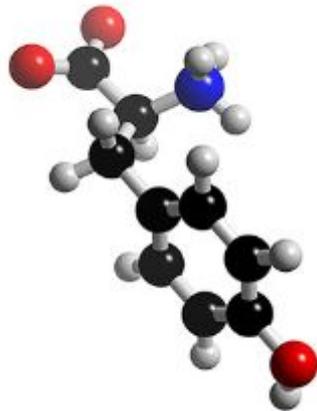
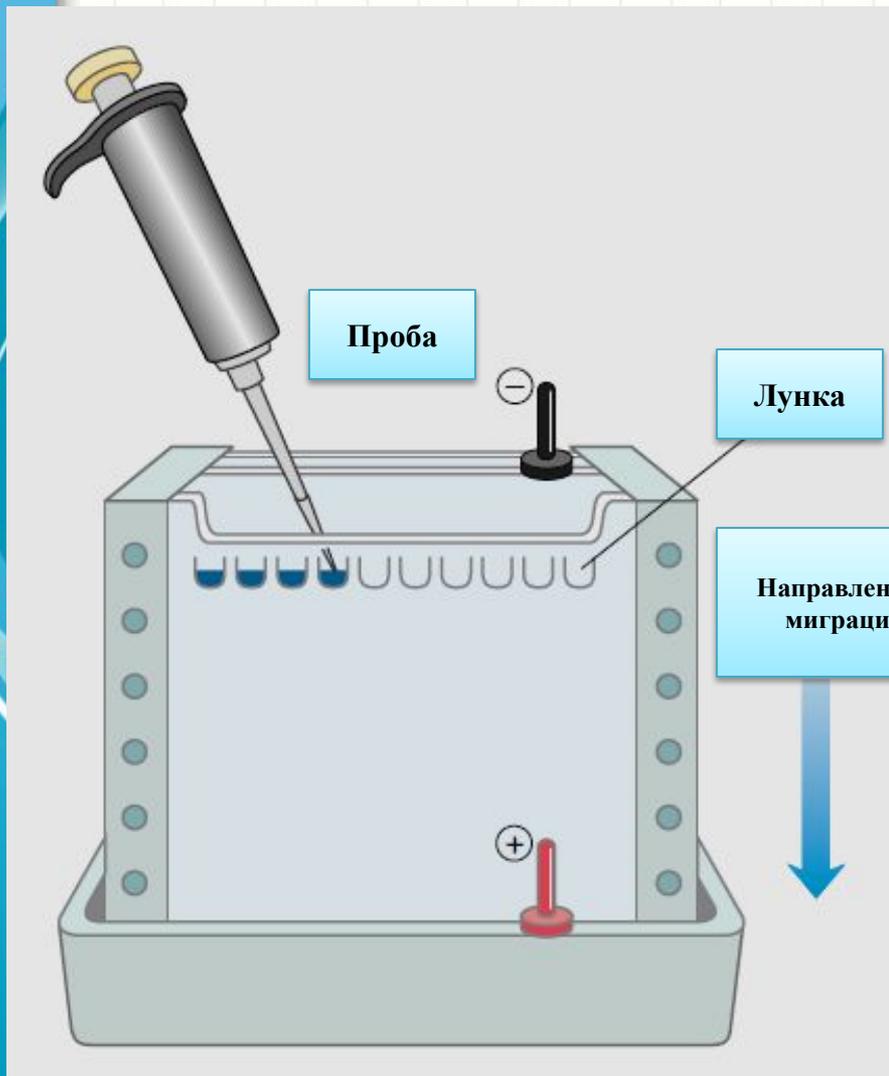


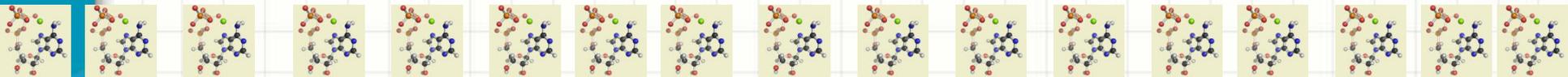
# ЭЛЕКТРОФОРЕЗ



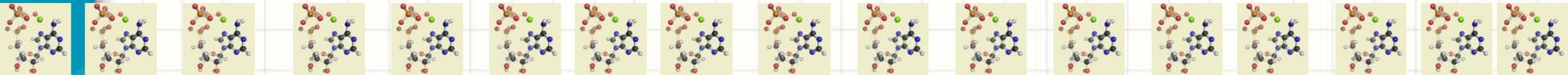
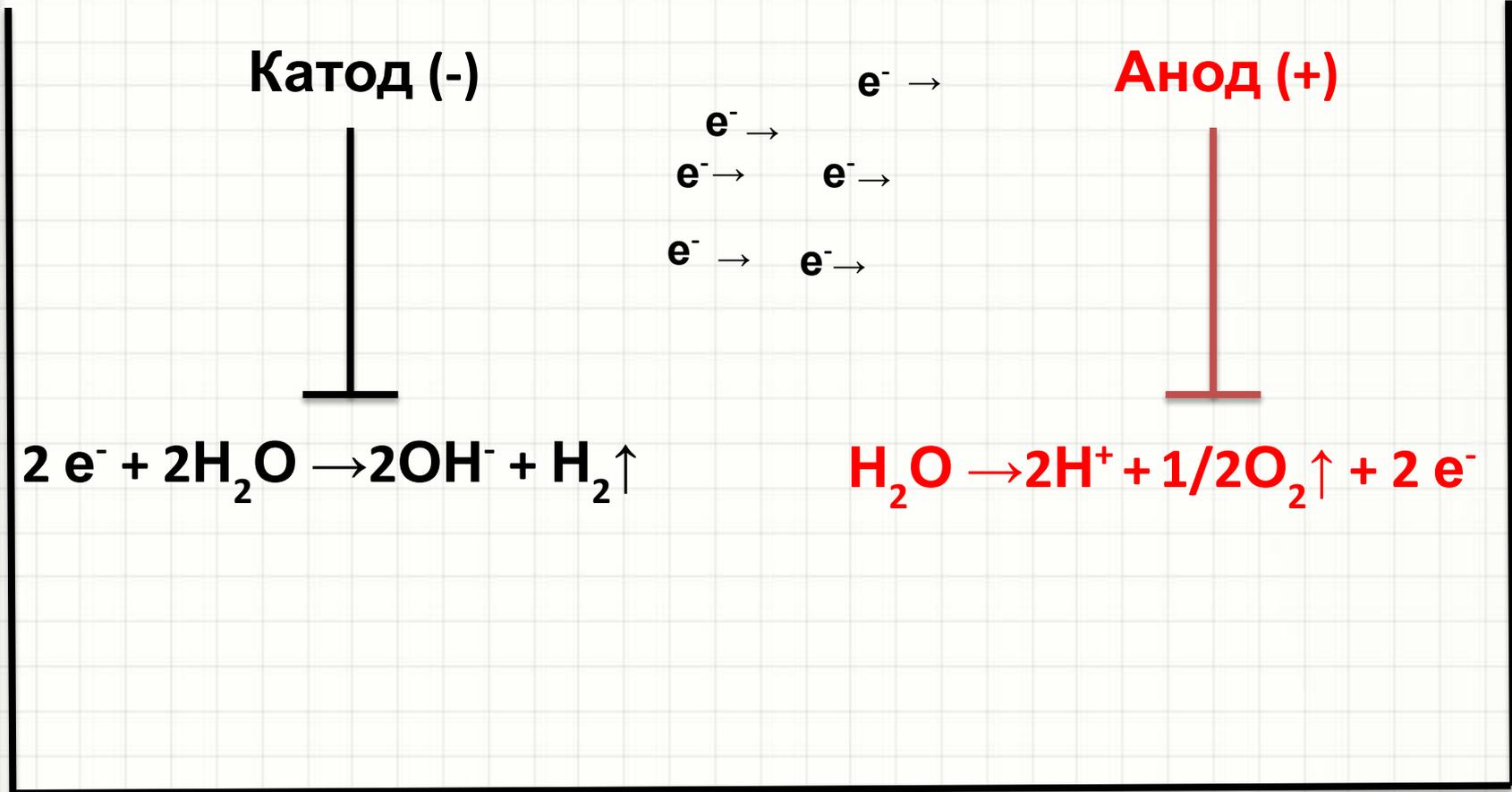


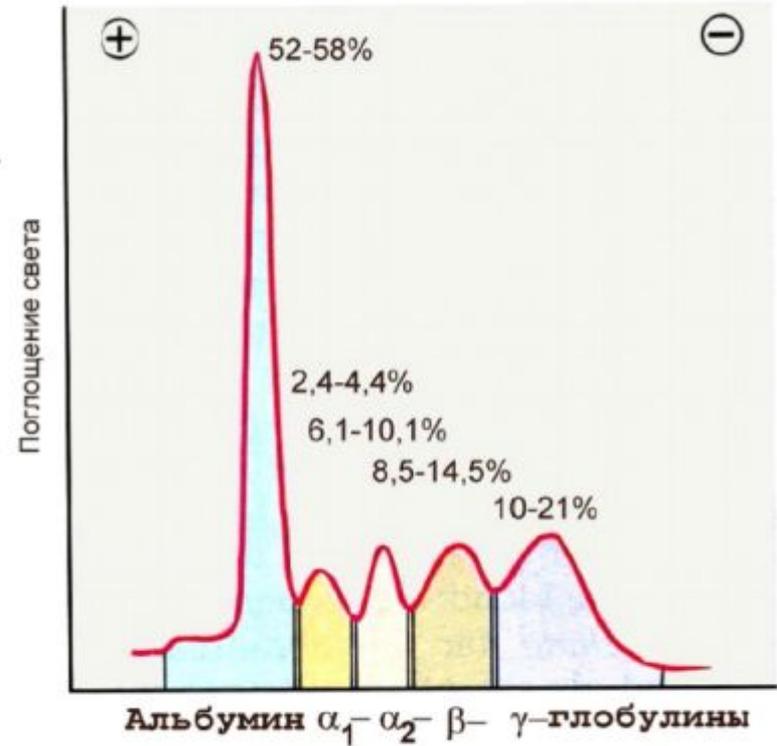
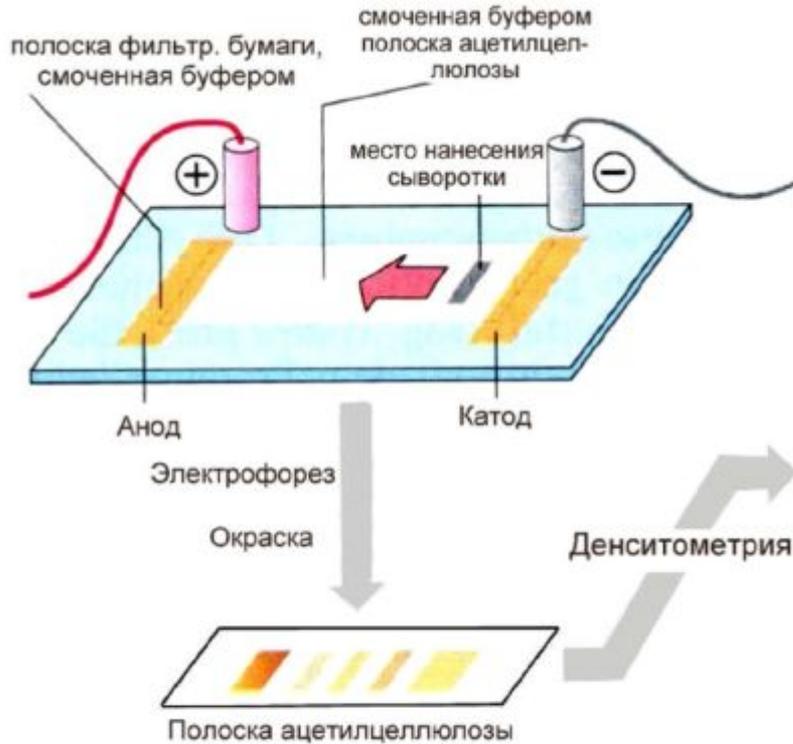
1. Многие важные в биологическом отношении молекулы, такие как аминокислоты, пептиды, белки содержат ионизирующиеся группы, поэтому в растворе они могут существовать в заряженной форме, в виде катионов (+) либо анионов (-).
2. Молекулы с близкими по величине зарядами, но различающимися молекулярными весами отличаются друг от друга отношением заряда к массе.
3. Принцип электрофореза основан на разделении ионов при движении их в растворе под действием электрического поля.

Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле

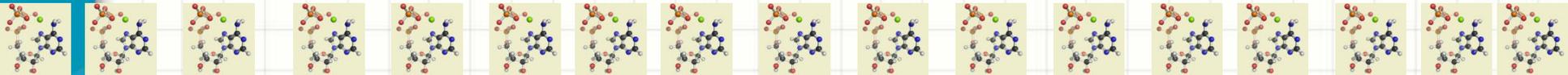


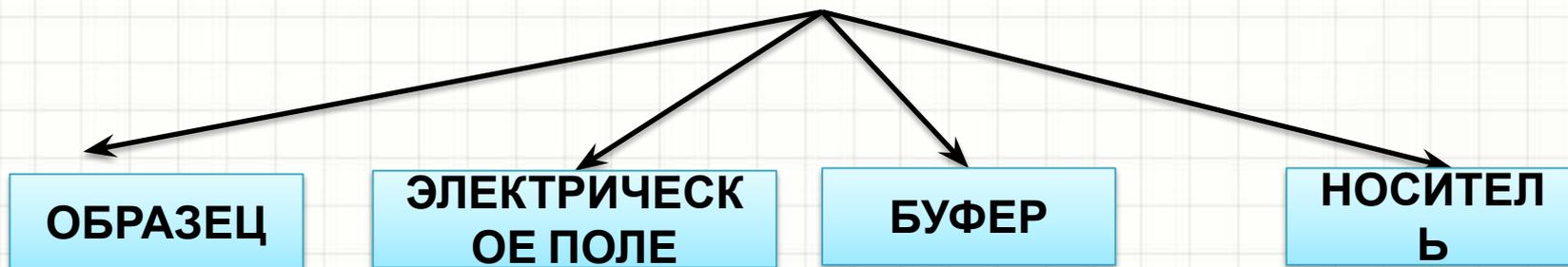
1. В растворе между электродами ток обусловлен ионами буфера и образца, а в остальной части цепи электронами.
2. Ток в цепи поддерживается за счет электролиза, происходящего на электродах, каждый из которых погружен в большую буферную камеру.





Электрофорез белков сыворотки крови



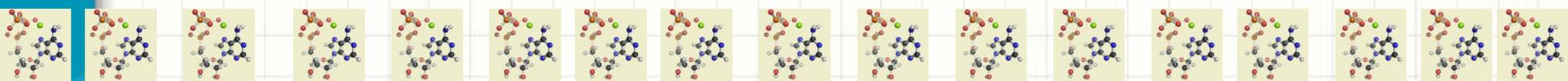


- 1. Заряд
- 2. Размеры
- 3. Форма

- 1. Сила тока
- 2. Напряжение
- 3. Сопротивление

- 1. Состав буфера
- 2. Концентрация буфера

- 1. Адсорбция
- 2. Электроосмос
- 3. Молекулярное сито

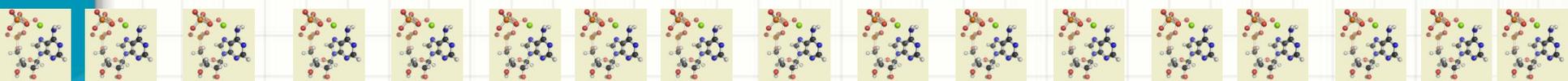


# ОБРАЗЕЦ

**Заряд.** Подвижность возрастает с увеличением суммарного заряда. Величина заряда обычно зависит от рН.

**Размеры.** Чем крупнее молекулы, тем меньше их подвижность; это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров.

**Форма.** Молекулы одинакового размера, но различной формы, например фибриллярные и глобулярные белки, обладают разной подвижностью; это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии.

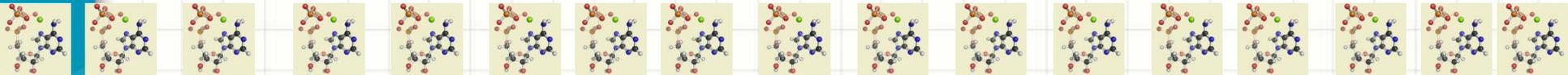


Согласно закону Ома, сила тока  $I$  (в амперах), напряжение  $V$  (в вольтах) и сопротивление  $R$  (в омах) связаны следующим соотношением:  $I = V/R$ . На разделение ионов в электрическом поле влияют все три фактора.

**Сила тока.** Поскольку ток в растворе между электродами обусловлен исключительно переносом ионов буфера и образца, скорость их перемещения прямо пропорциональна силе тока. Длина пути, пройденного ионами, будет пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза не должна меняться. Само собой разумеется, что ток должен быть постоянным.

**Напряжение.** Оно связано с силой тока приведенным выше соотношением; отсюда следует, что скорость миграции пропорциональна падению напряжения в поддерживающей среде, или градиенту напряжения, обычно выражаемому в В-см<sup>-1</sup> (приложенное напряжение, деленное на длину слоя носителя). Используются как низкие (100—500 В), так и высокие (500—10 000 В) напряжения с градиентами до 20 и 200 В-см<sup>-1</sup> соответственно. По причинам, которые будут разъяснены позднее (разд. 4.1.1), высокие напряжения применяют в основном для разделения низкомолекулярных веществ.

**Сопротивление.** Скорость миграции обратно пропорциональна сопротивлению, которое в свою очередь зависит от типа и размеров носителя и от ионной силы буфера. Сопротивление возрастает с увеличением длины слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов.

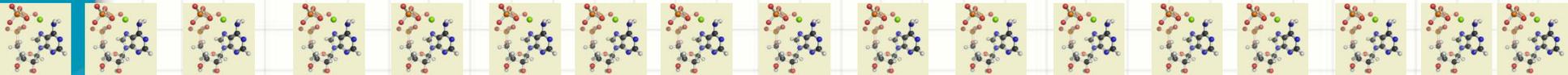


Буфер создает и стабилизирует рН носителя, а также самым различным образом влияет на скорость миграции веществ.

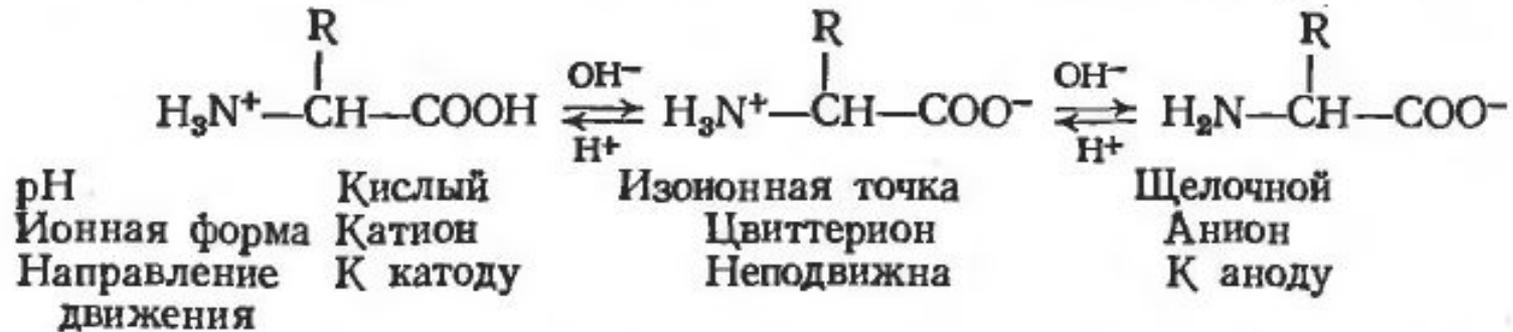
**Состав буфера.** Наиболее широко применяемые буферы — формиатный, ацетатный, цитратный, вероналовый, фосфатный, трис, ЭДТА и пиридиновый. Для разделения углеводов часто используют боратные буферы, преимущество которых заключается в том, что они образуют с углеводами заряженные комплексы.

**Концентрация буфера.** По мере увеличения ионной силы буфера компонент тока, обусловленный переносом ионов буфера, будет возрастать, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, уменьшаться. Таким образом, скорость миграции образца уменьшится. При высокой ионной силе буфера суммарный ток увеличивается, а следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла.

При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. Таким образом, миграция образца ускоряется. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая способность хуже, чем при высокой ионной силе.



С ростом рН ионизация органических кислот возрастает, а оснований, наоборот, уменьшается, и, следовательно, меняется их электрофоретическая подвижность. На такие соединения, как аминокислоты, обладающие как кислотными, так и основными свойствами (амфолиты), рН оказывает двойное действие (разд. 1.2.3).



Таким образом, скорость и направление движения амфолитов зависят от рН, и для их разделения можно использовать буферы с диапазоном рН от 1 до 11.

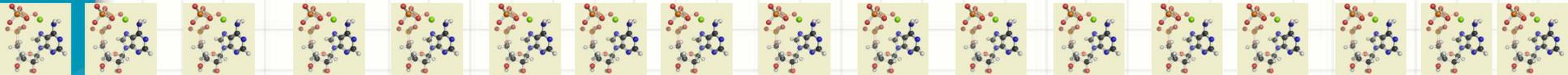
В качестве носителей используют относительно инертные вещества, однако их состав все же не безразличен для подвижности разных веществ, и выбор соответствующей среды зависит поэтому от природы образца.

**Адсорбция.** Адсорбция — удерживание молекул образца носителем, как при адсорбционной хроматографии. Это приводит к размыванию пятен на хроматограмме, в результате чего образец движется не в виде четкой полосы, а имеет вид кометы; разрешающая способность метода при этом уменьшается. Адсорбция приводит также к уменьшению скорости миграции. Наибольшей способностью к адсорбции обладает бумага, однако это нежелательное ее свойство удается устранить, если использовать ацетат целлюлозы.

**Электроосмос** (электроэндосмос), это явление обусловлено возникновением относительного заряда между молекулами воды буферного раствора и поверхностью носителя. Ионизация групп носителя и поверхностная адсорбция ионов буфера обычно приводит к образованию из молекул воды ионов гидроксония ( $H_3O^+$ ). Так как эти ионы заряжены положительно, они движутся к катоду, захватывая растворенные нейтральные вещества и убыстряя движение катионов; скорость движения анионов при этом падает. Обычно данными эффектами можно пренебречь, однако, если определяют изоэлектрическую точку вещества, нужно вводить соответствующую поправку. Как правило, это делают, следя за движением электрически нейтральных соединений, таких, как мочевины или глюкоза.



**Молекулярное сито.** Свойствами молекулярного сита обладает применяемый в геле-электрофорезе полужесткий носитель (гель); такие его свойства способствуют разделению смесей заряженных макромолекул, например белков, которые различаются не только по электрофоретической подвижности, но также формой и размерами. Гели состоят из беспорядочно переплетающихся молекулярных цепей, распределенных по всему объему геля и образующих ситоподобную структуру. В соответствии с конкретными требованиями разделения размер пор гелей можно варьировать в некоторых пределах. Принцип действия молекулярного сита в агаровом, крахмальном и полиакриламидном гелях заключается в том, что крупные молекулы движутся сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор, который определяется числом поперечных сшивок в геле. При использовании гелей типа сефадекса ситуация обратная.



1. Оборудование, необходимое для электрофореза, состоит в основном из двух частей: **источника питания** и собственно **электрофоретического блока**.
2. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе.
3. Для работы с низким напряжением применяются источники питания с выходным напряжением **до 500 В** и силой тока **до 150 мА**, которые обеспечивают либо постоянное напряжение, либо постоянную силу тока.
4. В электрофоретический блок входят **электроды, буферные камеры, опора для носителя** и **прозрачная изолирующая крышка**



✓ **Вертикальный электрофорез**

Позволяют проводить разделение белков и ДНК с высоким разрешением.

✓ **Двумерный гель-электрофорез (2D) и изоэлектрическое фокусирование**

✓ **Горизонтальный электрофорез**

Позволяют проводить разделение белков и ДНК

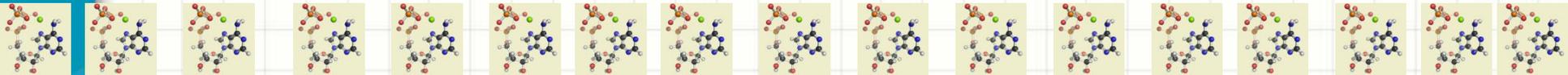
✓ **TGGE гель-электрофорез с температурным градиентом**

В настоящее время основная область применения гель-электрофореза с температурным градиентом - скрининг мутаций и анализ микробных популяций, гетеродуплексный анализ, изучение метилирования ДНК, анализ вторичной структуры РНК, изучение белок-белковых взаимодействий и анализа термостабильности белков.

✓ **Электрофорез в пульсирующем поле**

Идеальное решение для разделения высокомолекулярной ДНК

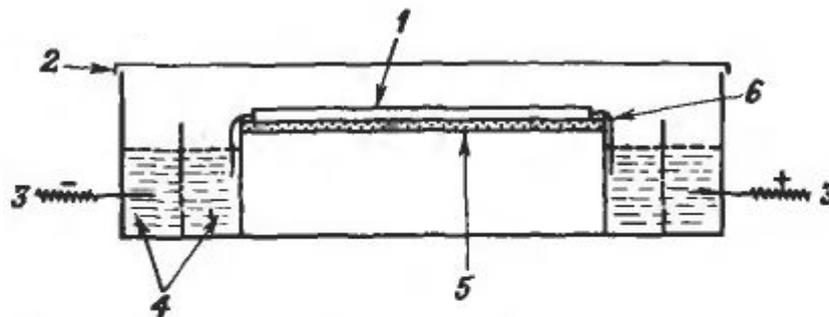
✓ **Иммуноэлектрофорез**



# ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

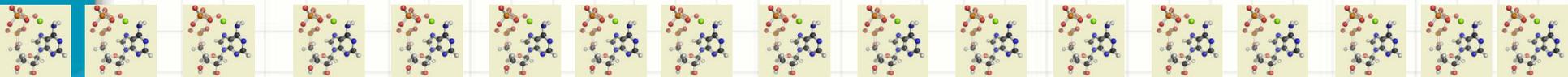
3

- ✓ Насыщенный буфером носитель, на который нанесен образец, обычно располагают горизонтально (горизонтальный электрофорез) на плоской поверхности изолирующего материала, например плексигласа.
- ✓ При горизонтальном электрофорезе разделение можно проводить на бумаге, ацетате целлюлозы, в гелевых пластинах и в тонком слое, хотя работа с тонкими слоями при более высоких напряжениях требует применения металлических охлаждающих пластин, как при высоковольтном электрофорезе



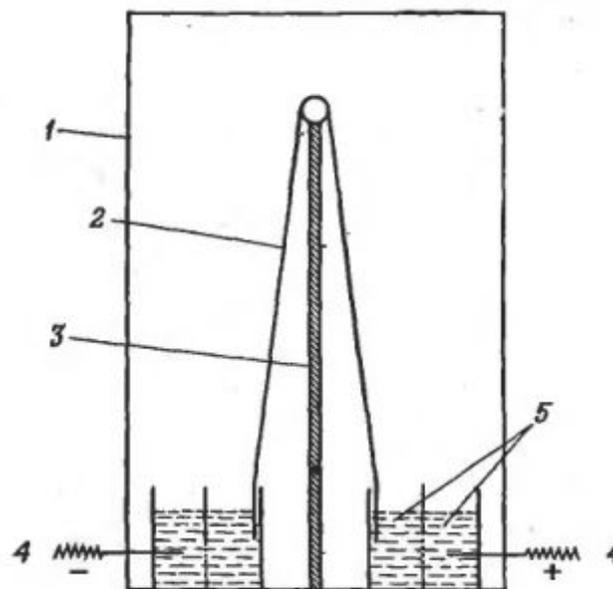
Прибор для горизонтального электрофореза.

1 — носитель; 2 — крышка; 3 — электрод; 4 — отсеки буферной камеры; 5 — изолирующая пластина; 6 — фитиль-мостик.

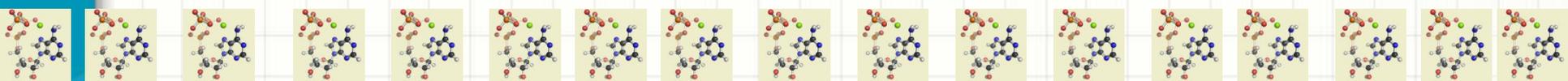


# ВЕРТИКАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

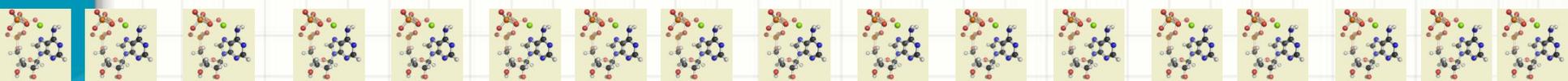
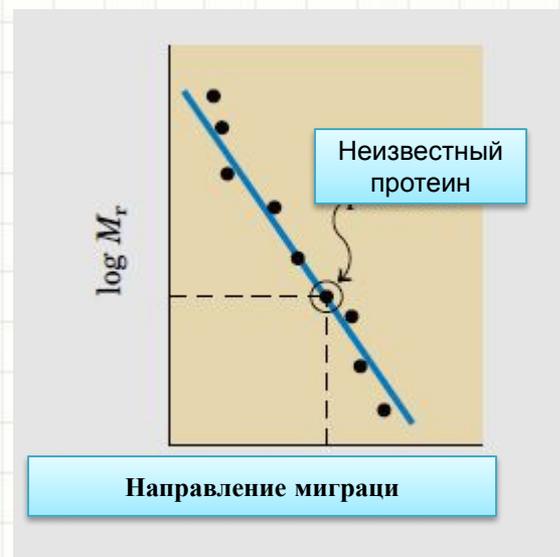
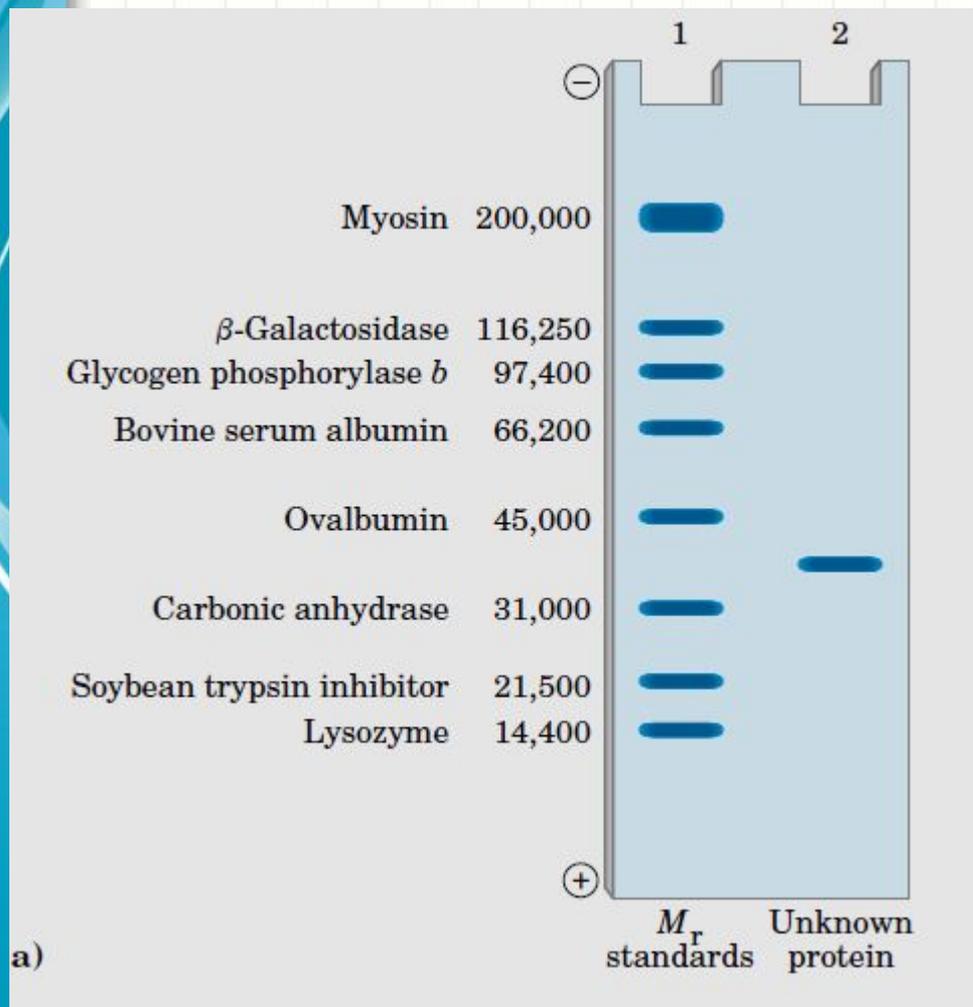
- ✓ Насыщенный буфером носитель, на который нанесен образец, обычно располагают вертикально (вертикальный электрофорез) на вертикальной поверхности изолирующего материала, например плексигласа.
- ✓ При вертикальном электрофорезе разделение как правило проводят в полиакриламидном геле.

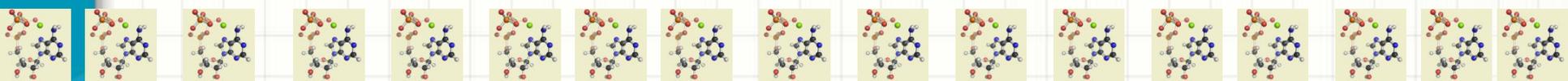
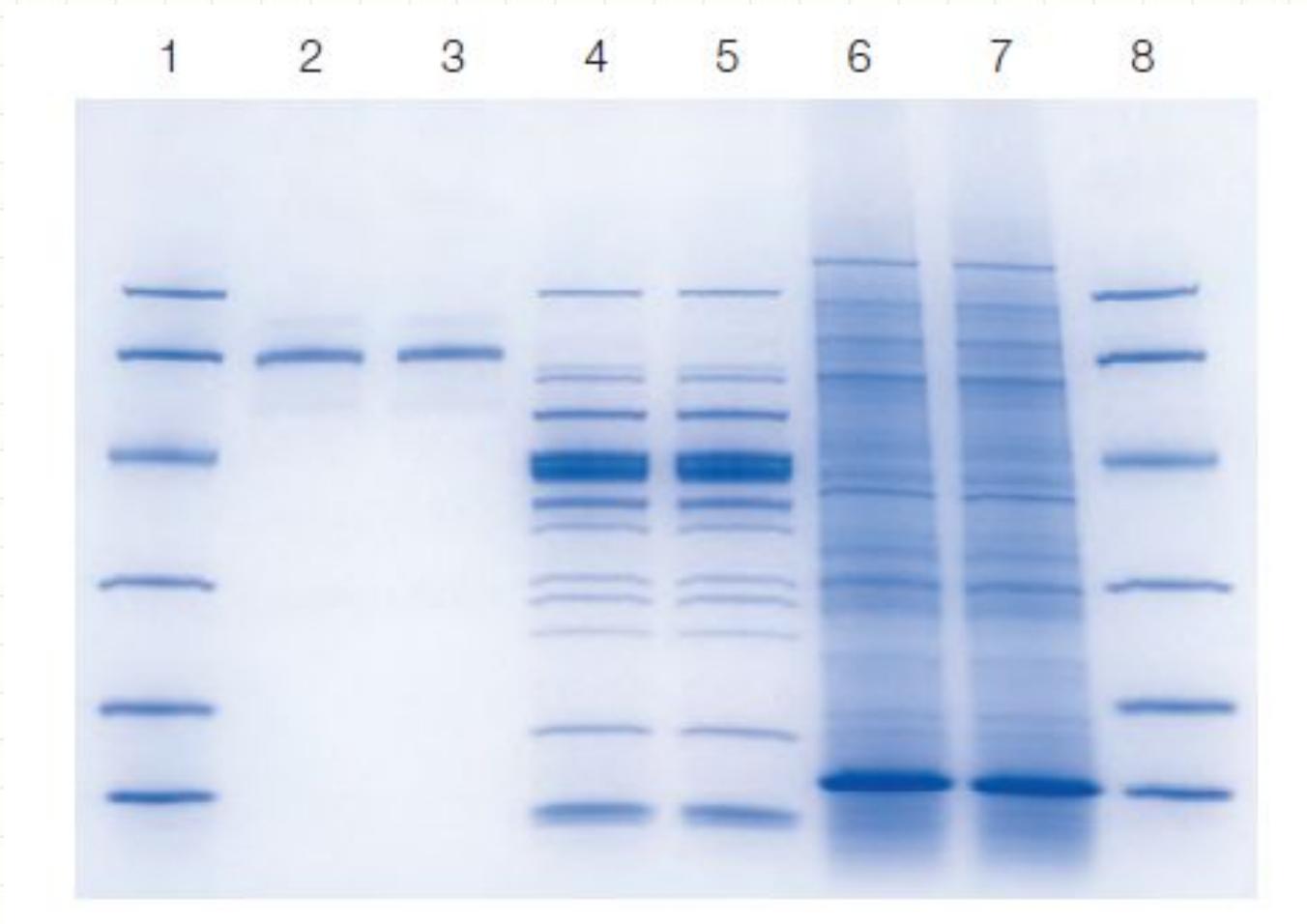


Прибор для вертикального электрофореза.  
1 — крышка; 2 — носитель (бумага); 3 — опора; 4 — электрод; 5 — отсеки буферной камеры.



## ЭЛЕКТРОФОРЕЗА





# ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЕ

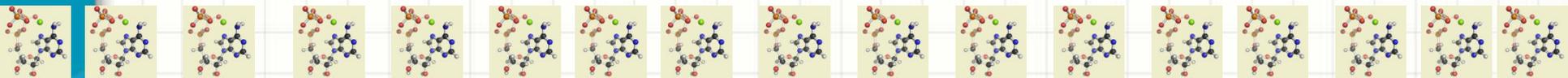
**Изоэлектрическая точка** – рН среды, при котором заряд молекулы равен нулю.

**Амфолиты (амфотерные электролиты)** – это соединения, обладающие как кислотными, так и щелочными свойствами.

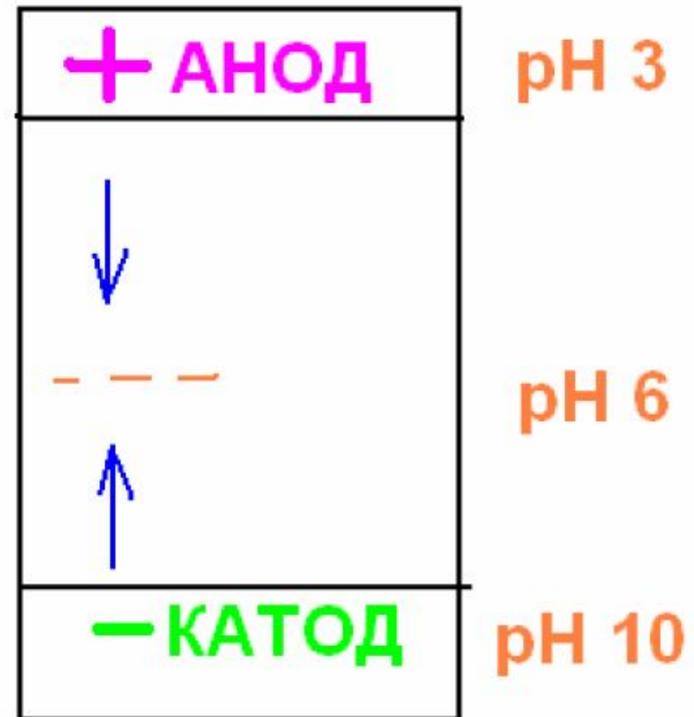
К ним относятся:

- Амфолиты-образцы – белки
- Амфолиты-носители (амфолины). Они способны создавать градиент рН.

**Полиаминополикарбоновые кислоты низкой молекулярной массы**



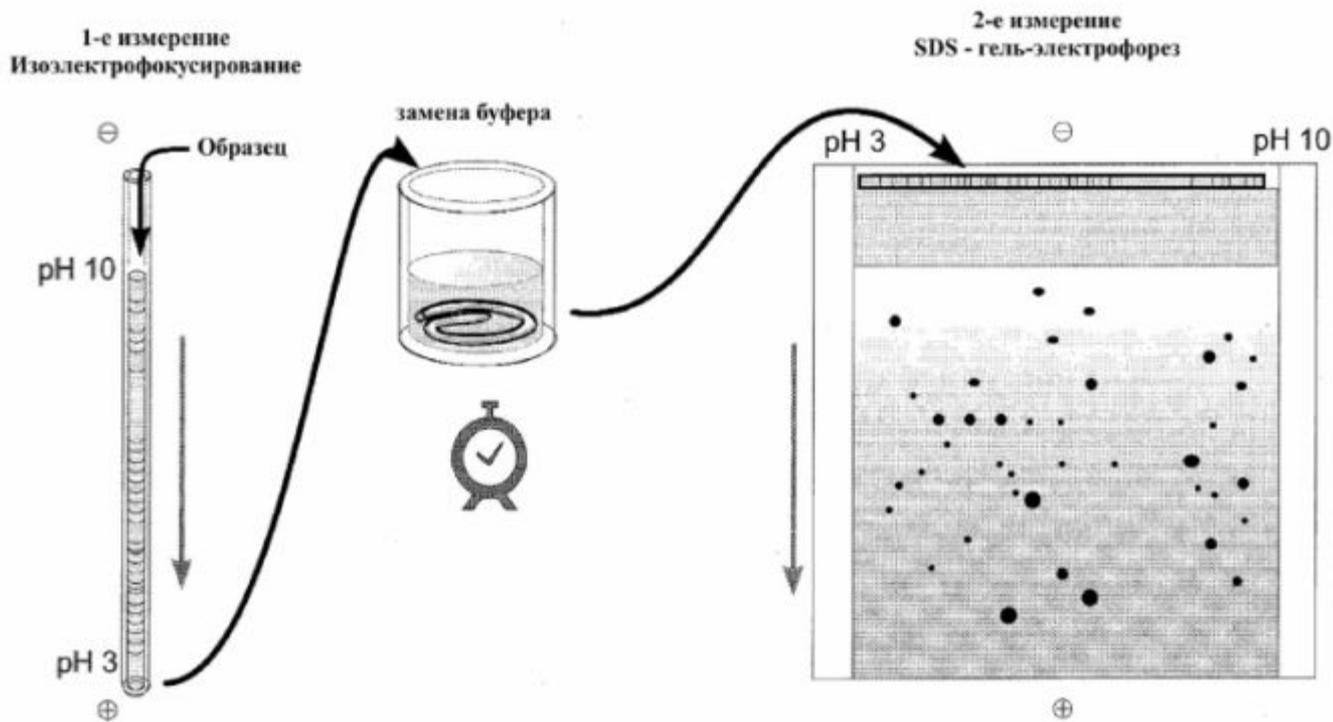
Образец распределяют по всей пластине. Молекулы белка в области рН выше его ИЭТ заряжаются отрицательно и мигрируют к аноду. И наоборот. В итоге все молекулы белка фокусируются в области его ИЭТ.

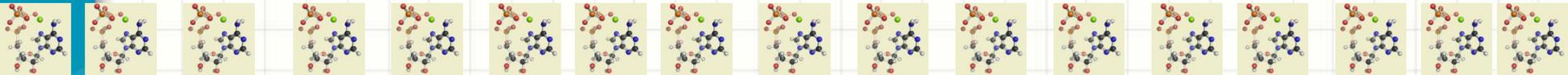
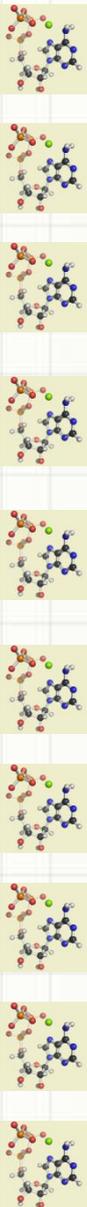
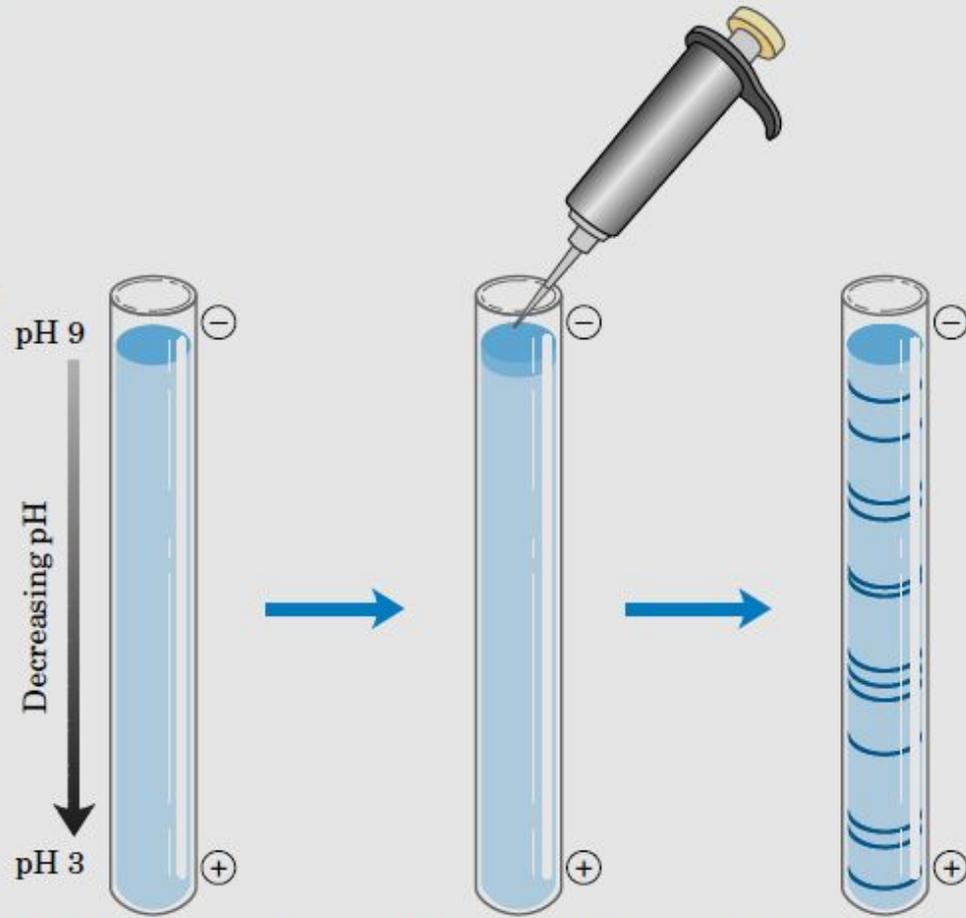


# ДВУХМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

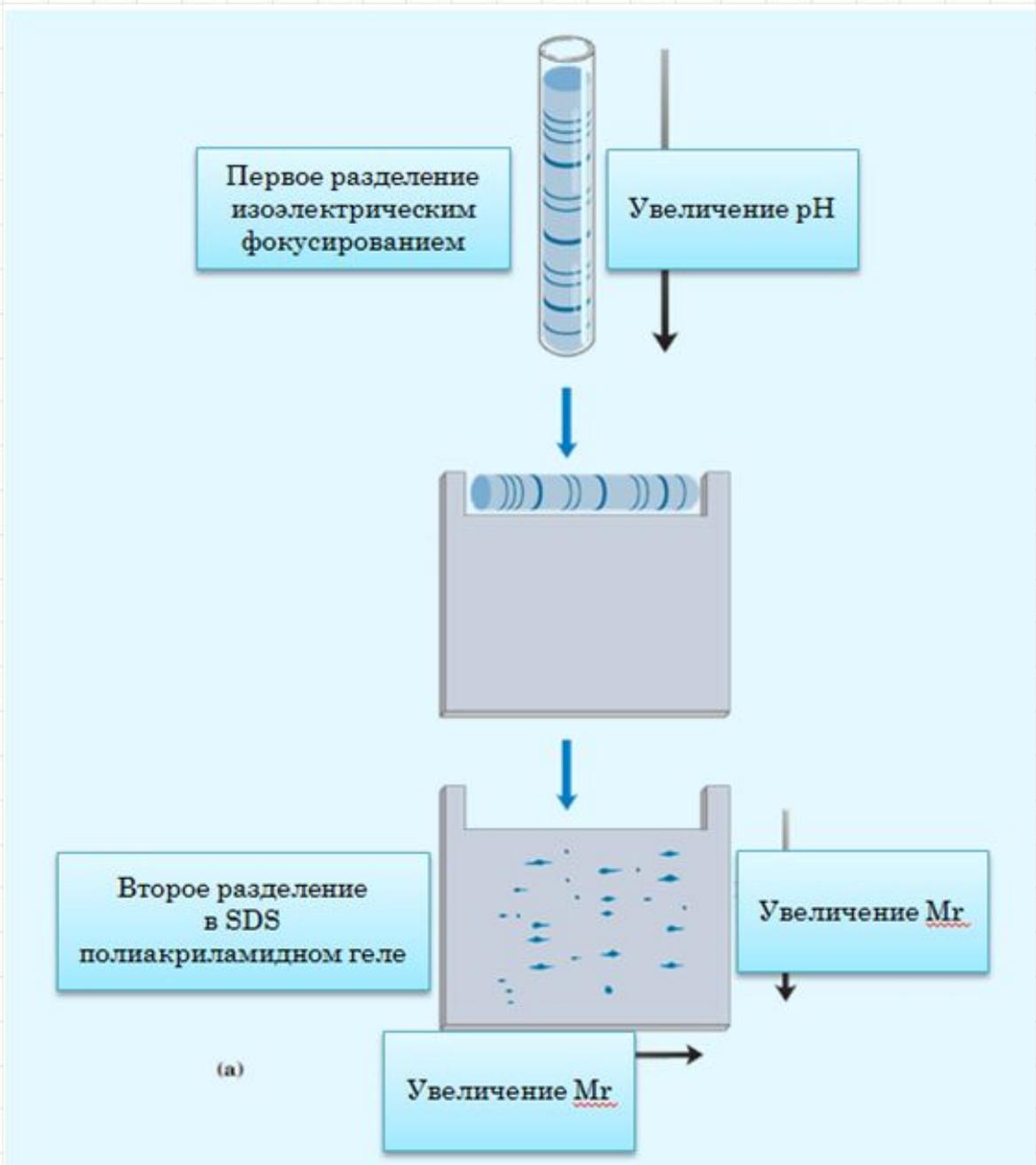
3

- 1-й этап – изоэлектрофокусирование
- 2-й этап – электрофорез в ПААГ с ДДС-Na

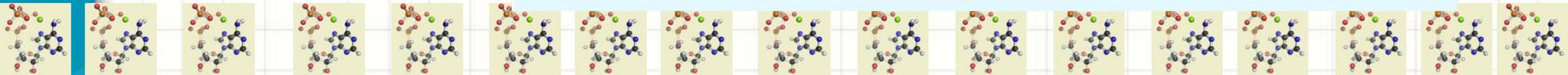




# 2-D ЭЛЕКТРОФОРЕЗ



(a)





Источник  
питания



Заливочный  
столик

Рамка



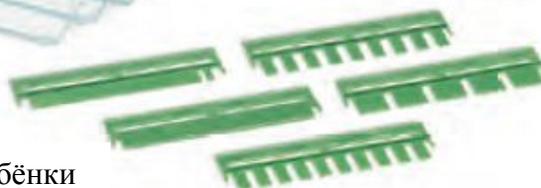
Камера



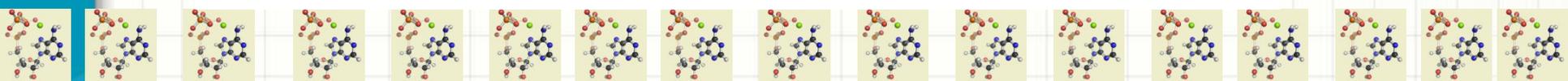
Спейсеры



Стёкла



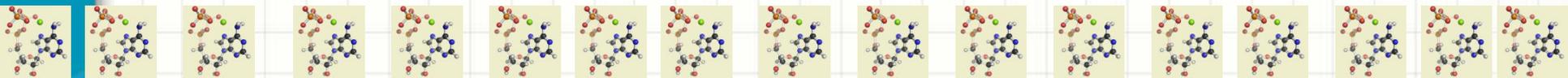
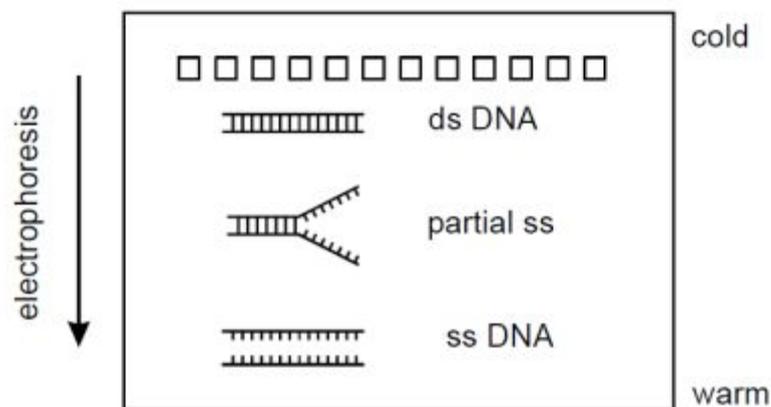
Гребёнки

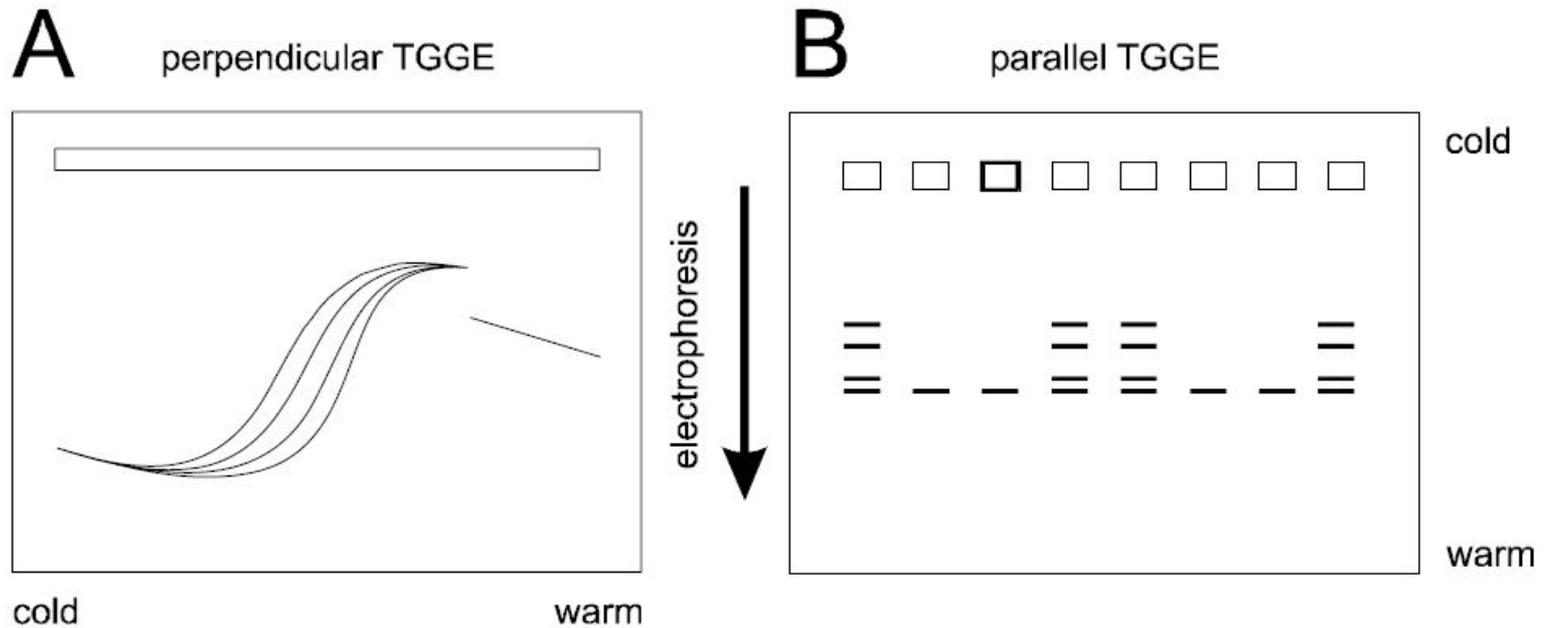


# ГЕЛЬ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ТЕМПЕРАТУРНЫМ ГРАДИЕНТОМ

3

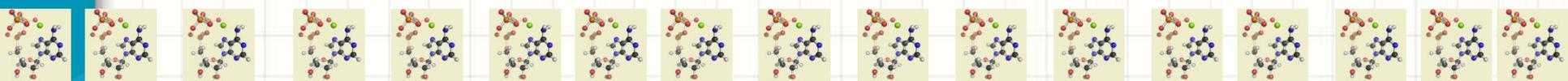
- ✓ Работа системы основана на разделении биомолекул по температурному градиенту в соответствии с их температурой плавления.
- ✓ При прохождении через температурный градиент ДНК начинает плавиться. После расхождения цепей, фрагмент одноцепочечной ДНК существенно замедляет движение в геле. Фрагменты двуцепочечной ДНК с более высокой температурой плавления продолжают движение в геле. Чем раньше цепи ДНК разойдутся, тем раньше фрагмент остановится в геле.
- ✓ Так как температура плавления ДНК зависит от состава нуклеотидов, то электрофорез в температурном градиенте позволяет разделять фрагменты ДНК одинаковой длины, но различного нуклеотидного состава.



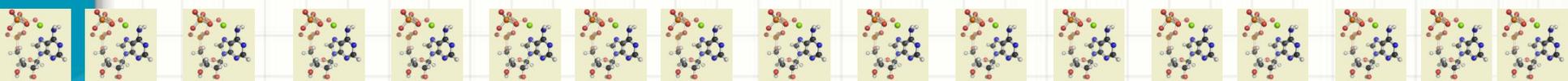


A. Перпендикулярный TGGE: для определения оптимального градиента температур для разделения образца.

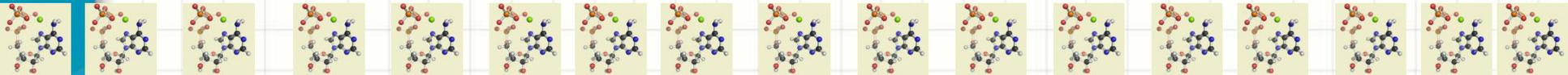
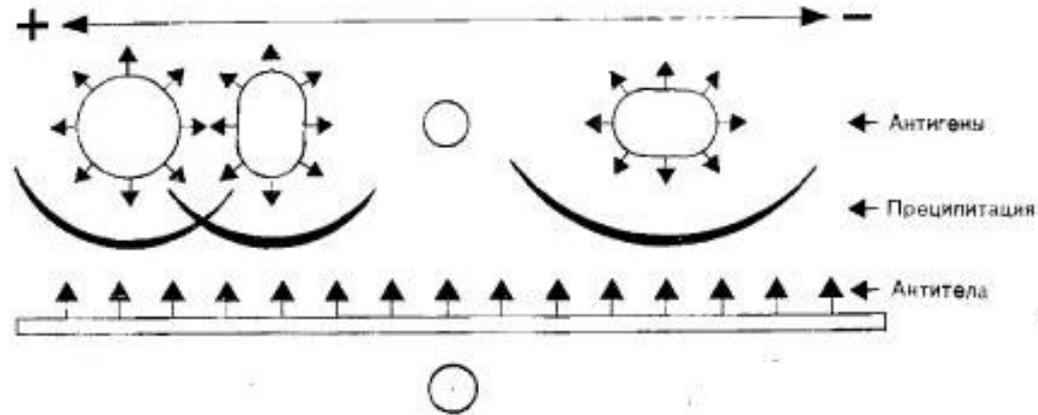
B. Параллельный TGGE: разделяется множество образцов одновременно. Применяется для рутинного разделения.

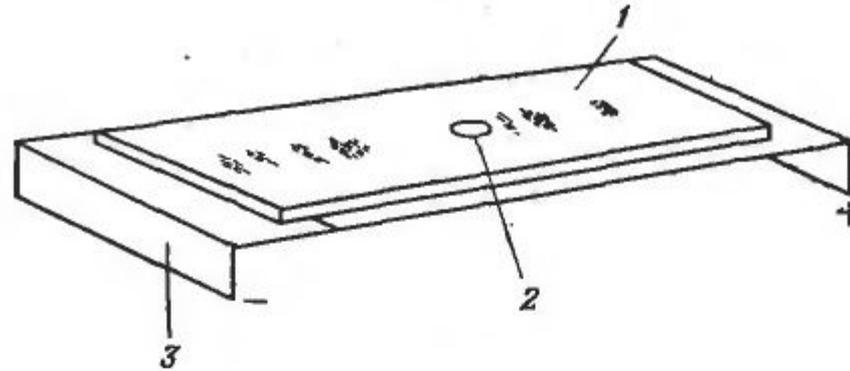


В отличие от обычных приборов для PFGE с фиксированными электродами система снабжена свободными электродами вращения. Таким образом, между периодически меняющимися направлениями электрического поля может быть установлен любой угол. Точность и высокая скорость изменения углов достигается за счет конструктивных особенностей ротора. Это преимущество системы особенно важно для разделения очень больших молекул ДНК.

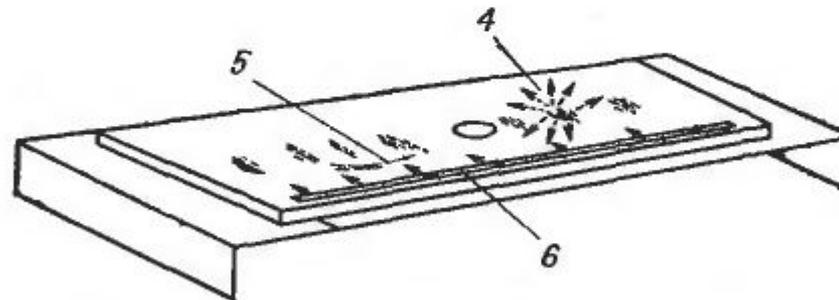


- ✓ Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) — метод исследования антигенного состава биологических материалов, сочетающий электрофорез и иммунодиффузию. Впервые описан Грабаром и Уильямсом в 1953 году, в 1965 году метод был модифицирован Шейдеггером с целью минимизации (т.н. микромодификация метода ИЭФ).
- ✓ Образец антигенного материала разделяют электрофорезом в геле (обычно агарозном), в результате чего формируются характерные зоны.
- ✓ Далее параллельно зонам электрофореза вносится **преципитирующая антисыворотка**, антигены и антисыворотка диффундируют навстречу друг к другу, и в месте встречи антисыворотки с антигеном появляются линии преципитации, имеющие форму дуги. После проведения иммунодиффузии и элюирования непреципитировавших молекул из геля гель окрашивают специальными красителями.





I. Разделение антигенов с помощью электрофореза в течение 90 мин при  $10 \text{ В}\cdot\text{см}^{-1}$



II. Диффузия и преципитация в течение 16-24 ч

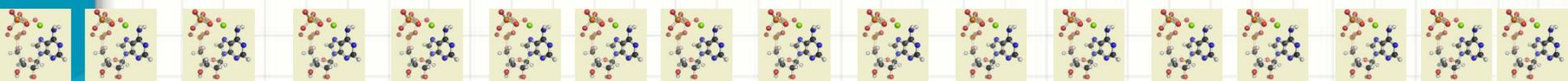
### Разделение с помощью иммуноэлектрофореза.

1 — 2%-ный (весовые проценты) агар на стеклянной пластинке; 2 — смесь антигенов; 3 — мостик-фитиль из фильтровальной бумаги, погружаемый в электродную камеру; 4 — антиген, диффундирующий радиально от места нанесения; 5 — дуга преципитации вдоль линии максимальной концентрации; 6 — желобок, в который помещают смесь антител, диффундирующих перпендикулярно направлению, в котором производился электрофорез.

Таблица 4.1

## Методы окрашивания соединений после электрофоретического разделения

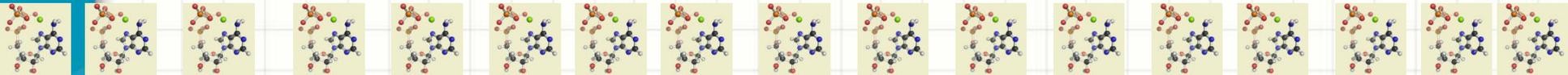
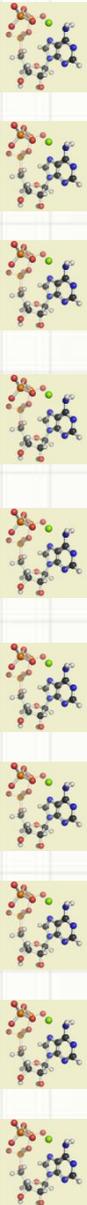
Вещество	Реактив	Примечание
Белки	Нигрозин в уксусной или трихлоруксусной кислоте <sup>1</sup>	Очень чувствительный
	Бромфеноловый синий — ZnSO <sub>4</sub> — уксусная кислота <sup>2</sup>	Количественный
	Лиссамин зеленый в уксусной кислоте <sup>3</sup>	»
Гликопротеиды	Окисление иодной кислотой с последующей обработкой реактивом Шиффа <sup>4</sup>	»
	Липопротеиды	Судан черный в 60%-ном этаноле <sup>5</sup>
Пептиды	Хлорирование ClO <sub>2</sub> или NaOCl с последующей обработкой раствором крахмала с KI или бензидинуксусной кислотой <sup>6</sup>	Реагирует со всеми соединениями, содержащими NH <sub>2</sub> -группы
Нуклеиновые кислоты	Метиловый зеленый — пиронин <sup>7</sup>	При связывании с РНК красный, с ДНК — голубой
Полисахариды	Иод <sup>8</sup>	
Кислые мукополисахариды	Толуидин синий в смеси метанол — вода <sup>9</sup>	

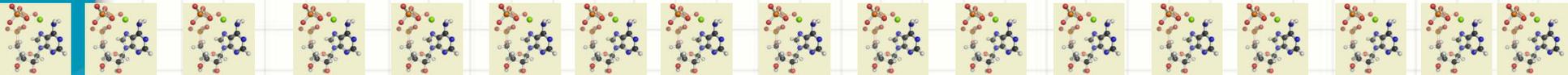
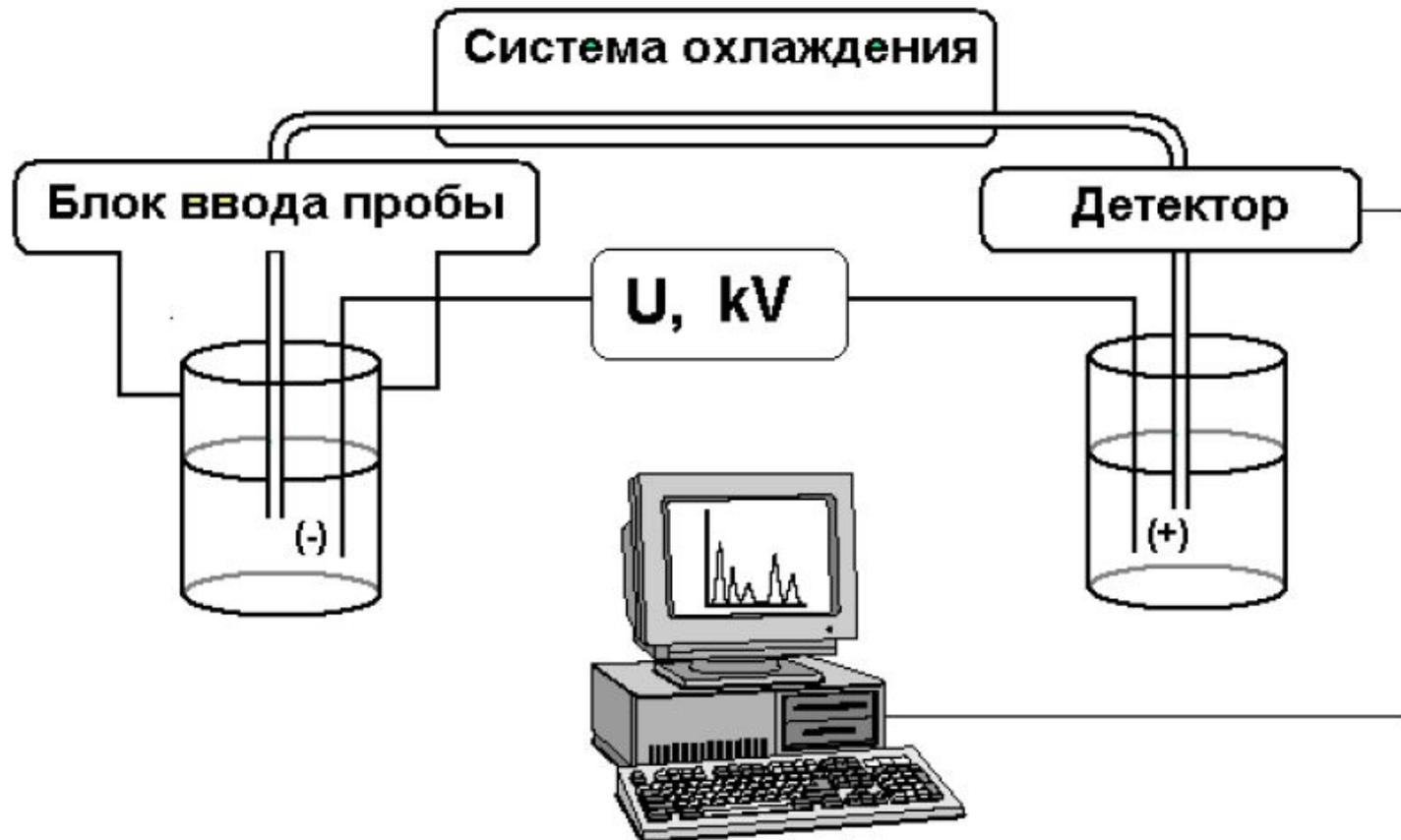


Метод капиллярного электрофореза (КЭ) основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом.

После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования.

Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества.

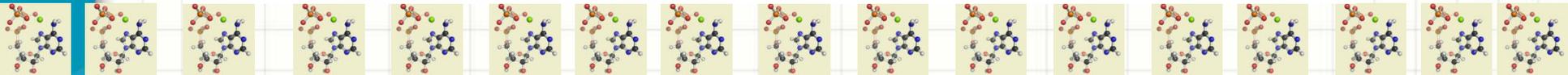
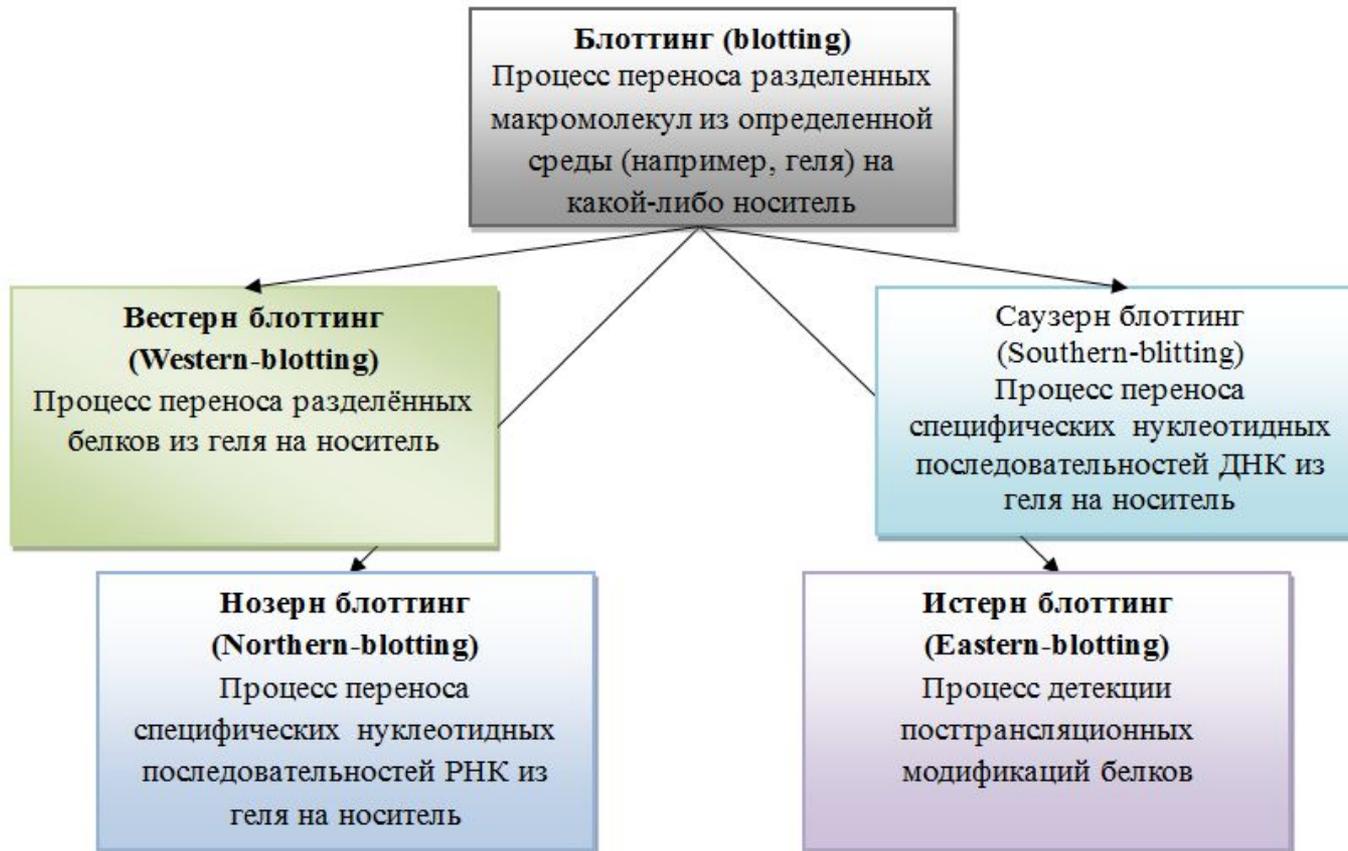




Детектор	Определяемые соединения	Предел обнаружения, М	Особенности
Фотометрический: прямое детектирование	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-4}$	Наиболее широко используется в УФ-области
косвенное детектирование	Ионы металлов, амины, органические и неорганические анионы, сахара	$10^{-8} - 10^{-4}$	Определяют вещества не поглощающие в УФ-области
Флуоресцентный: прямое детектирование	Производные аминокислот, пептиды, белки	$10^{-9} - 10^{-4}$	Необходимо получение производных
косвенное детектирование	Спирты, амины, сахара, неорганические анионы и катионы	$10^{-7} - 10^{-5}$	Применяется к ограниченному кругу объектов
Лазерный флуоресцентный	Производные аминокислот, фрагменты ДНК	$10^{-13} - 10^{-7}$	Используется редко, очень дорог
Амперометрический	Биогенные амины, фенольные соединения	$10^{-8} - 10^{-6}$	Пригоден для капилляров с внутренним диаметром до 2 мкм
Кондуктометрический	Ионы металлов, амины, карбоновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-5}$	Трудно менять капилляр
Потенциометрический	Ионы щелочных и щелочноземельных металлов	$10^{-8}$	Трудность получения ионселективных микроэлектродов
Масс-спектрометрический	Белки, пептиды, мониторинг лекарств	$10^{-10} - 10^{-8}$	Широкие возможности, но высокая стоимость



Блоттинг (blotting) – это название методик, включающих этап переноса разделенных макромолекул из определенной среды (например, геля) на какой-либо носитель (специальная бумага, нитроцеллюлозные фильтры и т.п.). Существует два основных типа блоттинга – капиллярный (например, Саузерн-блоттинг), в основе которого – перемещение молекул благодаря капиллярному эффекту, и электроблоттинг, при котором перенос молекул обеспечивается путем электрофореза.

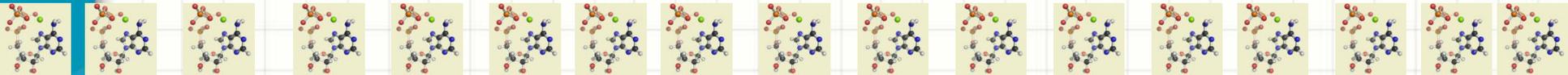


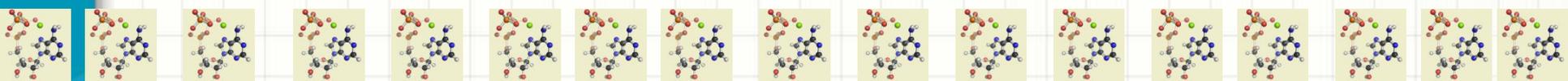
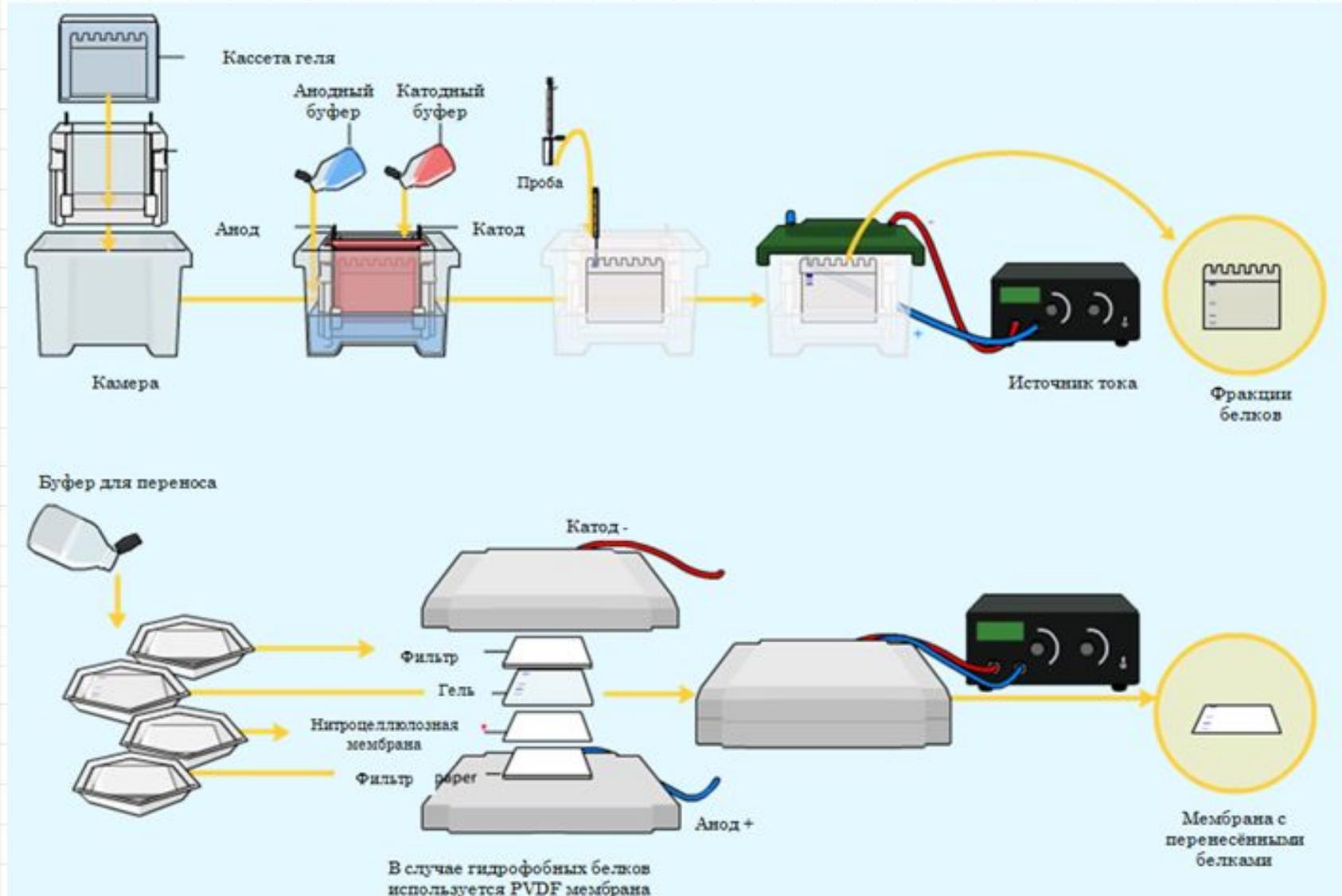
**Саузерн-блоттинг** (Southern-blotting) - метод обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей, путем переноса электрофоретически разделенных фрагментов ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный (бумажный) фильтр за счет капиллярного эффекта (blotting – «промокание») и гибридизации с меченым ДНК- или РНК-зондом, комплементарным искомой последовательности. Образование гибридов обнаруживают методом автордиографии. Метод разработан Э. Саузерном и Р. Дэйвисом в 1975.

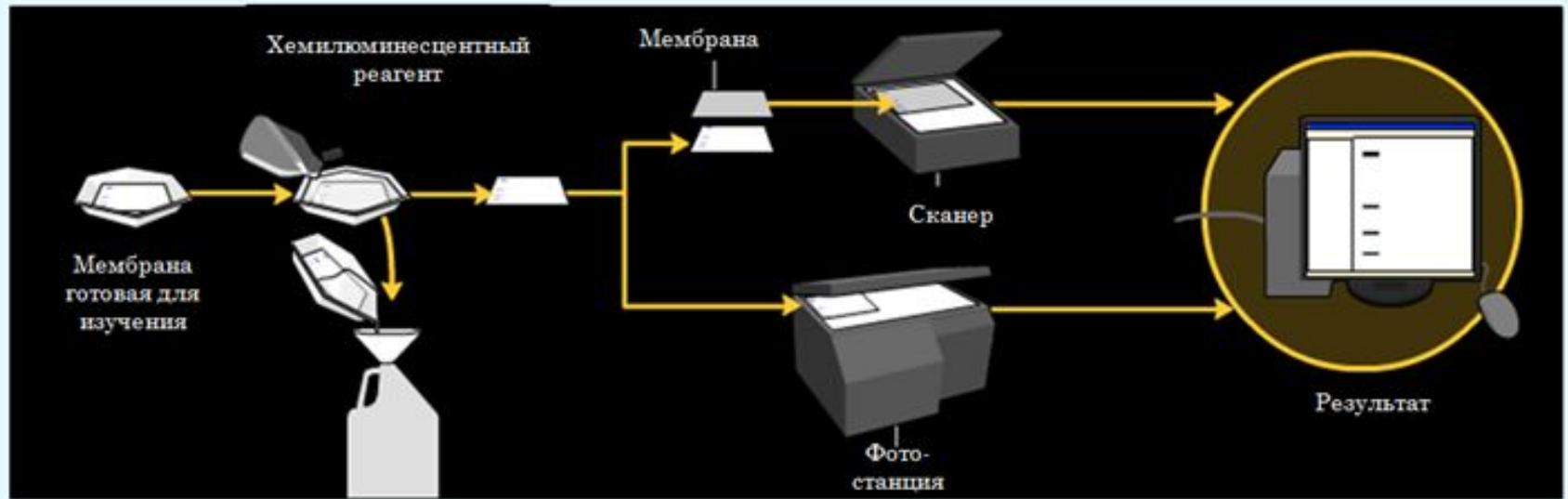
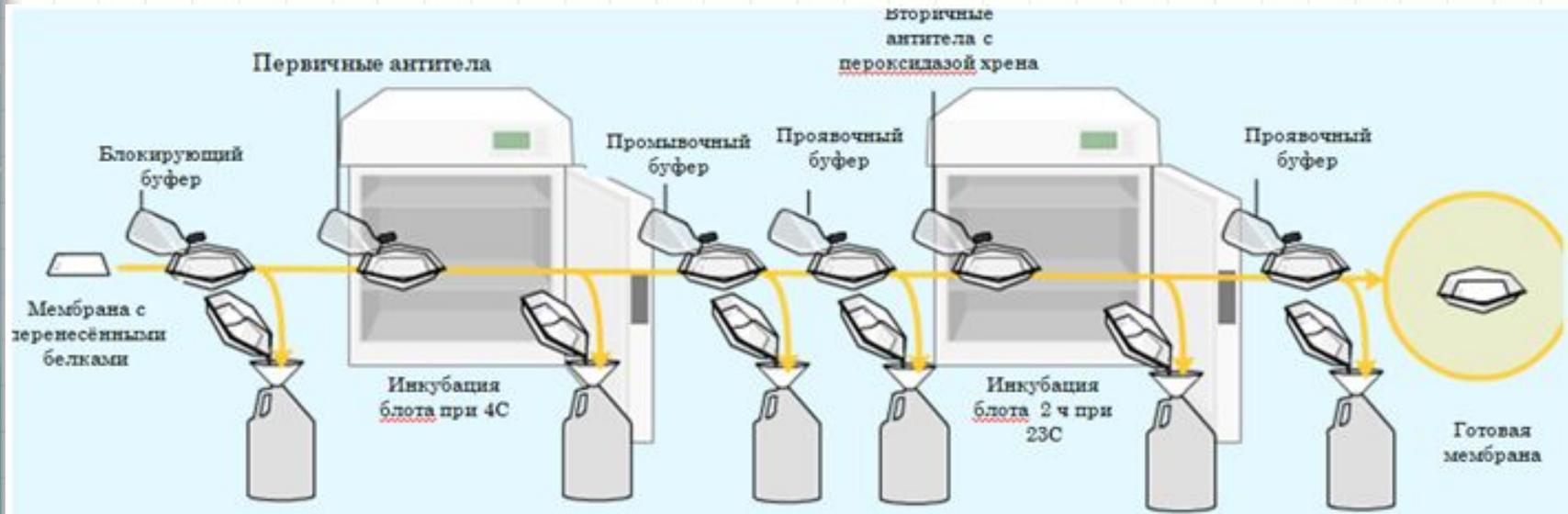
**Нозерн-блоттинг** (Northern blotting) - метод, аналогичный методу Саузерн - блоттинга и применяемый для тестирования фрагментов и молекул РНК (вместо нитроцеллюлозного используется фильтр из диазобензилоксиметил-целлюлозы, в качестве зондов используют комплементарные молекулы ДНК). Метод нозерн-блоттинга предложен Дж. Олвайном с сотрудниками в 1977.

**Истерн-блоттингом** (Eastern blotting) называется детекция посттрансляционных модификаций белков.

**Вестерн блоттинг** (белковый иммуноблот, Western blotting) — аналитический метод, используемый для определения специфичных белков в образце. Вестерн - блоттинг был разработан в лаборатории Джорджа Старка (George Stark) в Стэнфорде. Название вестерн - блот было дано технике У. Нейлом Бурнеттом ( W. Neal Burnette) и является игрой слов от названия Саузерн - блоттинг, — методики определения ДНК, разработанной ранее Эдвином Саузерном.







В биохимии и молекулярной биологии электрофорез используется для разделения макромолекул — белков и нуклеиновых кислот (а также их фрагментов). Различают множество разновидностей этого метода.

Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества и используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике, популяционной биологии (для изучения генетической изменчивости).

