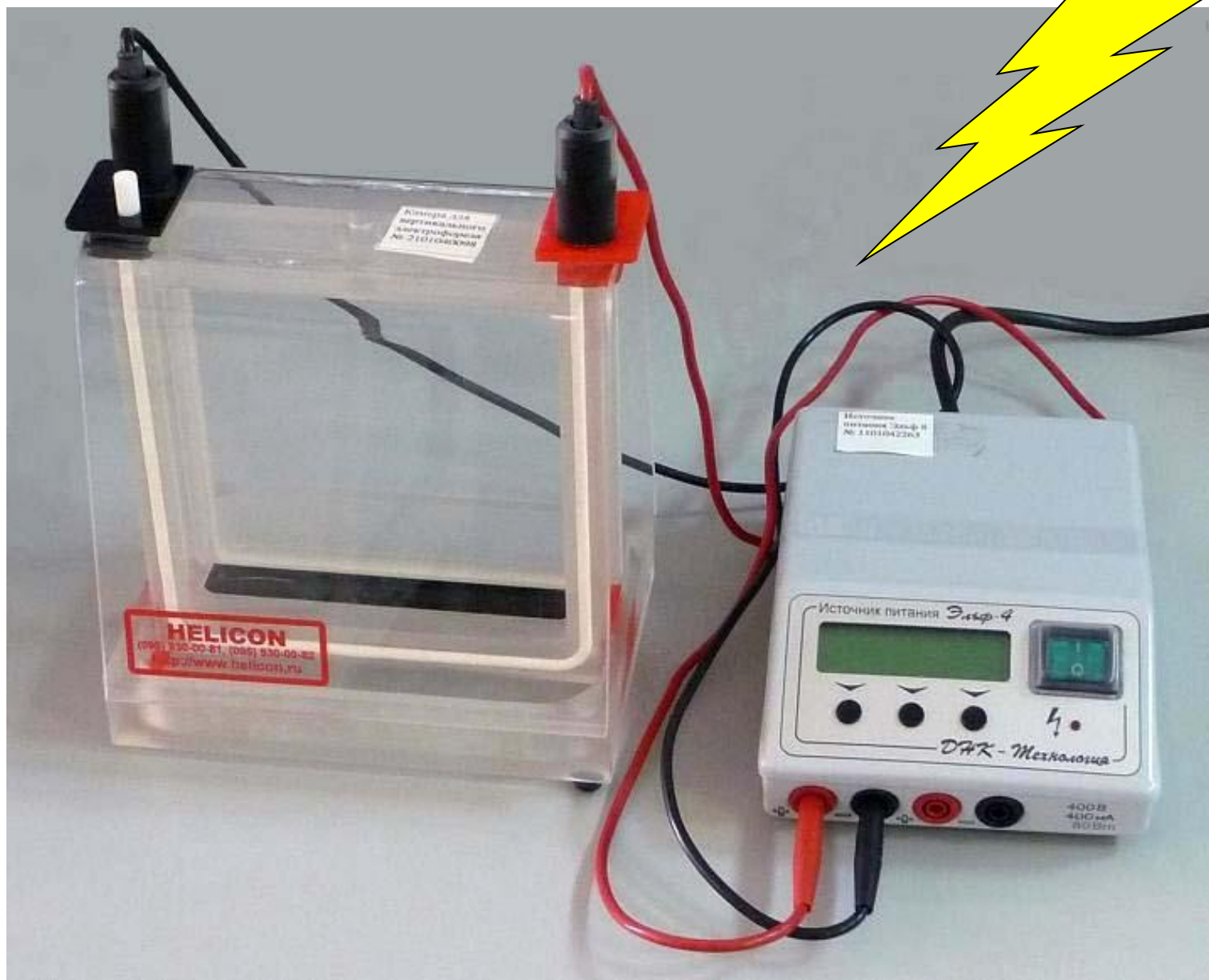


ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (аналитический)



ЭЛЕКТРОФОРЕЗ – движение заряженных молекул в растворе (токопроводящей среде) под действием сил постоянного электрического поля

Метод был предложен **Тизелиусом** для разделения заряженных молекул (1925г.).

В 1948 году Тизелиус получил Нобелевскую премию за разработку методов электрофоретического разделения белков.

Большинство биомолекул содержат ионизирующиеся функциональные группы, которые при определенных значениях pH обеспечивают молекуле свойства катиона или аниона.

Два важнейших фактора, определяющих эффективность разделения заряженных молекул при электрофорезе:

- 1. Отношение эл. заряда молекулы к её массе:**

$$q / m$$

Молекулы с близкими по величине q , но отличающиеся по молекулярной массе.

- 2. Взаимодействие материала носителя с молекулами разделяемой смеси («эффект молекулярного сита»).**

Различия в скоростях движения заряженных молекул смеси будет определяться:

- **усиливает движение**: движущая сила электрического поля, действующая на катионы и анионы
- **замедляют движение**: сила трения и силы электростатического взаимодействия молекулы с материалом носителя.

$$V_{\text{движения}} = \frac{E \times q}{D \times \eta \times F}$$

где: **E** – напряженность электрического поля

q – заряд молекулы (знак и величина)

D – размер (форма) молекулы (сила трения)

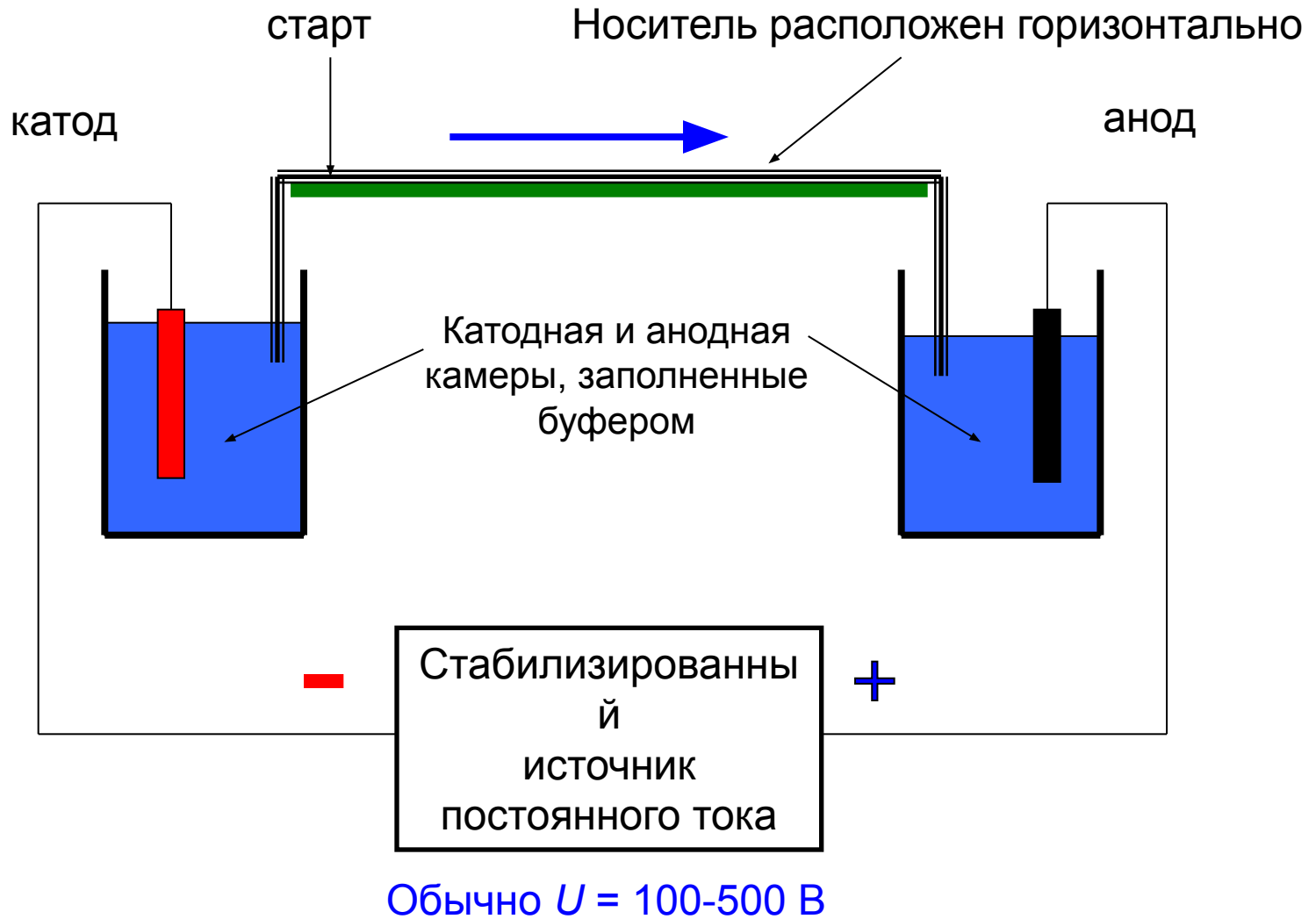
η - вязкость среды

F – силы электростатического взаимодействия молекулы и материала носителя

Материалы носителя для электрофореза

1. Хроматографическая бумага
2. Ацетат целлюлозы
3. Тонкие слои оксидов Si и Al
4. Гели:
 - агар
 - крахмал
 - полиакриламид (ПААГ):

В зависимости от %-концентрации акриламида (3 – 30%) формируется сеть с заданным размером ячеек. Это позволяет достигать высокую эффективность разделения исходной смеси.



Общая схема электрофоретической установки

Буферы для электрофореза:

- фосфатный буфер
- веронал-мединаловый буфер
- трис-HCl буфер
- трис-глициновый буфер
- ацетатный буфер
- боратный буфер

Буферы обеспечивают:

- создают необходимое значение рН, при котором происходит диссоциация определенных функциональных групп в разделяемых молекулах (регуляция величины q)
- на поверхности катода и анода происходит электролиз: на катоде – защелачивание, на аноде – закисление. Это требует высокой концентрации компонентов буфера: 100 mM и более. После первого использования буфера, его порции из катодной и анодной камер уже не смешивают.

Виды электрофореза

1. Аналитический Э/Ф:

- качественный анализ
- количественный анализ
- оценка чистоты препаратов
- определение молекулярной массы

2. Препаративный Э/Ф:

уступает по возможностям хроматографическим методам

Диск-электрофорез (Дэвис, 1959)

Связан с изобретением полиакриламидного геля. Термин происходит от англ. *discontinuous* = *прерывистый, неоднородный*.

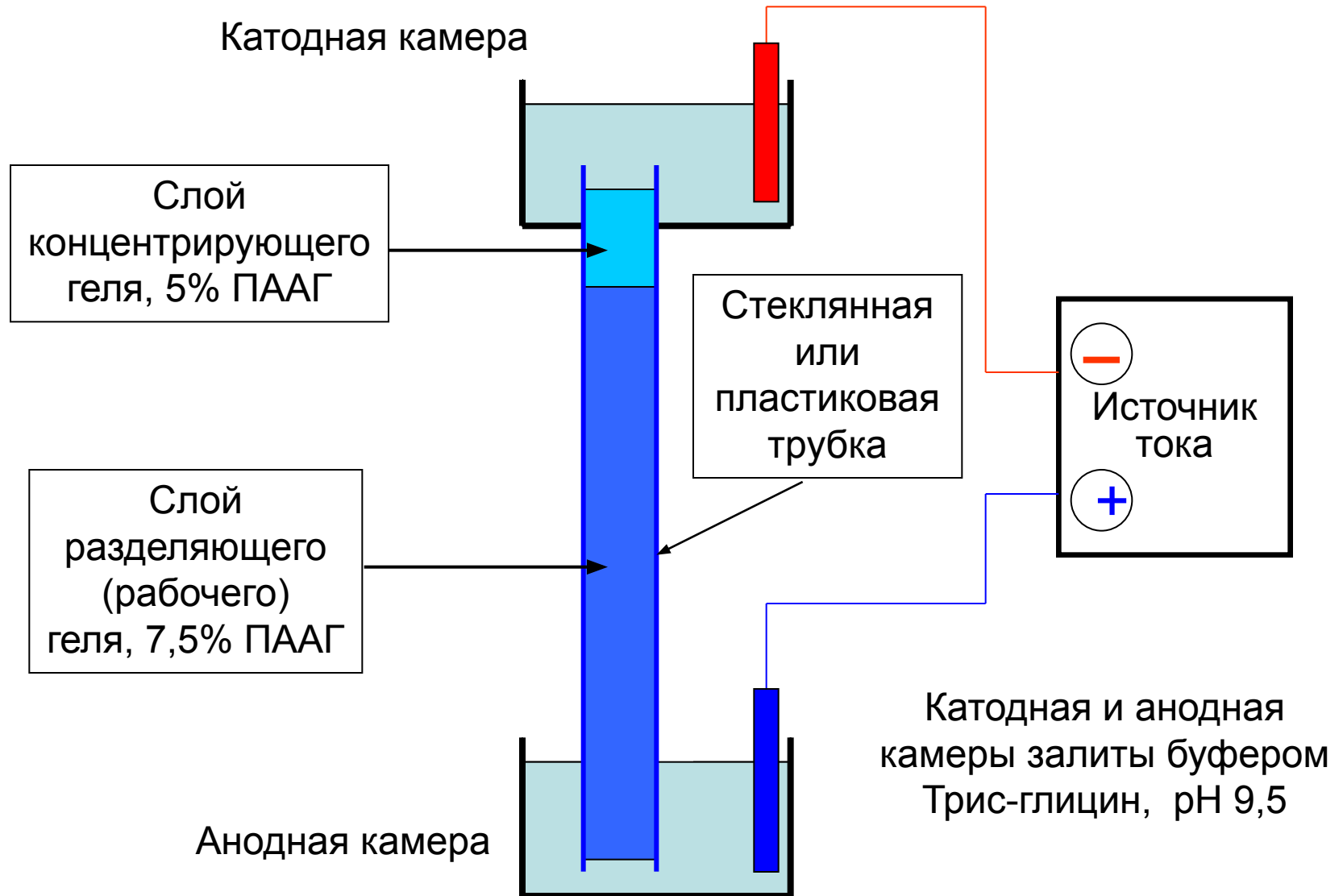
Формируется гель, в минимальном варианте состоящий из двух слоёв: **концентрирующий гель** и **разделяющий (рабочий) гель** (разная %-концентрация акриламида). В **концентрирующий гель** (низкая концентрация, крупнопористый) вносят разделяемую смесь. Это позволяет смеси войти в разделяющий гель в виде компактной порции, что важно для последующего эффективного разделения компонентов. Собственно процесс разделения идет в толще **разделяющего геля** (может состоять из 1 и более слоев с определенной концентрацией акриламида).

Исходные компоненты для приготовления ПААГ готовят в виде отдельных растворов. В состав включают буфер для придания электропроводных свойств будущему гелю.

Растворы смешивают непосредственно перед использованием и сразу заливают в соответствующие формы (пластины или цилиндры), где и происходит полимеризация геля.

Каждый слой разделяющего геля формируется последовательно. Завершается процесс полимеризацией концентрирующего геля (процесс идет снизу вверх). В этом геле заранее, на линии старта, формируют ячейки (углубления), куда будут вносить разделяемую смесь.

Общая схема установки для диск-электрофореза



Преимущества диск-электрофореза в ПААГ:

- Самая высокая разрешающая способность по сравнению со всеми остальными носителями. Обусловлена возможностью варьировать %-концентрацию акриламида и таким образом целенаправленно формировать его разделяющую способность.
- Сравнительная простота и быстрота анализа.
- Отсутствует электростатическое взаимодействие молекул с нитями полиакриламида (важно для высокой разделяющей способности геля).
- Возможность проведения двумерного электрофоретического разделения (двумерный электрофорез).

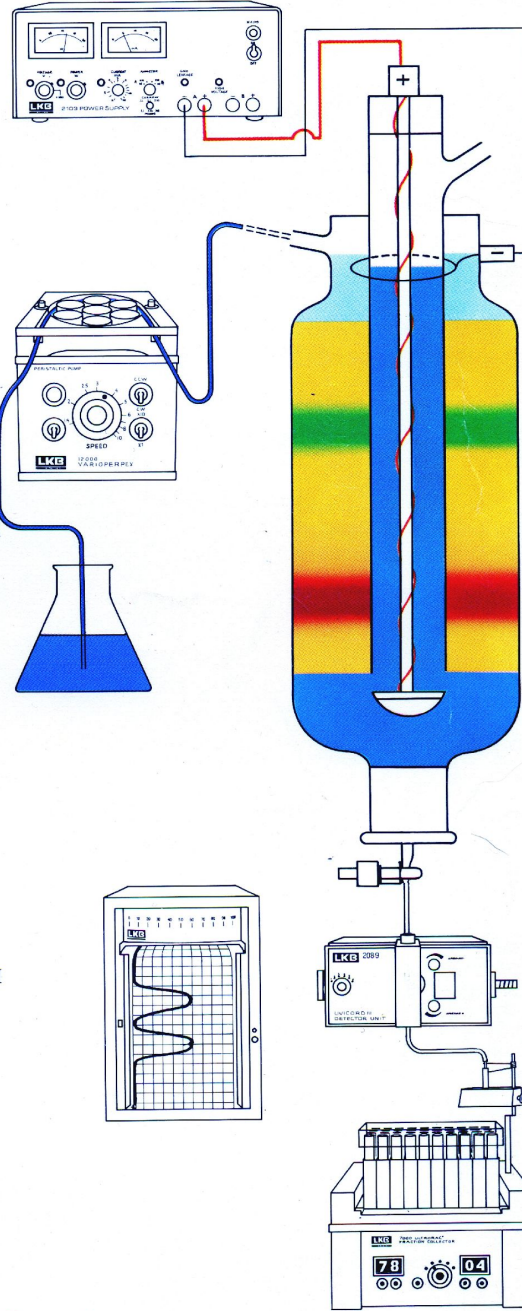
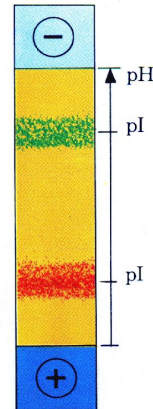
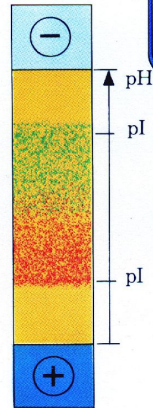
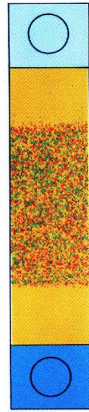
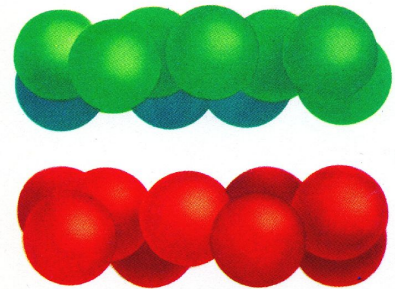
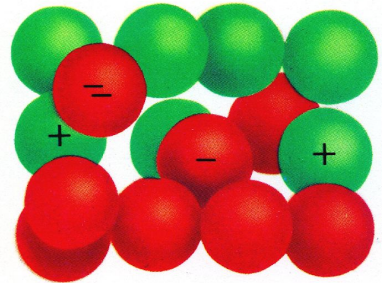
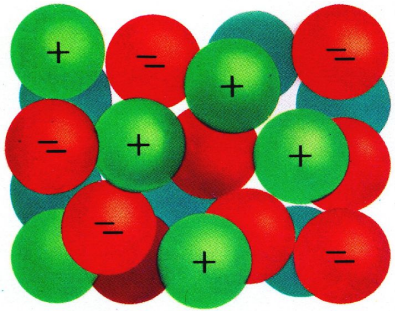
Изоэлектрическое фокусирование

Используется для разделения смеси белков на градиенте pH .

Каждая молекула смеси движется по носителю до тех пор, пока не достигнет зоны, где pH соответствует его изоэлектрической точке (pI), и останавливается в этой зоне – происходит фокусирование различных молекул смеси в разных зонах.

Процедуру проводят в клонках особой конструкции. Их заполняют синтетическими низкомолекулярными носителями (амфолиты) – их индивидуальные pI охватывают весь диапазон значений pH . Это позволяет сформировать градиент pH с любыми заданными крайними значениями.

ЭЛЕКТРОФОКУСИРОВКА В КОЛОНКАХ



Компоненты смеси разделяются в градиенте pH в соответствии с различиями в pI .

Образец вносится в виде зоны, либо смешивается по всей колонке.

Градиент pH возникает при наложении электрического поля на амфолиты.

Заряженные компоненты образца мигрируют к противоположно заряженному электроду. Когда величина pH оказывается равной pI , движение компонента смеси прекращается. В результате образуются узкие зоны.

Применение изоэлектрического фокусирования:

Чаще всего этот вид электрофореза используют для разделения в один прием смесей белков с очень близкими физико-химическими свойствами:

Например: изоферментов (различия pI между разными изоформами могут составлять всего 0,02 ед. pH).

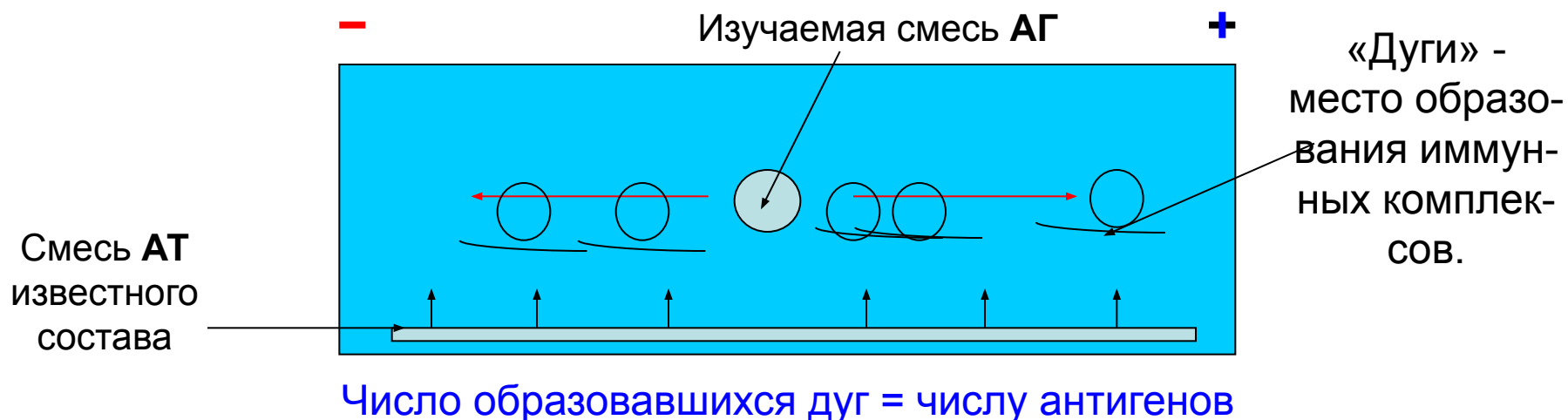
Иммуноэлектрофорез

Метод сочетает в себе электрофорез и иммунодиффузию.

Служит для качественного и количественного анализа смесей различных антигенов.

1. Формируют пластину из 2% агарового геля. В центре пластины – гнездо для внесения смеси антигенов; вдоль длинного края пластины формируют желобок для внесения антител.
2. В гнездо в центре пластины вносят смесь антигенов и проводят электрофорез. При этом часть антигенов идут к катоду, а часть - к аноду. Продолжительность около 90 мин.

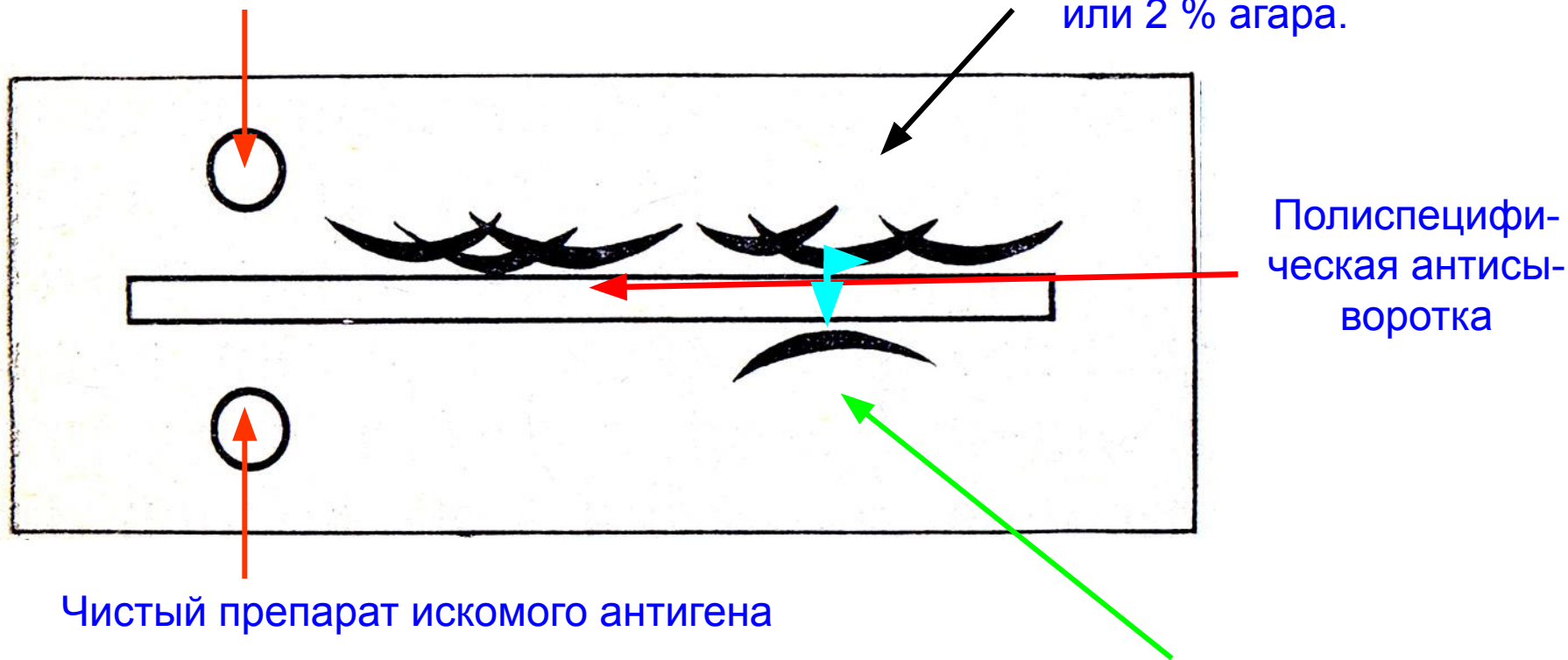
3. В желобок, расположенный вдоль пластины геля, вносят смесь антител. Возможность обнаружить определенные антигены в изучаемой смеси определяется составом смеси антител. Происходит диффузия (16-24 час.) антител в толщу геля, где они встречают (или не встречают) свои антигены. Происходит реакция преципитации. Её результат наблюдают визуально: образуются «дуги» на месте взаимодействия (встречи) АГ+АТ. Каждый из антигенов образует «дугу» независимо от других.



Идентификация дуги преципитации, относящейся к определенному антигену

Исследуемая смесь антигенов

Пластика геля из 1 % агарозы
или 2 % агара.



1. Электрофорез антигенов.

2. Внесение полиспецифической антисыворотки в центральную канавку и диффузия.

3. Простая суперпозиция дуг преципитации показывает ту из них, которая соответствует искомому антигену.