

4.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Молекулы белков в зависимости от pH раствора несут поверхностный заряд (электрический), который определяется составом первичной АК последовательности. При $pH=pI$ (pI –изоэлектрическая точка) молекулы белка не заряжены. При $pH>pI$ молекулы отрицательно заряжены, а при $pH<pI$ – положительно. В электрическом поле молекулы белка в зависимости от поверхностного заряда движутся либо к аноду, либо к катоду. Скорость движения молекул будет определяться величиной заряда и характером среды, в которой происходит разделение молекул. Обычно электрофорез проводят не в растворе, а в геле, чтобы избежать смешивания разделяющихся молекул. В геле на скорость движения белка сказывается механическое сопротивление: чем больше размер молекул, тем медленнее она движется. Таким образом при электрофорезе белков в нативном (неденатурирующем) геле характер разделения молекул определяется двумя факторами: зарядом и размером молекул. Наиболее часто электрофорез белков проводят в полиакриламидном геле (ПААГ), но также используют гели агарозы, агара, крахмала. Преимуществом ПААГ является их прозрачность, возможность широко варьировать размер пор геля, механическая прочность, инертность по отношению к анализируемым веществам.

При электрофорезе белков в геле, содержащем анионный детергент – додецилсульфат натрия (ДСН), подвижность белков зависит от их молекулярной массы, а не от заряда молекул. При электрофорезе в 10%-ном ПААГ, содержащем 0,1% ДСН, для белков с молекулярной массой 10000-70000 существует линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы и электрической подвижностью белков. ДСН-электрофорез белков в полиакриламидном геле (английская аббревиатура – SDS-PAGE) широко используется для определения их молекулярной массы, разделения белков, растворимых в присутствии детергента.

Ниже приводится протокол ДСН-ПААГ-электрофореза по Леммли (Laemmli 1970). Используемая в этом протоколе система с двумя гелями разного состава позволяет получить более высокое разрешение белков различной молекулярной массы.

Ход работы.

Приготовление проб.

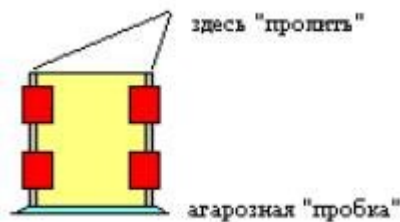
1. Клетки бактерий в экспоненциальной фазе роста осаждают центрифугированием при 7000 об/мин (из 10 мл). Надосадочную жидкость переливают в новые центрифужные пробирки, клетки бактерий суспендируют в 250 мкл дистиллированной воды.
2. К суспензии приливают 250 мкл 2X загрузочного буфера для белкового фореа, пробы перемешивают, аликвотируют по 10-20 мкл и замораживают для хранения.
3. К 9 мл супернатанта приливают 1 мл ТХУ (100%). Выдерживают на льду в течение 30 мин и центрифугируют 30 мин при 12000 об/мин при 2°C.

Место предполагаемого осадка лучше отметить маркером на центрифужке – это в последующем позволит более направленно смывать почти бесцветный осадок.

4. Осадок промывают 1 объёмом ледяного 80% ацетона, центрифугируют 10 мин при 12000 об/мин.
5. Белковый осадок высушивают и растворяют в 50 мкл дистиллированной воды. Добавляют равный объём 2X загрузочного буфера, аликвотируют по 10-20 мкл и замораживают для хранения.

Электрофорез белков в системе Леммли.

1. Вымыть камеры детергентом, хорошо сполоснуть;
2. Собрать "сэндвич" из стеклянной и керамической пластин, разделенных спейсерами, и закрепить ее вертикально непосредственно в форезном Загерметизировать низ камеры для геля 1.5% ной агароз глициновом электрофорезном буфере (для этого аккуратно охлажденный до 55°C раствор агарозы снизу в промежут установить форезный аппарат на горизонтально установленн внешние края спейсеров.
3. Приготовить нижний/разделяющий гель.



Стоковые растворы	Конечная концентрация акриламида в разделяющем геле										
	5	6	7	7,5	8	9	10	12	13	15	16
30% акриламид / 0,8% бисакриламид, мл	2,5	3	3,5	3,7 5	4	4,5 (2,25)	5 (2,5)	6	6,5	7,5	8 (4)
4x Tris Cl/SDS, pH 8,8 мл (4x разделяющий буфер)	3,7 5	3,75	3,7 5	3,7 5	3,75	3,75 (1,875)	3,75 (1,875)	3,75	3,75	3,7 5	3,75 (1,875)
Дистиллированная вода, мл	8,7 5	8,25	7,7 5	7,5 0	7,25	6,75 (3,375)	6,25 (3,125)	5,25	4,75	3,7 5	3,25 (1,625)
10% персульфат аммония, мл	0,0 5	0,05	0,0 5	0,0 5	0,05	0,05 (0,025)	0,05 (0,025)	0,05	0,05	0,0 5	0,05 (0,025)
TEMED, мл	0,0 1	0,01	0,0 1	0,0 1	0,01	0,01 (0,005)	0,01 (0,005)	0,01	0,01	0,0 1	0,01 (0,005)

Всего 15 мл, что достаточно для приготовления геля следующего размера – 0,75мм x 14см x 14см. Компоненты раствора следует перемешать тщательно, но осторожно, не допуская образования пузырей. Персульфат аммония и TEMED добавляют последними - именно эти два компонента иницируют полимеризацию акриламида.

4. Приготовленную смесь без промедления залить между стекол, закрепленных вертикально в аппарате для электрофореза. Заливать следует на 2-3 мм ниже края зубцов гребенки (при полимеризации акриламид "сожмется" и расстояние от края зубца до геля будет около сантиметра). На поверхность геля наслоить насыщенный концентрирующим буфером изобутанол (если это допускает инструкция к форезному аппарату) или воду слоем не менее 5мм (полимеризация акриламида не идет в присутствии кислорода) и оставить гель для полимеризации не менее чем на 15-25 минут;

Можно заранее вставить в аппарат гребенку и сделать отметки на стекле маркером, которые будут соответствовать низу зубцов гребенки. Это в дальнейшем поможет при заливки геля, а также и при загрузке образцов в лунки.

5. После полимеризации разделяющего геля слить изобутанол и аккуратно промыть поверхность геля водой для удаления изобутанола, остатки воды удалить при помощи фильтровальной бумаги;

6. Приготовить концентрирующий гель следующего состава:

4% концентрирующий гель

30% акриламид / 0,8% бисакриламид – 0,65 (0,325) мл

4x Концентрирующий буфер, pH 6,8 – 1,25 (0,625) мл

Дистиллированная вода – 3,05 (1,525) мл

10% персульфат аммония – 0,025 (0,0125) мл

TEMED – 0,005 (0,0025) мл

7. Вставить (не полностью) гребенку между стеклами;
8. Залить концентрирующий гель, вставить полностью гребёнку;
9. После полимеризации установить верхнюю камеру в нижнюю, залить буфер для электрофореза, вытащить гребенку;
10. Немедленно промыть лунки шприцом, поправить изогнувшиеся перегородки между карманами (либо плоским наконечником, либо иглой шприца);
11. Внести необходимый объём белковых проб, предварительно термически обработанных на водяной бане при 100°C – 3-5 мин. Для получения наилучшего разрешения, немедленно перейти к следующему пункту.
12. Закрыть камеру крышкой и включить ток. Белковые мини-гели обычно разгоняют при постоянном токе 10-20 мА (10 мА для 0,75 мм геля, 20 – для 1,5 мм) с напряжением 100-250 В (не более 300 В!!!) до полного выхода красителя (бромфенолового синего) из геля.
13. По окончании электрофореза стеклянные пластины вынуть из аппарата, аккуратно разделить, и поместить гель в окрашивающий раствор (Кумасси R250 – 1,5%, уксусная к-та – 10%, этанол – 20%) на 45-60 минут с постоянным аккуратным помешиванием. Затем гель перенести в отмывочный раствор (уксусная к-та – 10%, этанол – 20%), в котором выдержать 2-24 часа.

Температура влияет на скорость окрашивания и отмывки – можно проводить окрашивание/отмывку в термостате (37-65°C) в плотно закрытой посуде (во избежание отравления парами уксусной кислоты и этанола) и тем самым сократить время этапа. Отмывочный раствор по мере того как он будет окрашиваться, лучше заменять на новый.

С помощью красителя Кумасси R250 можно детектировать не менее 1 мкг белка в одной полосе, а с помощью более чувствительного метода серебряного окрашивания – не менее 10 нг.

Среды и реактивы для белкового электрофореза

ТХУ (100%)

Трихлоруксусная кислота (ТХУ); $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$; $M_w=163,39\text{g/M}$

хранить при NT, в темноте, под тягой

ТХУ	– 100 г
<u>H₂O дист.</u>	<u>– 45,4 мл</u>
	– 100 мл

2х буфер для загрузки образцов (Хранить в замороженном виде)

4х концентрирующий буфера	0,125 мл
10% SDS	0,300 мл
50% Глицерин	0,200 мл
2-меркаптоэтанол	0,050 мл
0,1% бромфеноловый синий	0,200 мл
Дистиллированная вода	<u>0,125 мл</u>
Всего	1,0 мл

4х концентрирующий буфер (0,5 М Трис/SDS 0,4%)

15,125 г Трис-основания, растворить в 100 мл дистиллированной воды, довести до pH 6,8 1N HCl, добавить воду до 250 мл, профильтровать. Добавить 1г SDS. Хранить при 4°C.

4х разделяющий буфер (1,5 М Трис/SDS 0,4%)

45,5 г Трис-основания, растворить в 100 мл дистиллированной воды, довести до pH 8,8 1N HCl, добавить воду до 250 мл, профильтровать. Добавить 1г SDS. Хранить при 4°C.

10х Трис-глициновый основной буфер

30.25 г Трис-основания и 144 г глицина растворить в 600 мл дистиллированной воды, довести до конечного объема 1 литр и профильтровать.

SDS добавить до 0,1% в окончательном 1х буфере.

Раствор акриламида/бисакриламида (30% (в/о))

К 30 г акриламида и 0,8 г N-N'-метиленабисакриламида добавить 50 мл дистиллированной воды, полностью растворить и довести объем до 100 мл, профильтровать и хранить в темноте при 2-8°C.



**Акриламид мономер - нейротоксин!!! Работать с раствором в перчатках!!!
Взвешивать в маске!!!**

Акриламид постепенно гидролизуеться до акриловой кислоты и аммиака – не хранить более 30 дней (обязательно проставить дату на этикетке!).

Раствор для окрашивания

10% (о/о) уксусная кислота, 20 % (о/о) этанол и 0,25 % (в/о) Кумасси бриллиантовый синий R250. После растворения р-р Кумасси профильтровать.

Отмывочный раствор

10 % (о/о) уксусная кислота и 20 % (о/о) этанол.

Дата обновления: 14-06-2017

Растворы для окрашивания по Кангу.

1. Фиксирующий раствор: 30% (по объему) этанола и 2% (по объему) фосфорной кислоты. Этап фиксации может быть опущен, но необходимо устранить SDS промывкой геля 3×10 мин в воде MilliQ.

2. Окрашивающий раствор: 0,02% (вес / объем) CBV G-250 в 10% (объем / объем) этаноле, 5% (вес / объем) сульфата алюминия 18-водного и 2% (вес / объем) фосфорной кислоты.

Для приготовления 1 л стокового раствора необходимо растворить 50 г сульфата алюминия 18-водного (или 71, грамма алюмокалиевых квасцов) в достаточном объеме воды MilliQ (например, 500 мл), добавить 100 мл этанола и соответствующее количество CBV G-250 (0,2 г). Затем, добавьте 85% фосфорную кислоту (20 г) к раствору и доведите водой MilliQ до желаемого объема. Раствор для окрашивания по Кангу имеет темно-зеленый цвет.

3. Отмывочный раствор: нет необходимости в отмывке. Для удаления остаточного количества CBV, гель может быть кратковременно промыт в 10%(об. / об.) этанол и 2% (об. / об.) фосфорной кислоты.

Коллоидное окрашивание CBV G-250 по Kang et al.

1. Зафиксируйте белки в течение 20 минут - 1 часа или промойте гель 3×10 минут с помощью MilliQ. воды.

2. Удалите фиксирующий раствор. Инкубируйте гель в коллоидном окрашивающем растворе CBV G-250 с покачиванием. Время достижения половины максимальной интенсивности окрашивания составляет около 20 мин; Окрашивание на 90% до максимального уровня может быть выполнено через 2 часа инкубации, для максимальной интенсивности окраски можете оставить гель окрашиваться в течение ночи.

3. Удалите окрашивающий раствор. Для более высокой чувствительности несколько раз промойте гель в 10% (об. / об.) этаноле и 2% (вес / об.) фосфорной кислоте с последующей промывкой в воде MilliQ для нейтрализации геля.

4. Храните гель в 7% водной уксусной кислоте.