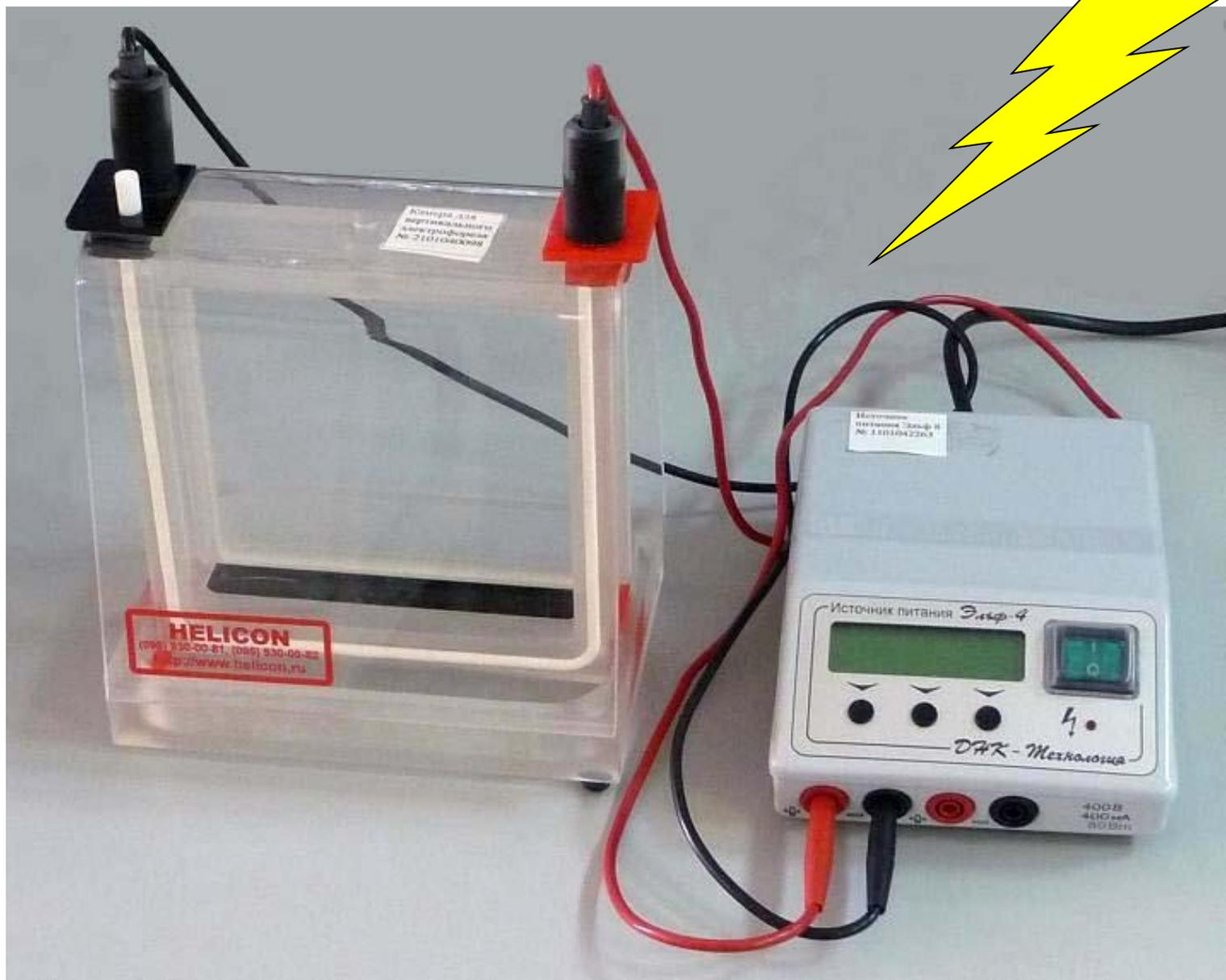


# ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (аналитический)



**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)

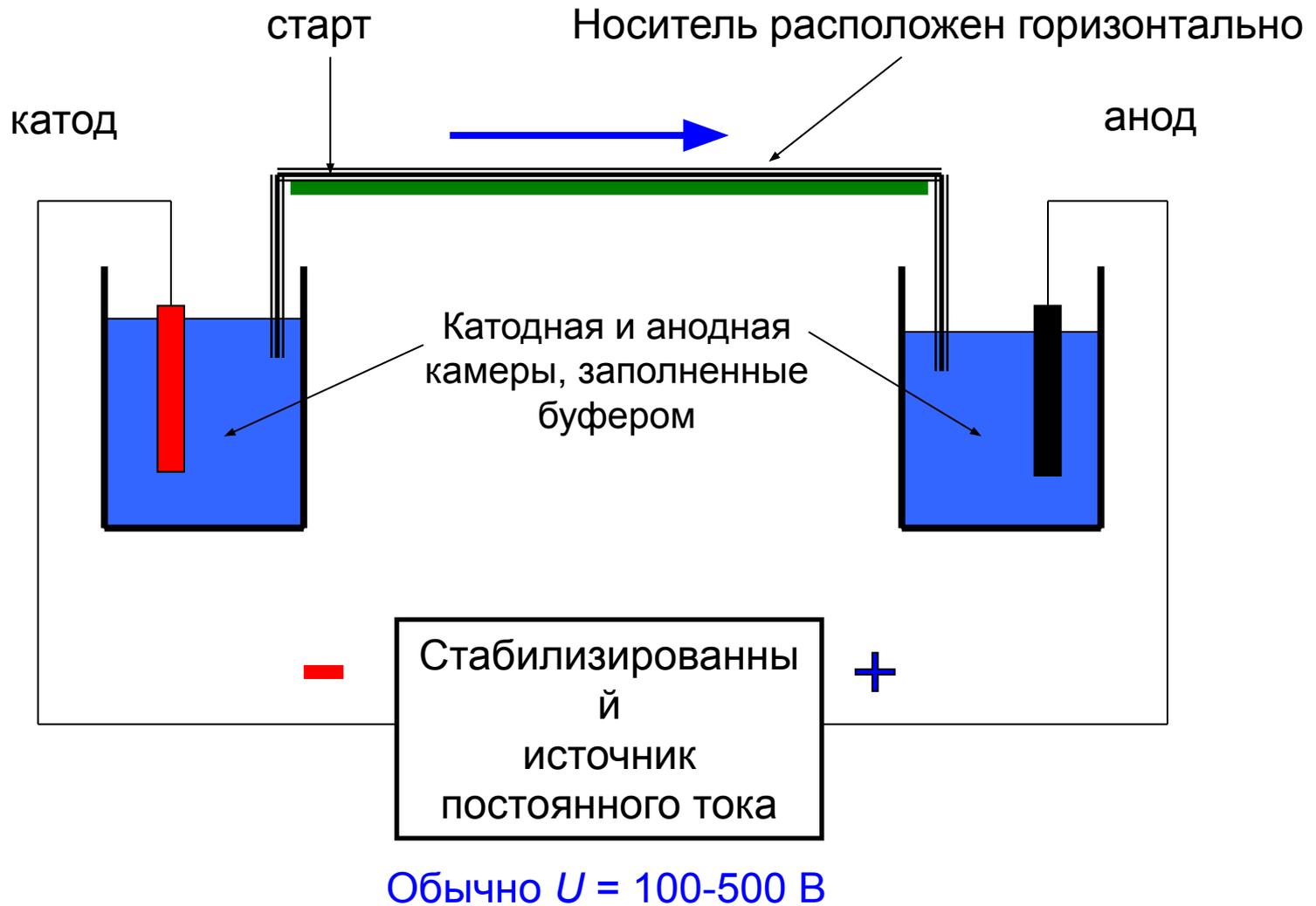
**η** - вязкость среды

**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 хромато-  
графическим методам

# Диск-электрофорез (Дэвис, 1959)

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

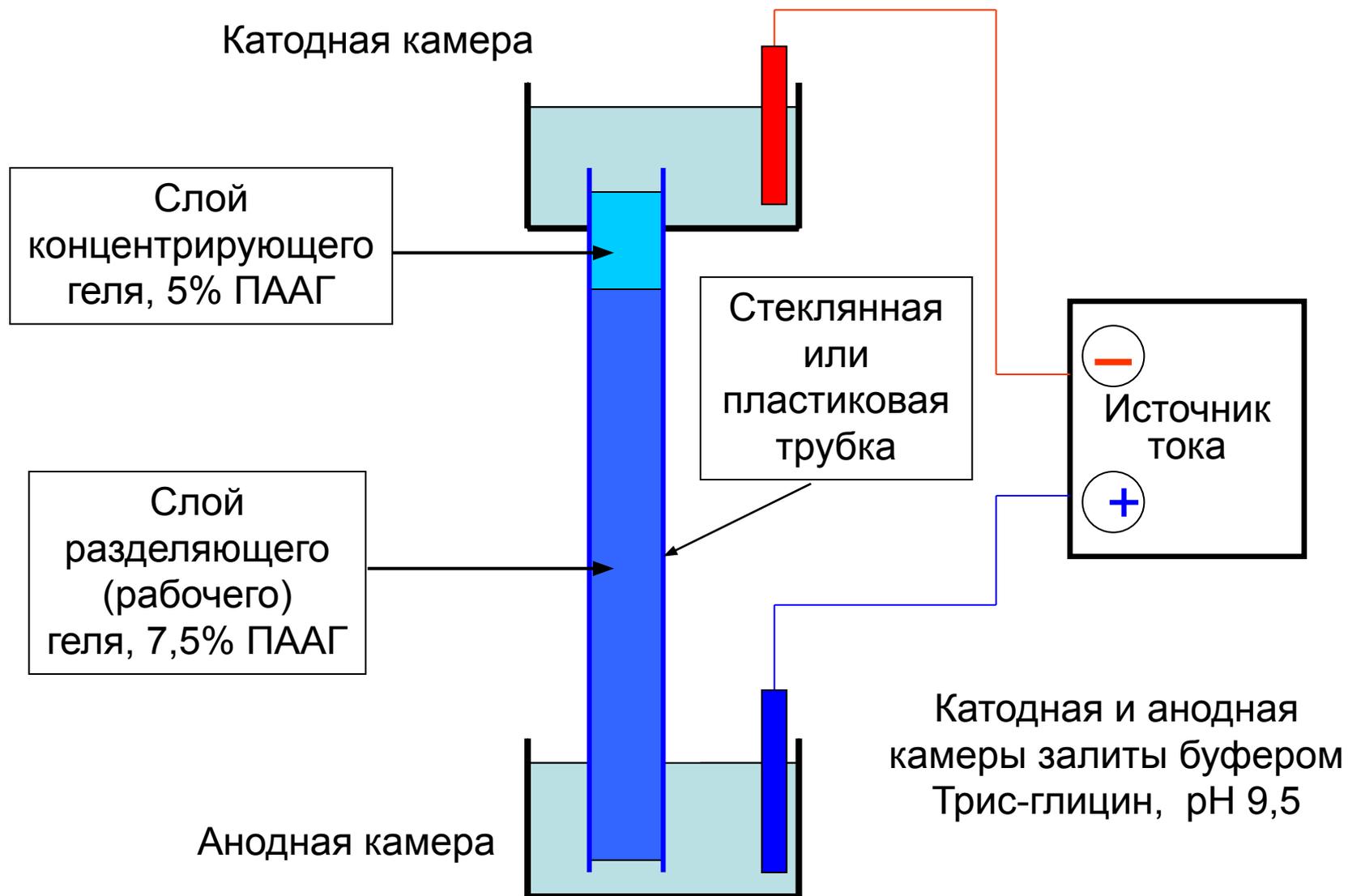
Формируется гель, в минимальном варианте состоящий из двух слоёв: **концентрирующий гель** и **разделяющий (рабочий) гель** (разная %-концентрация акриламида). В **концентрирующий гель** (низкая концентрация, крупнопористый) вносят разделяемую смесь. Это позволяет смеси войти в разделяющий гель в виде 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).

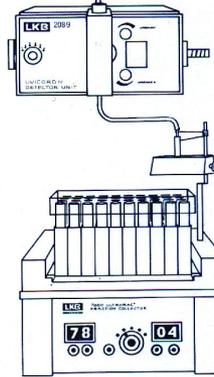
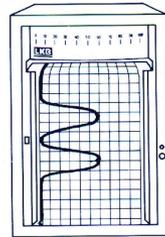
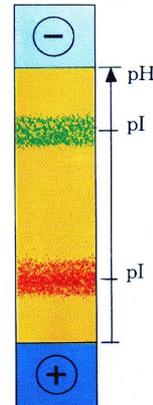
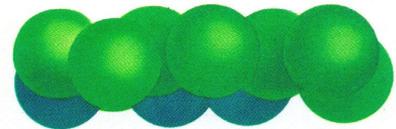
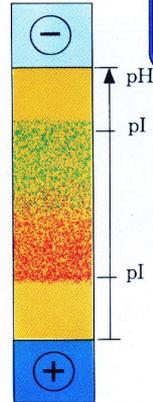
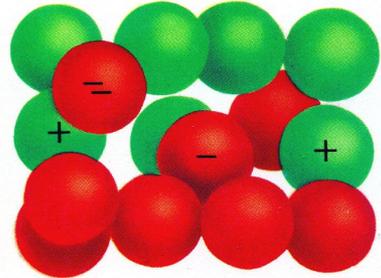
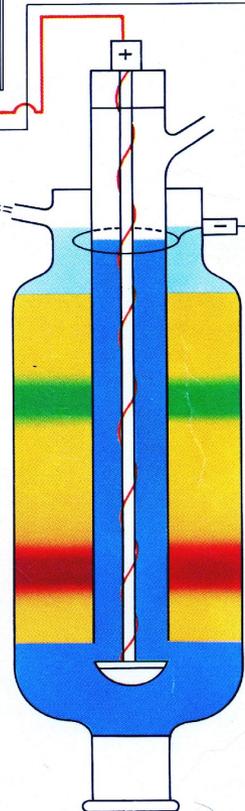
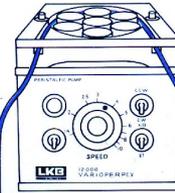
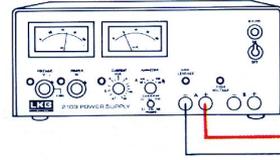
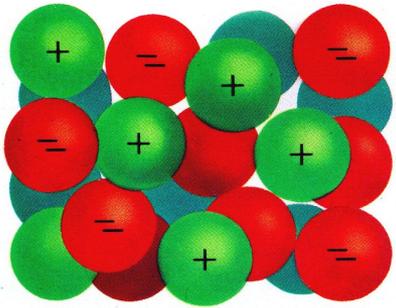
# Изоэлектрическое фокусирование

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 рН в соответствии с различиями в  $pI$ .

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

Градиент рН возникает при наложении электрического поля на амфолиты.

Заряженные компоненты образца мигрируют к противоположно заряженному электроду. Когда величина рН 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.  $pH$ ).

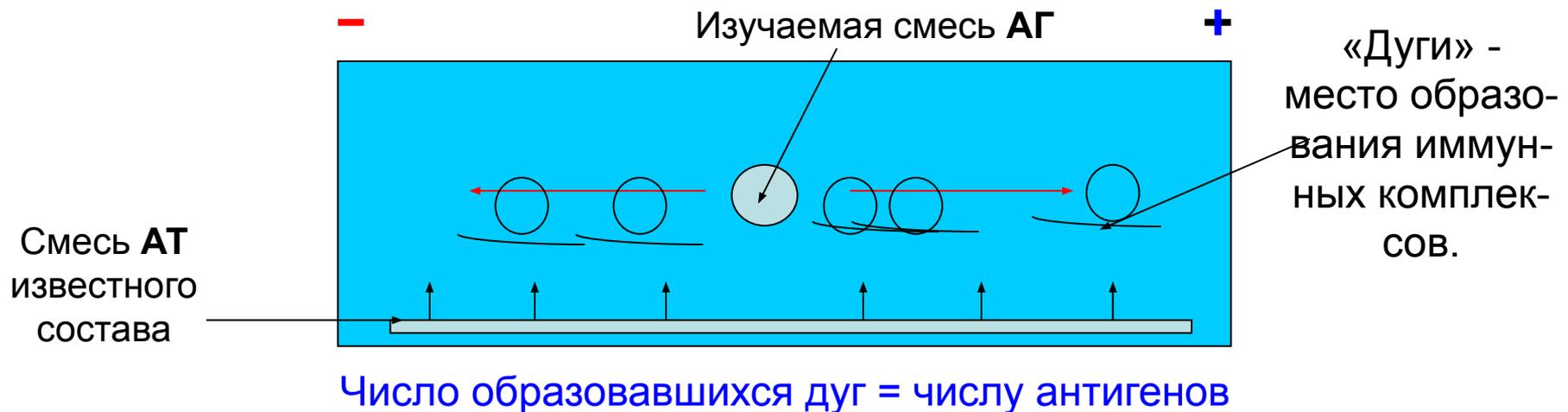
# **Иммуноэлектрофорез**

**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.**

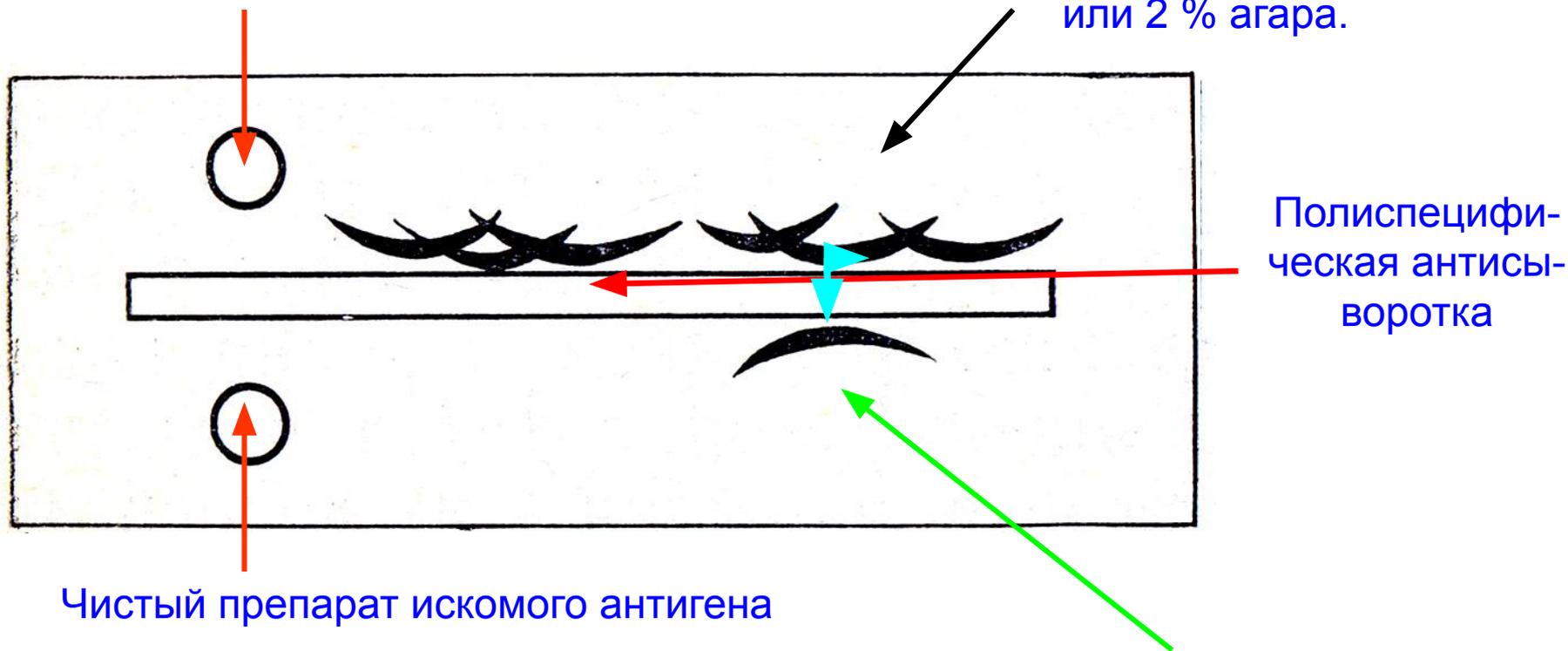
3. В желобок, расположенный вдоль пластины геля, вносят смесь антител. Возможность обнаружить определенные антигены в изучаемой смеси определяется составом смеси антител. Происходит диффузия (16-24 час.) антител в толщу геля, где они встречают (или не встречают) свои антигены. Происходит реакция преципитации. 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.