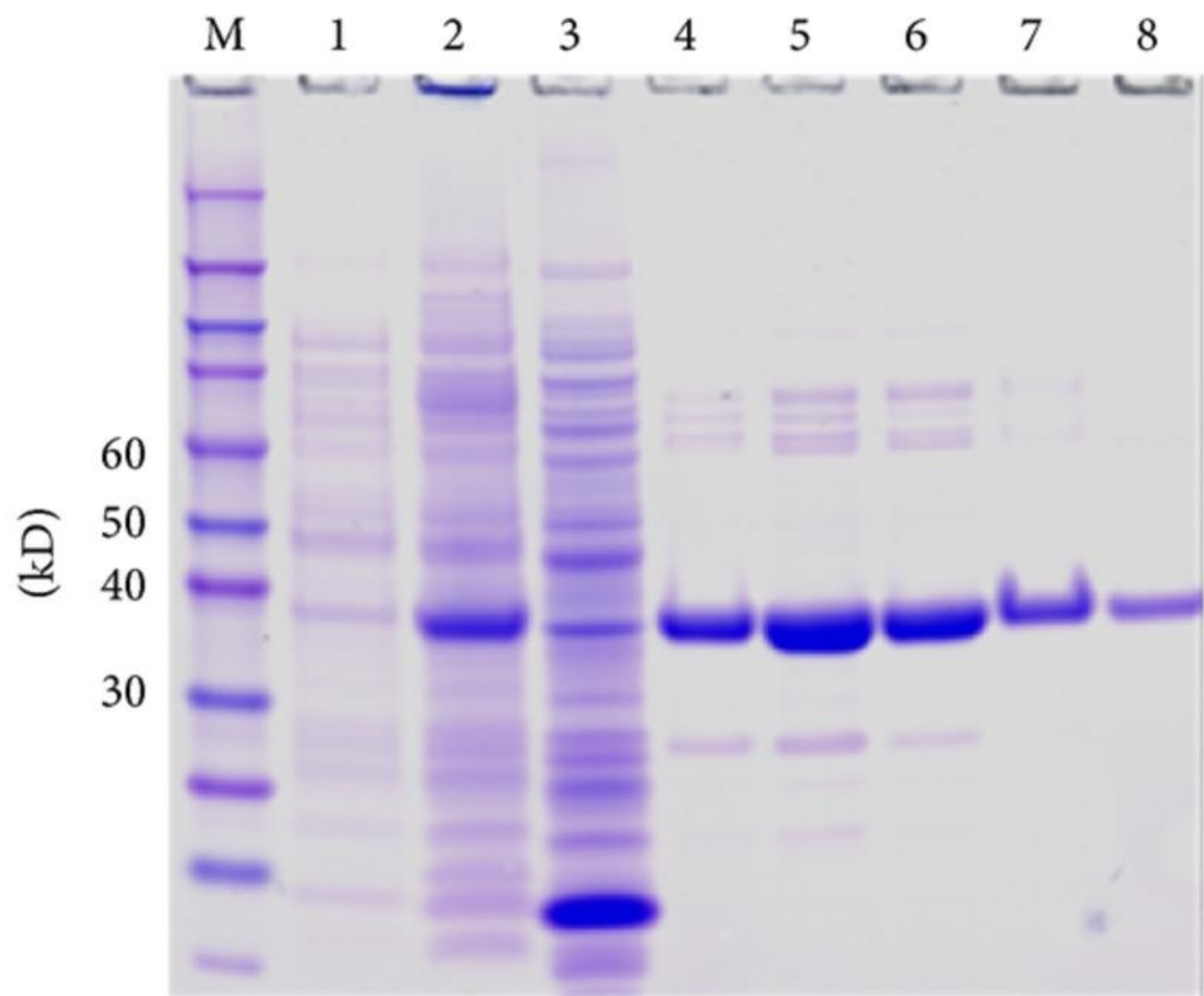
Coomassie Stain Solution:

- | | |
|----------------------------------|--------|
| • Ethanol | 150 ml |
| • Glacial Acetic Acid | 50 ml |
| • DDI H ₂ O | 300 ml |
| • Coomassie Brilliant Blue–R-250 | 1 g |

Coomassie Stain Solution:

- | | |
|------------------------|---------|
| • Ethanol | 1200 ml |
| • Glacial Acetic Acid | 400 ml |
| • DDI H ₂ O | 2.4 l |

pI глицина – 6,06





a



b

ЛИТЕРАТУРА

1. Patrinos, G. P., Danielson, P. B. & Ansorge, W. J. Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future. in Molecular Diagnostics: Third Edition (2016). doi:10.1016/B978-0-12-802971-8.00001-8.
2. Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. Di. T. & Krieger, M. A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. BioMed Research International (2017) doi:10.1155/2017/9306564.
3. Green, M. R. & Sambrook, J. Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press (2012).
4. Glick B.R., Pasternak J.J. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 5th ed. ASM Press, 2018.
5. Nicholl D.S.T. An Introduction to Genetic Engineering. 4th ed. Cambridge University Press, 2021.
6. Green M.R., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
7. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. Molecular Cell Biology. 9th ed. W.H. Freeman, 2021.