

Методы выделения белков. ПААГ-электрофорез

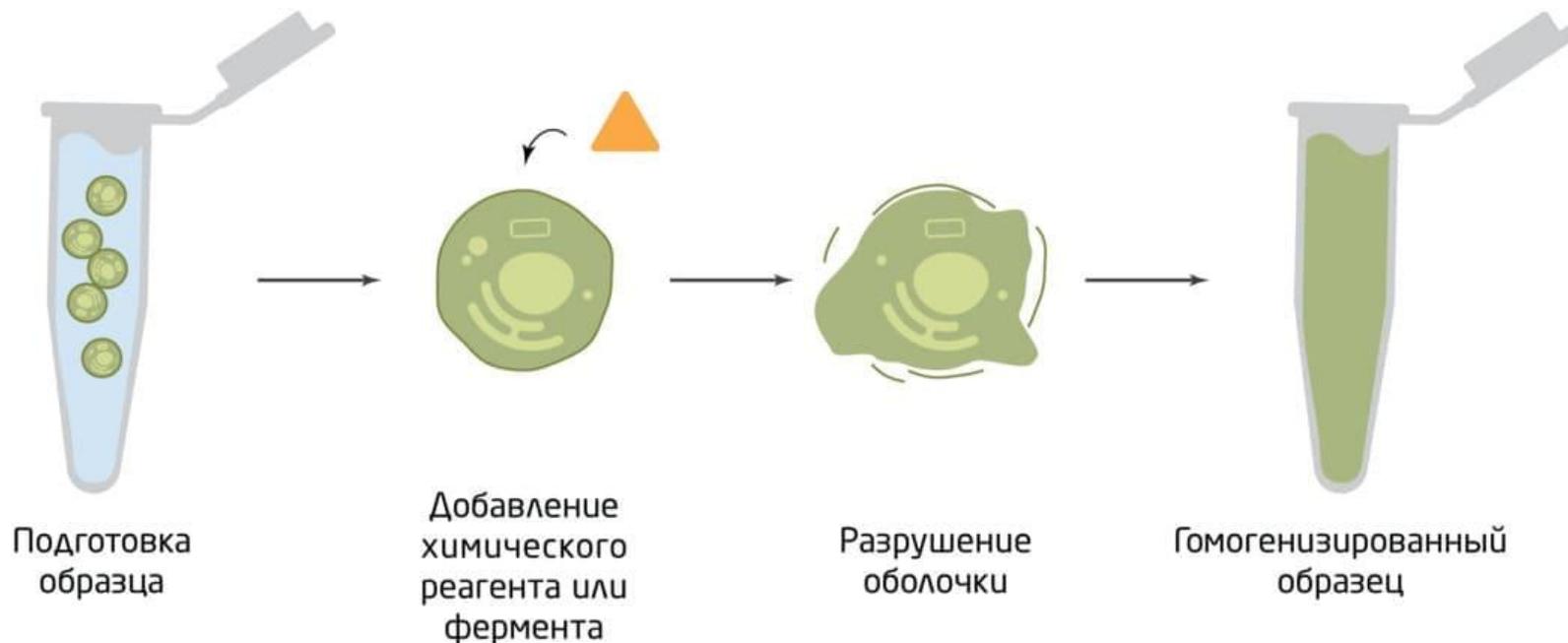
Лекция 12

Методы выделения белков

- Со времени исторических работ первых биохимиков методы выделения и разделения различных молекул, важных для биологии, претерпели значительные изменения, но в целом их содержание осталось примерно тем же.
- При работе с биологическим объектом первым этапом всегда оказывается разрушение тканей и их предварительное фракционирование. При этом стоит задача максимально предотвратить разрушение целевых молекул, и избавиться от максимального количества загрязняющих примесей.

Гомогенизация

- Для разрушения тканей применяют различные методы — механическую гомогенизацию (например, проворачивание материала в мясорубке), гомогенизацию ультразвуком (при которой клетки разрушаются кавитацией в растворе), продавливание через небольшое отверстие под высоким давлением, замораживание-оттаивание и др.
- В среду для разрушения тканей добавляют различные защитные реагенты — например, бета-меркаптоэтанол для предотвращения окисления белков, ингибиторы ферментов (преимущественно гидролаз, разрушающих биополимеры или меняющих их свойства), а саму работу проводят на холоде для максимального снижения скорости действия ферментов в гомогенате.



- Метод измельчения образца выбирают в зависимости от метода анализа и объекта исследования. При этом важно избежать перекрестной контаминации образцов, особенно если образец измельчается для последующего молекулярно-генетического анализа.
- Например, для измельчения тканей насекомых, хрящей, опухолевого биоптата используют гомогенизаторы, работающие по принципу шаровой мельницы (например, [FastPrep 24](#)).
- В гомогенизаторах этого типа к образцу добавляют специальные матриксы — шарики разного диаметра из твердых инертных материалов (металл, стекло, керамика, гранатовый или кварцевый песок). При интенсивной вибрации шарики ударяют по образцу, тем самым перемалывая его.
- Измельчение происходит в стерильных пробирках объемом 2, 15 или 50 мл. Для предотвращения перегрева образца предусмотрено охлаждение образцов сухим льдом.



Для измельчения сухих образцов (например, семян) использует ножевые мельницы [Tube Mill](#). Фактически это аналог кофемолки, но измельчение происходит в индивидуальной стерильной сменной камере, что позволяет избежать загрязнения образца. Данный вариант идеален при работе с сухими сыпучими продуктами (например, измельчении зерна или комбикорма для анализа на наличие ГМО).



French Press G-M™ High-Pressure Cell Press Homogenizer



Ультразвуковая гомогенизация

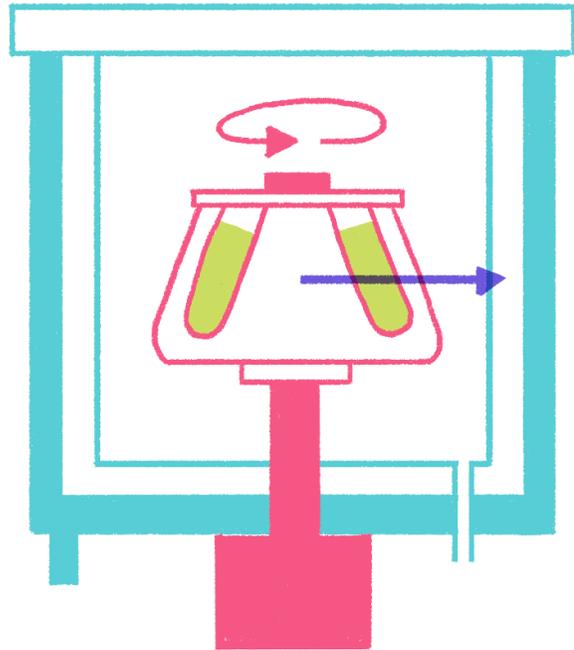
- При использовании данного метода специальный стержень — зонд — погружают в образец, и здесь возникает высокая вероятность загрязнения образца. При длительном использовании наконечник погружного зонда разрушается, и на нем образуются микротрещины, где могут оставаться вещества, которые легко могут попасть в анализируемый образец.
- Чтобы избежать кросс-контаминации, компания Qsonia разработала технологию опосредованного воздействия ультразвукового импульса на образцы.



Суть технологии проста: импульс от зонда, расположенного снизу, передается к образцу в пробирке опосредованно, через жидкость (воду), в которую помещена пробирка с образцом. Эта жидкость, помимо передачи импульса, осуществляет функцию термостатирования образцов, оберегая чувствительные макромалекулы от излишнего перегрева. Данное решение позволяет измельчать до 12 образцов одновременно в одинаковых условиях.

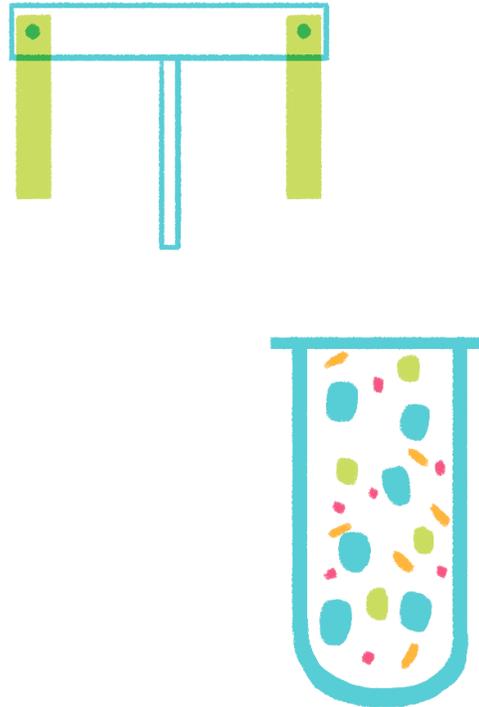
Центрифугирование

угловой ротор

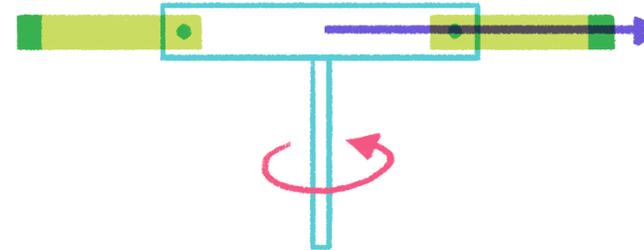


охлаждение мотор вакуум

бакет-ротор



центробежная сила



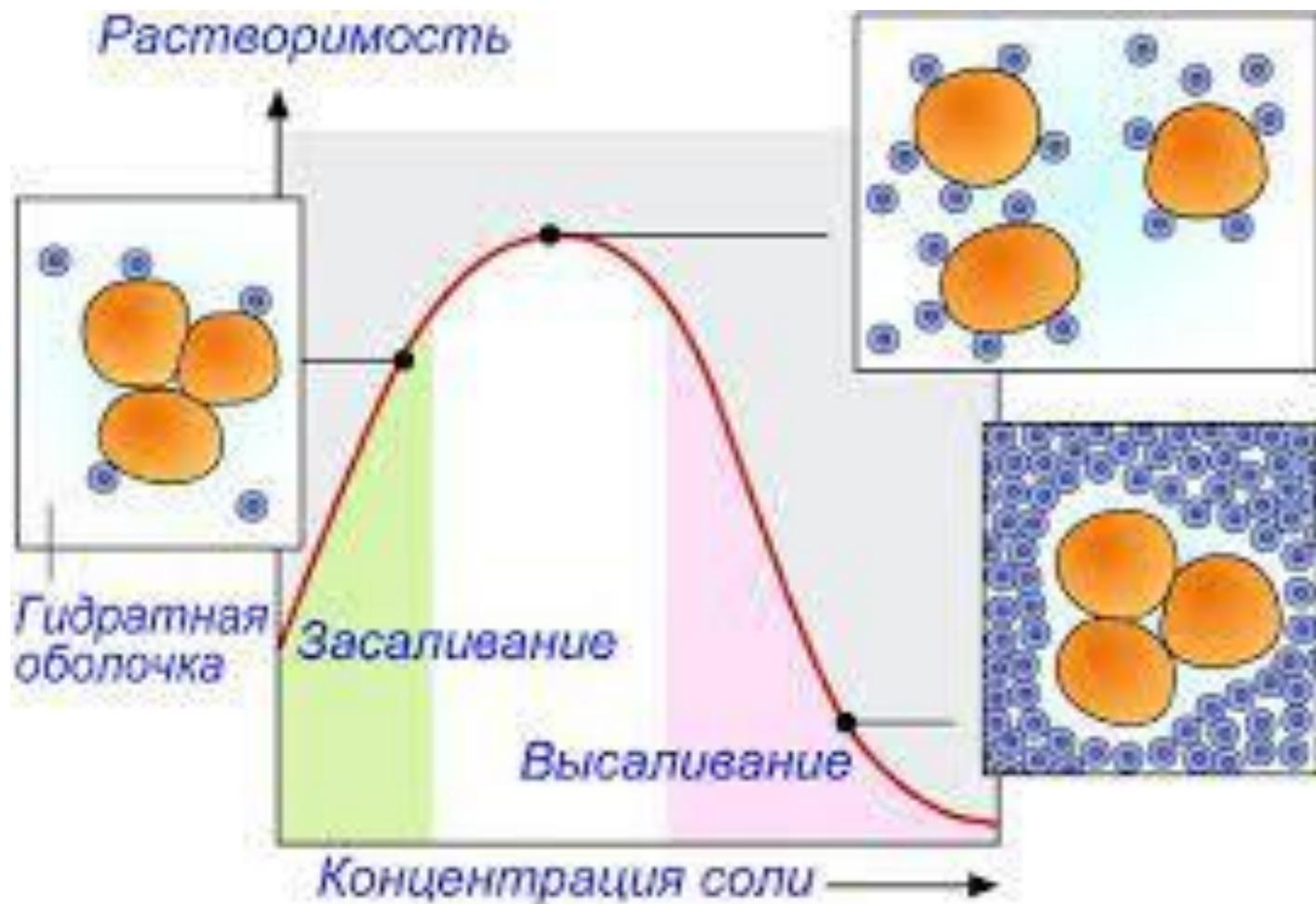
Следующим шагом разделения обычно оказывается центрифугирование. Дробное центрифугирование, при котором гомогенат подвергается действию всё больших центрифужных полей, позволяет не только отделить неразрушенные клетки, но и выделить отдельные интересные исследователя компоненты клеток — например, ядра, митохондрии, рибосомы, мембраны.

Центрифугирование существенно обогащает препарат целевыми молекулами, сильно упрощая последующие шаги по разделению сложнейшей смеси биоконпонентов, и может быть проведено для большого количества биоматериала — это очень важно для выделения минорных компонентов из смесей.

Экстракция

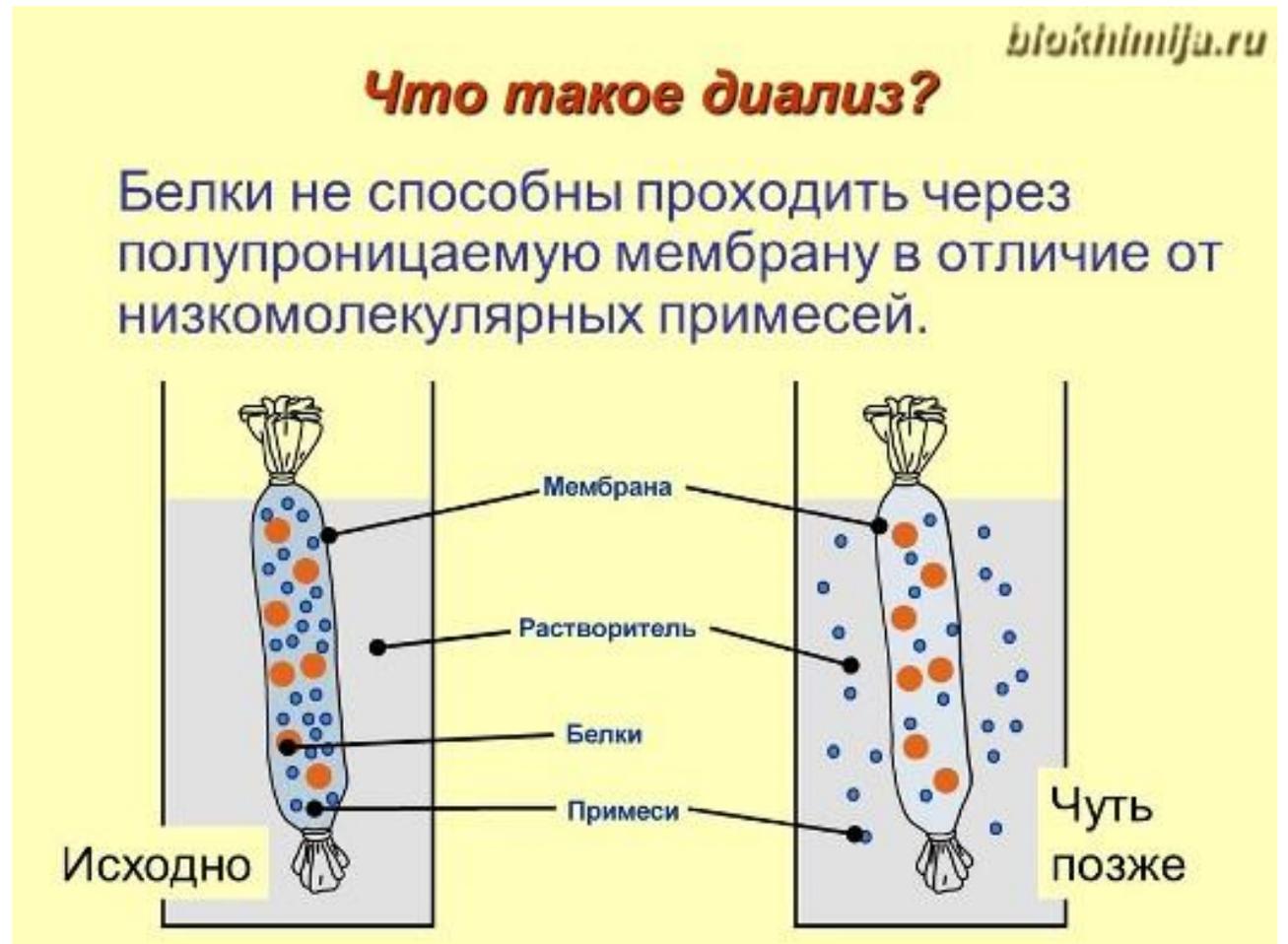
- После центрифугирования препарат можно подвергнуть или экстракции отдельных интересующих исследователя химически близких групп компонентов (например, смесью эфира и метанола можно количественно извлечь из мембран липиды), или предпринять дальнейшие усилия по отделению примесей. Наиболее сложным вопросом при таком разделении оказывается разделение белковых смесей — необходимо выделить зачастую весьма немногочисленный компонент смеси, при этом он не должен потерять своей естественной биологической активности.
- Выделенный фермент должен работать не хуже, чем он это делает в клетке, выделенный фактор транскрипции должен хорошо и специфично связываться с ДНК, иными словами, выделенные белки должны оставаться нативными — такими же, как в живой клетке.

Высаливание



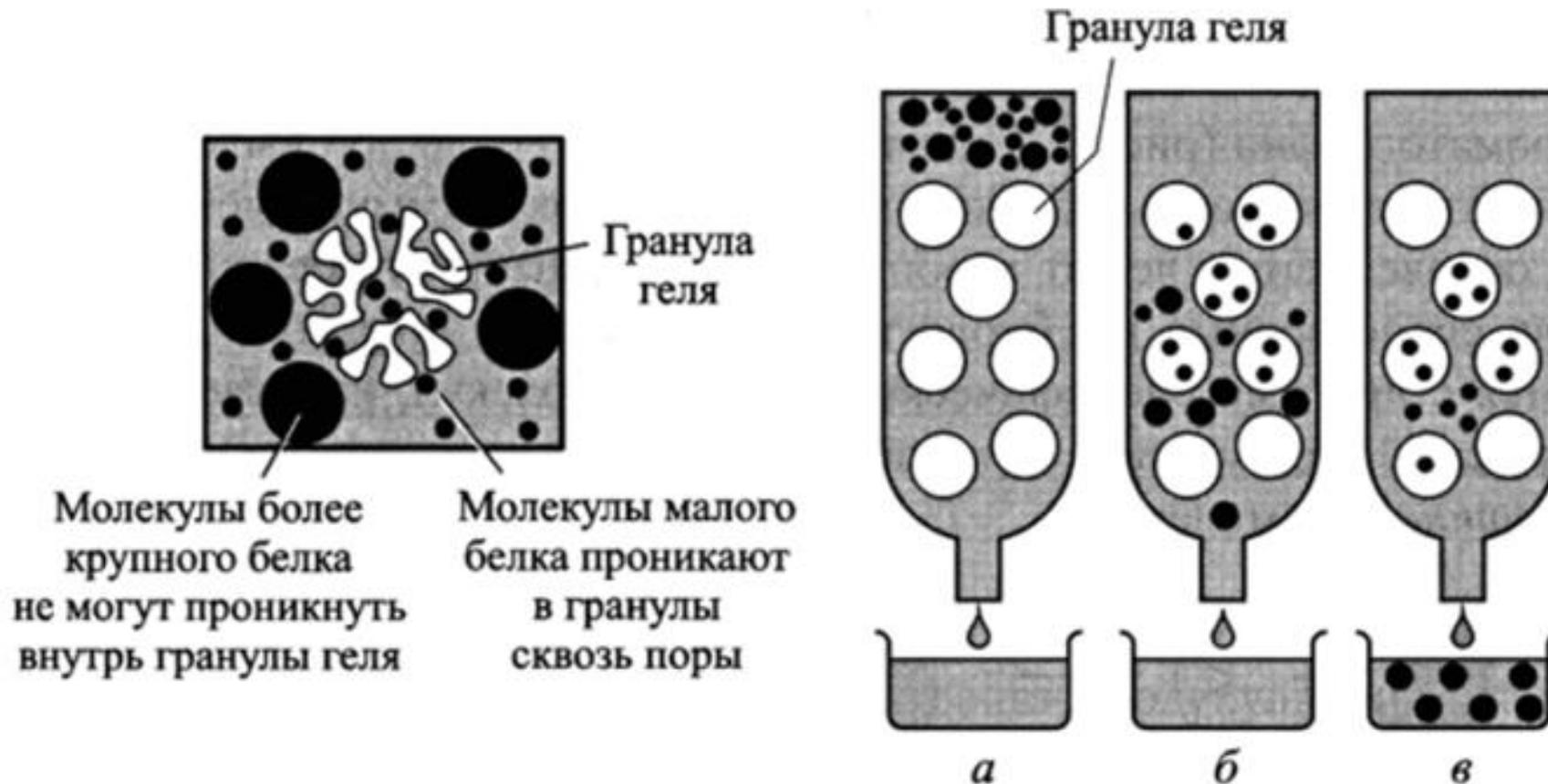
Диализ

- Диализ — процесс разделения молекул в растворе по разности их скоростей диффузии через полупроницаемую мембрану. После многократной замены внешнего раствора состав среды по обеим сторонам от мембраны (концентрация солей, рН) будет тот же, что и в окружающем растворе.



Гель-хроматография

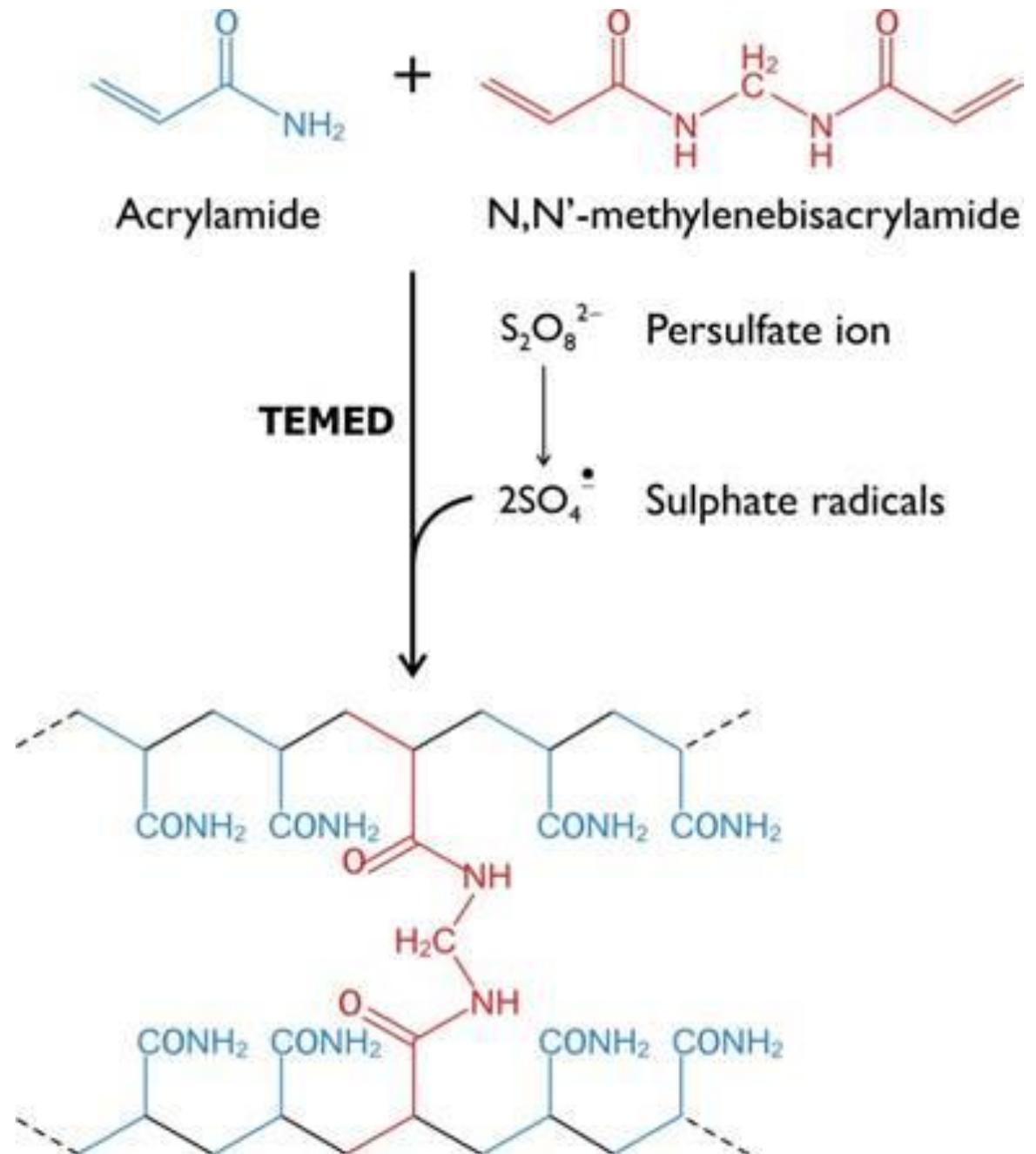
Важным способом разделения смесей биомолекул по размеру является гель-хроматография, или проникающая хроматография.



Особенности электрофореза в полиакриламидном геле

- **Полиакриламидный гель (ПААГ)** обладает многими качествами идеального носителя. Имея свойства молекулярного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение белковых смесей не только по заряду, но и по размеру и форме частиц. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля. ПААГ формируют путем сополимеризации акриламида, создающего линейную основу, и N,N'-метиленабисакриламида (BIS), служащего для поперечных «сшивок» линейных цепей.

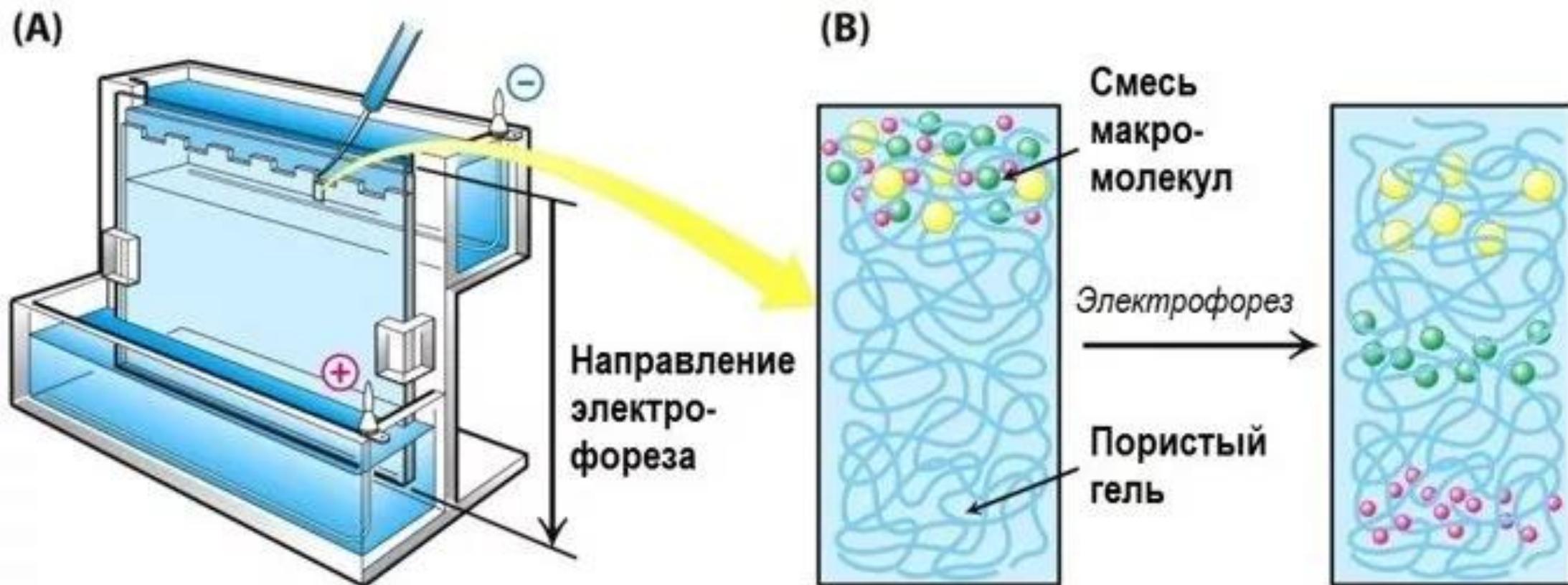
- В результате сополимеризации образуется трехмерная сетка геля. Каждый второй углеродный атом линейной цепи содержит кислотную амидную группу, что обеспечивает гидрофильность полимера. В то же время ПААГ не содержит ионизируемых групп.
- Для сополимеризации нужны инициаторы и катализаторы (окислительно-восстановительные системы – источники свободных радикалов). Чаще всего используют систему из двух компонентов:
 1. персульфат аммония (ПСА, APS). Синоним - надсерноокислый аммоний. Функция: инициатор полимеризации
 2. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД, TEMED). Функция: катализатор образования ПААГ



- Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50% можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, содержащем 7.5% акриламида, равен 5 нм, а 30% акриламида - 2 нм.
- При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу (M_r) разделяемых веществ и форму их молекул.
- Если плотность геля не будет соответствовать молекулярной массе исследуемого белка, то он, либо не войдет в гель, либо будет мигрировать с очень высокой скоростью и, как следствие, выйдет из геля раньше времени.
- Также в качестве параметров, влияющих на эффективность разделения, в особенности белков с приблизительно равной молекулярной массой, можно отметить время проведения электрофореза, длину разгоночной дистанции (чем больше гель, тем выше разрешение), температура процесса (при пониженной температуре белковые зоны меньше размываются за счет диффузии).

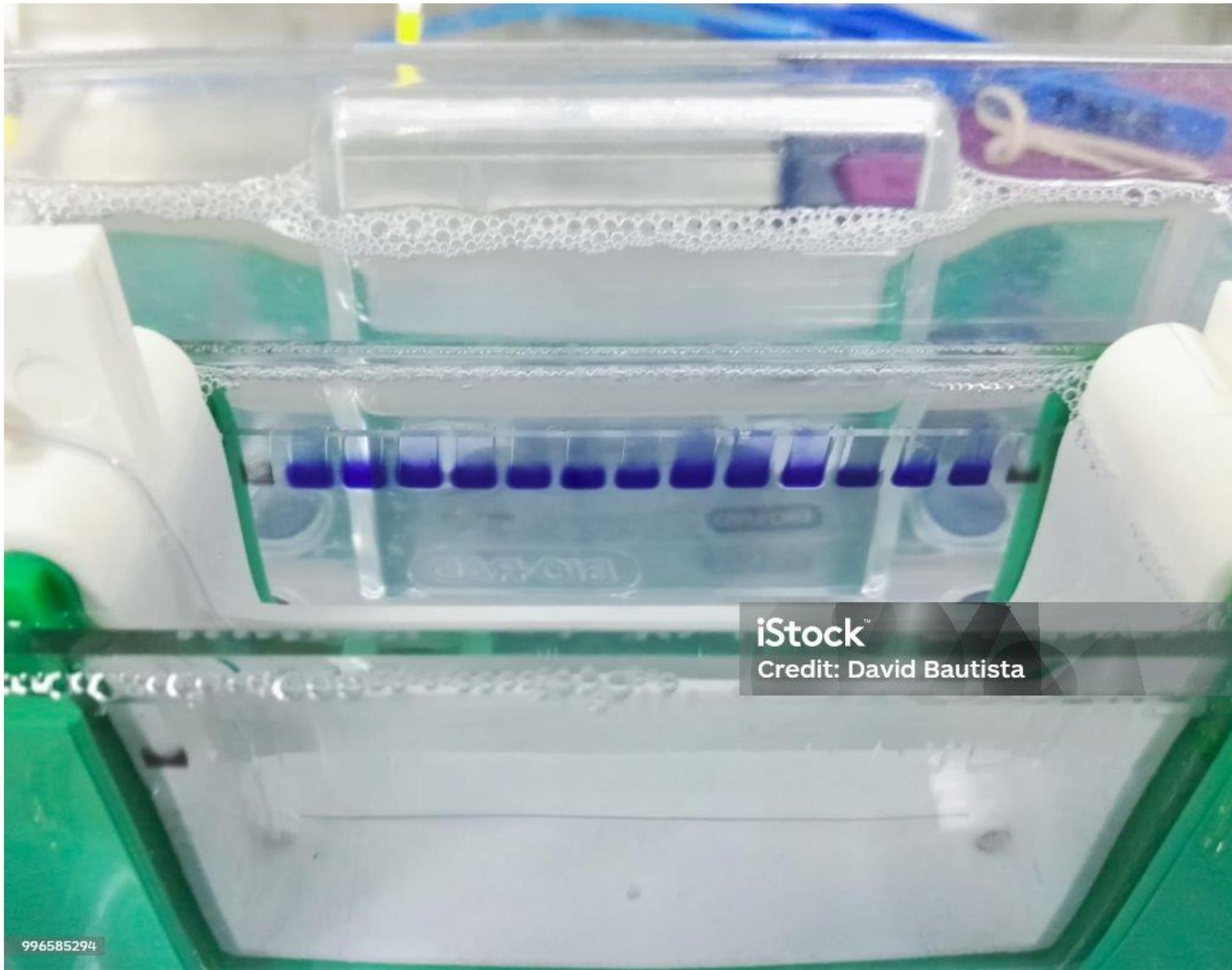
Таблица 2 - Выбор концентрации акриламида для оптимального разрешения смеси белков

Концентрация акриламида, %	Линейный диапазон распределения, кДа
15	12 - 43
10	16 - 68
7.5	36 - 94
5	57 - 212



Система электрофореза на полиакриламидном геле FastGene®

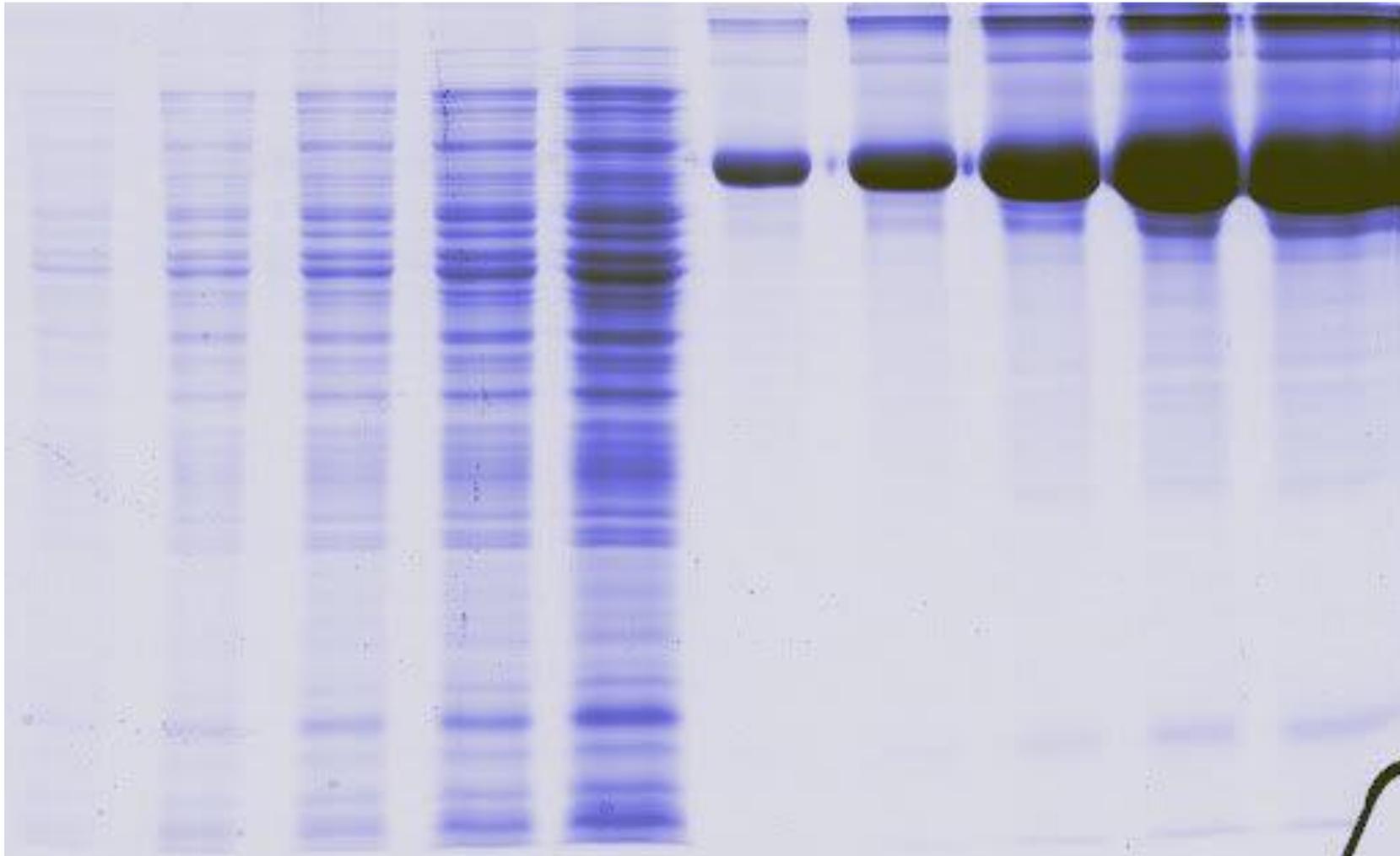




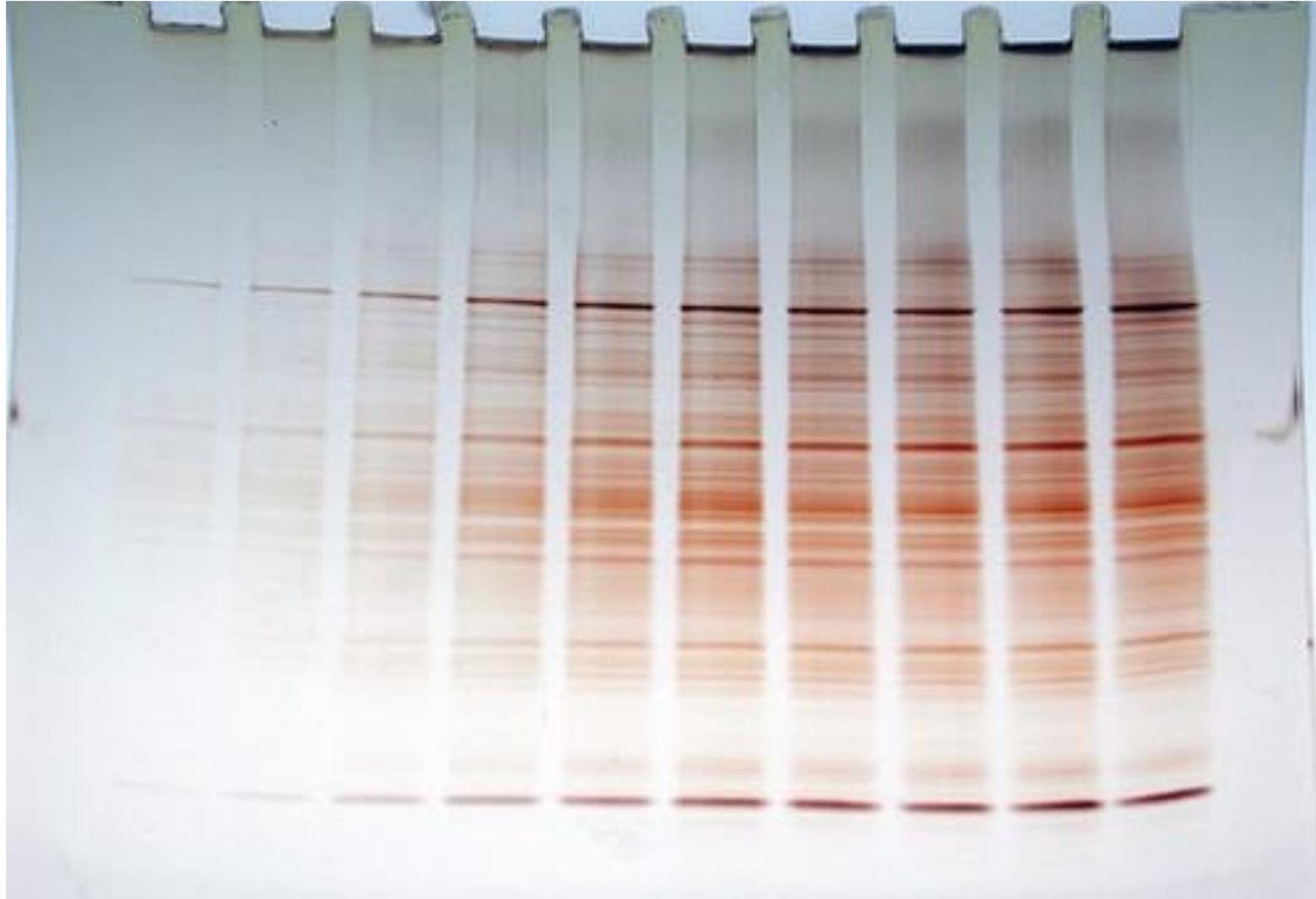
iStock[®]
Credit: David Bautista

- Для окрашивания белковых зон на ПААГ-электрофореграмме используют несколько универсальных методов. Для этого разделившиеся зоны белков фиксируют раствором уксусной кислоты (1 – 10%), смесью уксусной кислоты и этанола (реже – метанола), раствором ТХУ, насыщенным раствором сульфата аммония и окрашивают, используя раствор красителя.
- Фиксация предотвращает размывание зон из-за диффузии белковых молекул в геле. Используют такие красители, как амидочерный (амидошварц), кумасси ярко-синий (марок G250, R250), Zn/имидазол, нитрат серебра. Окраска полос происходит пропорционально количеству белка в зоне.
- Окраска и количество полос, соответствующих белкам, также зависят от чувствительности того или иного красителя. Так, нитрат серебра выявляет зоны с меньшим содержанием белка, чем кумасси.

Окраска с кумасси ярко-синий (марок G250, R250)



Окраска серебром



Окрашивание в 100 раз более чувствительно, чем окрашивание белка кумасси синим, и в 10 раз более чувствительно, чем бромистый этидий, для ДНК и РНК.

Функции

- чувствительный к нанограммам
- Окрашивает нуклеиновые кислоты и белки
- Максимальная видимость: создает кристально чистый фон и резкие белковые полосы.
- Нижний предел обнаружения: 1 нг/диапазон

- **Трис-глициновый электродный буферный раствор 1X**
- *Состав:* 25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0.1% SDS, деионизированная вода.
- Для приготовления электрофорезного буфера развести в десять раз трис-глициновый стоковый раствор в мерной колбе и добавить SDS до конечной концентрации 0.1%. Довести деионизированной водой до требуемого объема.
- *Лабораторная пропись для получения 1л раствора:* 100 мл трис-глицинового стокового раствора 10X, 10 мл 10%-ного SDS, деионизированная вода.

- **Разделяющий гель:**

- *Состав:* 62.5 мМ трис-НСl, рН 8.8, 46.5% бис-акриламид (30%, 29:1), 0.1% SDS, 0.5% персульфата аммония, 0.09% TEMED, деионизированная вода.

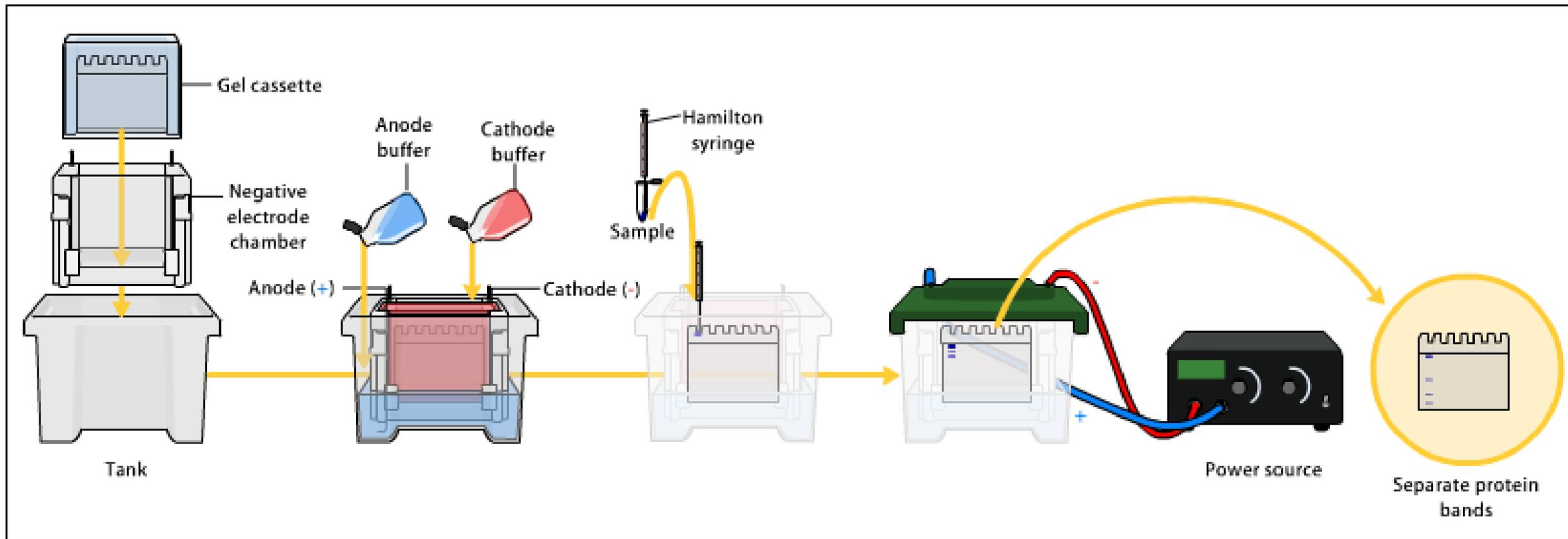
- *Способ приготовления:* Смешать все компоненты геля в указанном количестве

- *Лабораторная пропись для получения 1 геля:* 0.74 мл деионизированной воды, 1.50 мл 1М трис-НСl, рН 8.8, 2.00 мл раствора бис-акриламида (30%, 29:1), 40 мкл 10%-ного раствора SDS, 20 мкл 10%-ного раствора персульфата аммония, 4 мкл TEMED .

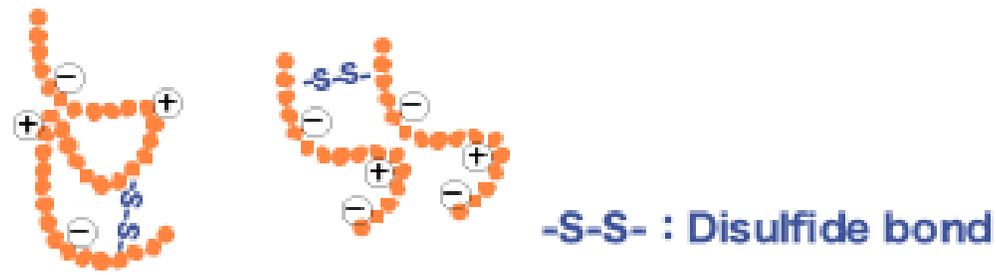
- **Формирующий (концентрирующий) гель:**
- *Состав:* 62.5 мМ трис-НСI, рН 6.8, 26.85% бис-акриламид (30%), 0.1 % SDS, 0.94% персульфата аммония, 0.2% TEMED, деионизированная вода.
- *Способ приготовления:* Смешать все компоненты геля в указанном количестве
- *Лабораторная пропись для получения 1 геля:* 0.8 мл деионизированной воды, 0.25 мл 1М Трис-НСI, рН 6.8, 0.4 мл раствора бис-акриламида (30%, 29:1), 20 мкл 10%-ного раствора SDS, 14 мкл 10%-ного раствора APS, 3 мкл TEMED

Растворы для приготовления 5% концентрирующего геля

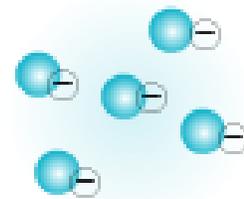
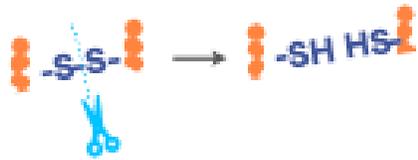
Solution components	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.012



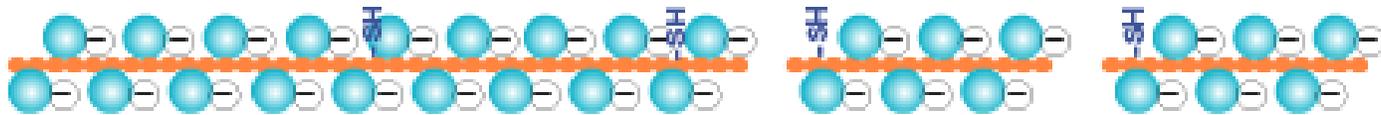
Proteins
Folded with positive
and negative charges



Reduced by 2-mercaptoethanol
(disulfide bonds are reduced)



Unfolded to a linear structure with negative charge proportional
to the polypeptide chain length



Molecular weight markers



5X SDS-PAGE sample buffer

Working solution

0.225 M Tris-Cl, pH 6.8

5% SDS

0.25 M DTT

10% 2-ME

1% Triton X-100

25% Glycerol

0.01% Bromophenol blue

Stock solution

1 M Tris-Cl, pH 6.8

SDS

1 M DTT

2-ME

Triton X-100

Glycerol

Bromophenol blue



Электрофорез проводят в однородном электрическом поле, то есть в поле, напряженность E которого во всех точках одинакова. Электрический ток пропускают через проводник – буферный раствор, налитый в канал из изолирующего материала (например, стекла) или пропитывающий какую-либо поддерживающую среду – носитель (например, бумагу или гель). Сопротивление R буферного раствора задается двумя факторами: концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью.

Электрофоретической подвижностью (μ) данной молекулы называют скорость движения заряженной молекулы (выражаемой в см/ч) в электрическом поле с напряженностью 1 В/см. Именно различия в электрофоретической подвижности молекул, содержащихся в анализируемой смеси, делают возможным разделить эти молекулы в пространстве (в разных зонах электрофореграммы).

Скорость V движения молекул к тому или иному электроду снижается из-за их трения в окружающей среде. Сила трения прямо пропорциональна скорости движения молекул. Коэффициент трения молекулы, обозначенный как f , зависит как от размера, формы и степени гидратированности этой молекулы, так и от свойств самой среды.

Электрофоретическая подвижность молекул зависит:

- от самой молекулы: ее размера (молекулярной массы), формы, электрического заряда, степени диссоциации и гидратации,
- от концентрации молекул,
- от среды: ее вязкости, pH, температуры и ионной силы,
- от характеристик используемого электрического поля (для крупных макромолекул применяется электрофорез в пульсирующем электрическом поле).