

Л.А. ОСТЕРМАН

МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ
БЕЛКОВ
И НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ

Электрофорез
и ультра-
центрифугирование

Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.

В книге детально описана современная аппаратура, изложены практические приемы постановки экспериментов, проанализировано влияние на их результаты различных физико-химических параметров. Рассмотрены все варианты и модификации описываемых методов. Даны ссылки на оригинальные экспериментальные работы, опубликованные в ведущих журналах мира по декабрь 1980 г.

Книга рассчитана на биохимиков, медиков, фармакологов, работников пищевой промышленности.

Табл. 4, илл. 77, библиогр. 294 назв.

Ответственный редактор
член-корреспондент АН СССР
Г. П. ГЕОРГИЕВ

21005 — 414

684 — 82 Кн. 2.2001040000 © Издательство «Наука», 1981г.

055 (02)— 81

Часть первая

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ВВЕДЕНИЕ

Электрофорез занимает сейчас центральное место среди методов исследования белков и нуклеиновых кислот. В современной научной литературе редко можно встретить статью, в которой бы на той или иной стадии фракционирования или характеристики этих биополимеров не был использован электрофорез. Метод позволяет разделять макромолекулы, различающиеся по таким важнейшим параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд, причем эти параметры могут выступать как порознь, так и в совокупности.

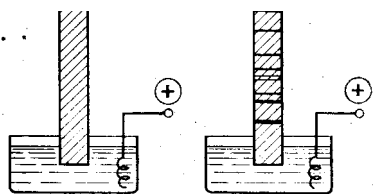
Физический принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости, и в этом — сущность процесса электрофореза. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью. Со временем эти зоны распределяются по длине канала (рис. 1, справа).

На рисунке, помимо рабочего канала (трубки), показаны некоторые необходимые компоненты системы. Во-первых, это два электрода, представленные спиральками из платиновой проволоки, а во-вторых, электродные резервуары. Через находящиеся в них буферные растворы и рабочий канал замыкается электрическая цепь между электродами.

Рабочий канал не случайно заштрихован. Дело не только в том, что, будь он просто заполнен жидкостью, изображенная

Схема выглядела бы нелепо, так как буфер из трубки и верхнего резервуара должен был вылиться в нижний. Эту трудность можно обойти, если придать каналу с жидкостью U-образную форму. Такие приборы использовались на первых этапах развития метода (электрофорез в свободной жидкости). Хуже другое: в жидкости нельзя избежать конвекции, которая деформирует и смешивает разделяющиеся зоны. Поэтому в современных приборах рабочий канал заполняют гелем, что на схеме изображено штриховкой. Достаточно чистая и хорошо смачиваемая (гидрофильная) пространственная сетка геля удерживает жидкость от вытекания и препятствует конвекции. Вместе с тем используемые гели содержат очень много жидкости (80—99,5%), в которой (т. е. в рабочем буфере) и мигрируют макромолекулы. Наличие сетки геля вносит важную дополнительную деталь в картину электрофоретической миграции. Теперь фракционируемые макромолекулы любых размеров неизбежно сталкиваются с нитями полимера, образующего сетку геля, что увеличивает эффективное трение о среду, а следовательно, снижает скорость движения молекул. Очевидно, что препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний диаметр пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. В этом случае решающее влияние на электрофоретическую подвижность различных макромолекул и степень разделения оказывает соотношение их линейных размеров. Возможна даже такая ситуация, когда особенно крупные молекулы белков или нуклеиновых кислот вообще не смогут «протиснуться» через поры геля и их миграция прекратится.

Рис. 1. Схема простейшего прибора для электрофореза в геле
а — до начала фракционирования, б — после его окончания



В настоящее время почти исключительно используются полиакриламидные гели (ПААГ) и гели агарозы. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации pH буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов. Все это придает методу электрофореза ис-

ключительную гибкость.

Но есть, разумеется, и свои проблемы. Разделяемые макромолекулы все же находятся в растворе, поэтому возможна их диффузия, приводящая к размыванию зон. Это тем более серь-

езно, что протекание через жидкость электрического тока неизбежно связано с выделением тепла. К счастью, крупные молекулы белков и нуклеиновых кислот диффундируют не слишком быстро. Однако проблема теплоотвода и, главное, его равномерности по всему гелю очень важна еще и потому, что скорость миграции макромолекул в электрическом поле зависит от температуры. Неравномерность нагревания геля неизбежно приведет к искажению зон и ухудшению их разделения.

В ходе электрофореза зоны растворенных макромолекул остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые макромолекулы, но не взаимодействуют с ними. Краситель тоже перемещается в электрическом поле, но уже в виде окрашенной зоны. Его подбирают таким образом, чтобы скорость миграции наиболее подвижных макромолекул была несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда окрашенная зона доходит до конца трубки, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и вымачивают в смеси кислоты со спиртом так, что белки или нуклеиновые кислоты выпадают в осадок в том самом месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. После фиксации (или одновременно с ней) проводят окрашивание зон путем вымачивания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют. На фотографии окрашенного цилиндрического ПААГ (рис. 2) хорошо видны четкие, узкие полосы разделившихся компонентов исходной смеси белков.

Вместо цилиндрических часто используют гели в виде тонких пластин, заподимеризованные между двумя плоскими стеклами. Такие пластины имеют важное преимущество: на них можно одновременно фракционировать несколько препаратов. Обычно их вносят с одного края геля на равных расстояниях друг от друга. Каждый препарат разделяется в электрическом поле независимо от своих соседей, образуя свой набор зон. На фотографии такой пластины (рис. 3) хорошо видна серия параллельных «треков», исчерченных поперечными полосами окрашенных зон, в которых располагаются (в данном случае) олигонуклеотиды различной длины.

Вместо окрашивания или наряду с ним часто используют методы обнаружения разделенных зон по их радиоактивности. К ним относятся приемы регистрации полос на фотопленке посредством автордиографии или флюорографии и различные способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Преимущества пластин не ограничиваются экономией времени и места при обработке большого количества препаратов. Важнее другое: поскольку гель заливают в форму для полиме-

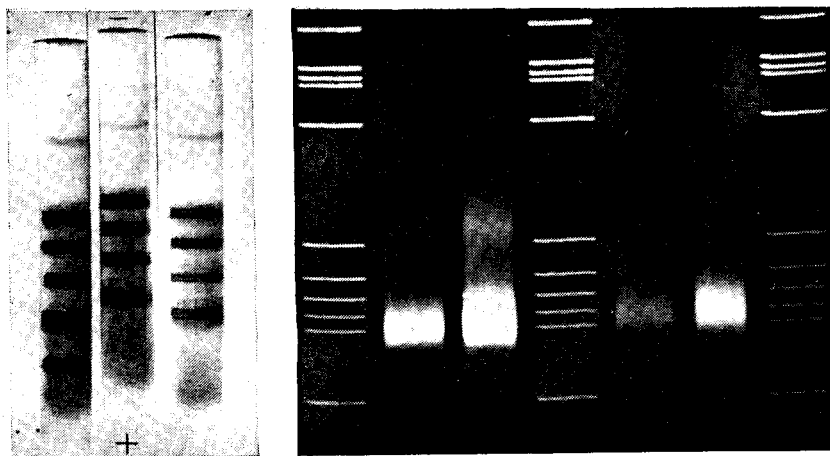


Рис. 2. Трубки с ПААГ после окончания электрофореза
Горизонтальные полоски — окрашенные белковые зоны

Рис. 3. Пластина агарозного геля после разделения фрагментов ДНК
Окраска люминесцентным красителем (бромистым этидием)

ризации жидким, то его концентрация, состав буфера и содержание добавок строго одинаковы по всему сечению геля. Следовательно, плотность тока и напряженность электрического поля также одинаковы. Это обеспечивает строго идентичные условия фракционирования разных препаратов и дает возможность достоверного сопоставления их состава путем сравнения положения полос в параллельных треках. Если добавить к этому значительно более выгодные условия теплоотвода от тонкой пластинки геля по сравнению с цилиндром, то станет понятной исключительная популярность этой системы электрофореза в последние годы.

Фракционированием в ПААГ и агарозе не исчерпываются современные методы электрофореза. В качестве «носителей» жидкой фазы широко используют также пленки из ацетата целлюлозы, фильтровальную бумагу, тонкие слои силикагеля, целлюлозы, сефадекса и др. В некоторых случаях, например для разделения низкомолекулярных веществ, эти системы имеют свои преимущества, однако для фракционирования белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов в настоящее время используют почти исключительно гель-электрофорез, поэтому только он и будет подробно описан.

Рассмотрение начинается с характеристики исходных материалов и процессов их полимеризации. Затем, чтобы освободить дальнейшее изложение от повторений, будет описана техника приготовления гелей и соответствующая аппаратура. Гла-

ва 3 посвящена электрофорезу белков. После замечаний общего характера будут подробно рассмотрены различные современные приемы и варианты электрофореза. В отдельные разделы вынесены способы окрашивания, элюции из геля и регистрации радиоактивности фракционированных белков, поскольку эти приемы в большинстве своем одинаковы для всех вариантов электрофореза. Главу включает описание способов препаративного разделения белков. Такая же структура изложения принята для рассмотрения электрофореза нуклеиновых кислот (глава 4). Замечания общего характера, изложенные в предыдущей главе, во многом относятся к фракционированию обоих типов биополимеров, поэтому здесь будут рассмотрены только специфические особенности электрофореза нуклеиновых кислот. В обеих последних главах для иллюстрации различных экспериментальных приемов электрофоретического разделения биополимеров разбираются многие новейшие работы. Разумеется, при этом приводятся только наиболее существенные данные. Более детальное описание следует искать в оригинальных публикациях, на которые будут даны ссылки.

Глава 1

ГЕЛИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ (ПААГ)

Исходные материалы

Акриламид ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH}_2$) представляет собой белый кристаллический порошок. Хорошо очищенный продажный препарат содержит не более 0,05% акриловой кислоты. Его 5%-ный водный раствор должен иметь рН не ниже 5, а оптическая плотность 1%-ного раствора при 290 нм (A_{290}) не должна превышать 0,15. Такой препарат можно использовать без дополнительной очистки или перекристаллизации. Акриламид следует хранить сухим, в темной посуде, предпочтительно на холоду. В этих условиях он может храниться до года. Акриламид токсичен (воздействует на кожу и нервную систему), поэтому отвешивать и растворять его следует в перчатках и под тягой.

Недостаточно чистый препарат можно перекристаллизовать. Для этого 70 г акриламида растворяют в 1 л хлороформа при 50°, фильтруют при этой же температуре, затем охлаждают до —20°, быстро промывают кристаллы холодным хлороформом и высушивают в вакуум-эксикаторе. Для освобождения от УФ-поглощающих примесей акриламид можно обработать активированным углем. Для этого в маточный 30—40 %-ный водный раствор акриламида в смеси с метиленбисакриламидом добавляют

активированный уголь (примерно 50 г/л), суспензию перемешивают в течение 30 мин и фильтруют сначала через бумажный, а затем через стекловолокнистый фильтр.

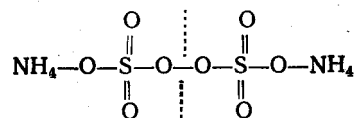
NN'-Метиленабисакриламид («Бис») — $(\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CONH})_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2$ — используют в качестве «сшивки» линейных полимеров акриламида. Продажные препараты, содержащие не более 0,02% акриловой кислоты, не нуждаются в дополнительной очистке. В случае необходимости Бис можно перекристаллизовать из ацетона (12 г/л) в тех же условиях, что и акриламид. Условия хранения и токсичность — такие же, как у акриламида.

В качестве «сшивки» иногда используют этилендиакрилат — $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{C}(\text{O}) - \text{CH} = \text{C}(\text{H}_2)$, а также

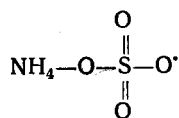
NN'-диаллилтартардиамид (ДАТД) — $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$. С их по-

мощью получают «растворимые» гели. В первом случае эфирную связь можно разорвать обработкой геля щелочью или водным раствором пиперидина. Гели, сшитые ДАТД, растворяются за 20 — 30 мин при комнатной температуре в 2%-ной йодной кислоте. Использование растворимых гелей на основе акриламида будет рассмотрено ниже.

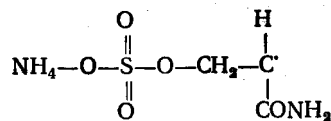
Персульфат аммония производится в виде белого кристаллического порошка или гранул. Его используют в качестве инициатора процесса полимеризации. Гомолитический разрыв связи между атомами кислорода в молекуле персульфата аммония



приводит к образованию двух достаточно долго живущих свободных радикалов с одним неспаренным электроном у атома кислорода:



Такой радикал стимулирует разрыв двойной связи в молекуле акриламида и присоединяется к ней таким образом, что снова образуется радикал с неспаренным электроном, но уже у атома углерода:



Этот радикал, в свою очередь, вызывает разрыв двойной связи и присоединение следующей молекулы акриламида с образова-

нием нового радикала и т. д. Цепная реакция полимеризации идет до тех пор, пока два радикала, встретившись между собой, не образуют обычную ковалентную связь. По тому же механизму в растущую цепочку линейного полимера может одной из своих концевых винильных групп встроиться и метиленбисакриламид. Второй его конец может точно так же оказаться в составе другой линейной полимерной цепочки, и образуется «сшивка».

Персульфат аммония в водном растворе постепенно разлагается, поэтому следует использовать только свежеприготовленные растворы. Сухой препарат хранится лучше, хотя и он медленно разлагается с выделением кислорода. Продажные препараты для электрофореза обычно достаточно хорошо очищены, но их следует проверять. Если 1%-ный раствор персульфата аммония в воде имеет $\text{pH} < 2$, то он непригоден. Отметим попутно, что катион не играет роли в процессе инициации. Можно с успехом использовать, например, персульфат калия.

Рибофлавин представляет собой кристаллы в виде желто-оранжевых игл. Он малорастворим в воде, но хорошо растворяется в слабощелочных водных буферах; растворы имеют желто-зеленую окраску.

Рибофлавин также может служить инициатором полимеризации. При освещении его водного раствора видимым светом (445 нм) он присоединяет водород и восстанавливается до лейкорибофлавина. Последний снова легко окисляется растворенным в воде кислородом, образуя перекись водорода. За счет разложения перекиси продуцируются свободные радикалы ($\text{HO}\cdot$), иницирующие цепную реакцию полимеризации акриламида.

К чистоте рибофлавина можно предъявлять не слишком строгие требования, так как он, являясь очень эффективным инициатором, используется в гораздо меньших концентрациях (~0,005%), чем персульфат аммония.

Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) — $(\text{CH}_3)_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{CH}_3)_2$ — представляет собой бесцветную жидкость с плотностью 0,78 г/см³. Концентрация неразбавленного ТЕМЕД — около 6,7 М.

ТЕМЕД не является, собственно говоря, инициатором полимеризации акриламида, но служит катализатором этого процесса, заметно ускоряя его протекание. Он эффективен только в своей неионизированной форме, поэтому при полимеризации акриламида в кислой среде содержание ТЕМЕД следует значительно увеличить. В нейтральной или щелочной средах ТЕМЕД можно вносить в количестве, эквивалентном по отношению к персульфату.

В качестве катализатора в последнее время нередко используют диметиламинопропионитрил — $(\text{CH}_3)_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CN}$ ($M = 102$). Он более эффективен, чем ТЕМЕД, поэтому его вносят в три-четыре раза меньше, чем персульфата аммония.

Процесс полимеризации ПААГ

При подготовке определенной серии опытов удобно заранее приготовить концентрированный (30—40%) водный раствор акриламида и метиленбисакриламида с определенным соотношением обоих мономеров. Такой раствор можно хранить в холодильнике в течение нескольких недель. Так же хранят и маточный раствор буфера, например 10-кратной концентрации.

ТЕМЕД хранится хорошо, а персульфат аммония растворяют в воде непосредственно перед началом опыта.

Для приготовления геля маточные растворы мономеров и буфера смешивают в такой пропорции, чтобы получить нужную конечную концентрацию акриламида и буфера, дополняют до расчетного объема водой и вносят ТЕМЕД. После этого раствор деаэрируют в колбе Бунзена, присоединенной к водоструйному насосу, добавляют расчетный объем раствора персульфата и заливают в трубку или между стеклами для формирования пластин. При правильном выборе концентраций персульфата и ТЕМЕД полимеризация занимает 30—40 мин. Ее следует вести вдали от яркого источника света.

Рассмотрим некоторые факторы, влияющие на этот процесс. Наибольшую опасность для нормального протекания полимеризации акриламида представляет растворенный в воде кислород, молекула которого является определенного рода бирадикалом и потому способна оборвать цепную реакцию свободнорадикальной полимеризации акриламида. Деаэрация смеси растворов необходима именно для удаления из нее растворенного кислорода. Ее можно вести достаточно энергично и с перемешиванием — так, чтобы жидкость при пониженном давлении закипела, но как только интенсивное выделение пузырей газа закончится, деаэрацию следует прекратить, не допуская заметного испарения воды. Обычно эта процедура занимает несколько минут при комнатной температуре.

Кислород воздуха в контакте с раствором мономеров может помешать полимеризации, поэтому на поверхность раствора осторожно наслаивают до высоты 3—5 мм деаэрированную кипячением воду или изобутанол. Наслаивать следует по стенке формы через иглу от шприца с помощью перистальтического насоса. Им же удобно отсосать воду после окончания полимеризации геля. Вначале граница между гелем и водой исчезает, но затем вновь появляется, что указывает на окончание процесса полимеризации.

Если в качестве инициатора используют рибофлавин, то форму с раствором мономеров освещают люминесцентной лампой «дневного света» с расстояния около 5 см в течение 30—45 мин. Уже указывалось, что рибофлавин является более эффективным инициатором, чем персульфат. Кроме того, продукты его распада не опасны для белков и нуклеиновых кислот, в то время как ион персульфата может вступать в реакцию с белками, созда-

вая артефакты при их фракционировании. В тех случаях, когда это существенно, персульфат удаляют путем предварительного электрофореза («преэлектрофореза») геля до внесения в него препарата, однако полностью это сделать не удается. Тем не менее в последние годы в качестве инициатора предпочтение отдают персульфату, поскольку при работе с рибофлавином довольно трудно подобрать оптимальную степень деаэрирования растворов. С одной стороны, растворенный кислород препятствует полимеризации, а с другой — он необходим, хотя и в небольшом количестве, для самого процесса инициации с участием рибофлавина.

Полимеризация — экзотермический процесс, поэтому в случае высокой концентрации акриламида во избежание образования пузырей газа и нарушения однородности геля необходимо обеспечить отвод тепла. Вместе с тем скорость полимеризации увеличивается с ростом температуры за счет ускорения образования свободных радикалов. Этим можно воспользоваться для замедления полимеризации: при охлаждении геля на 1° ее продолжительность увеличивается примерно на 2 мин. Полимеризацию гелей, содержащих более 15% акриламида, лучше вести на холоду.

Гель получается наиболее однородным, если время полимеризации составляет 30 — 40 мин. Обычно этого добиваются эмпирически, подбирая оптимальную концентрацию персульфата. Она может варьировать в пределах от 0,02 до 0,2% в зависимости от концентрации акриламида и качества самого персульфата. С увеличением содержания акриламида концентрацию персульфата приходится уменьшать. Имеет смысл предварительно внести различные количества данного препарата персульфата в ряд пробирок с рабочим раствором мономеров акриламида, наблюдая продолжительность полимеризации в них.

Количество ТЕМЕД в объемных процентах можно брать примерно вдвое меньшим, чем персульфата. С учетом различия молекулярных масс и плотности ТЕМЕД это обеспечит их близительную эквимолярность. Напомним, что при использовании кислых буферов количество ТЕМЕД следует увеличивать вплоть до 10-кратного по сравнению с персульфатом. Впрочем, нередко вносят избыток ТЕМЕД и в нейтральные буферы. Существенной роли это не играет, если только гель не обнаруживает склонности к растрескиванию при высушивании (для автордиографии). В этом случае содержание ТЕМЕД надо снизить.

Состав буферов, используемых для электрофореза белков и нуклеиновых кислот, не влияет на процесс полимеризации акриламида. Природа, концентрация и pH буфера определяются особенностями самого процесса электрофореза, которые будут рассмотрены ниже. Полимеризации ПААГ не мешает также присутствие мочевины (даже в высоких концентрациях), гуанидинхлорида, формамида, сахарозы или таких детергентов, как до-

децилсульфат натрия, Тритон X-100, цетавлон и др. Сахароза даже способствует полимеризации и улучшает механические свойства геля. Разумеется, все эти добавки не должны содержать посторонних примесей.

Весьма существенно обеспечить чистоту поверхности стеклянных форм для геля. Их тщательно моют лабораторными детергентами и обильно споласкивают водой. Трубки можно мыть щеточкой для курительной трубки. Неплохо дополнительно погрузить пластины или трубки на 1—2 ч в хромпик. Иногда их моют горячей азотной кислотой. По хорошо промытой стеклянной поверхности вода должна стекать, не оставляя капель.

ПААГ хорошо прилипает к стеклу даже при малой концентрации акриламида (менее 5%). Это существенно для поддержания геля в устройствах с вертикальным расположением трубок или пластин. Кроме того, хорошее прилипание улучшает теплопередачу от геля к стеклу и уменьшает опасность образования шунтирующей ток пленки жидкости у поверхности стекла. Такой шунт, а иногда и канал, по которому вытекает буфер из верхнего электродного резервуара, может образоваться между боковыми торцами пластины геля и прокладками, определяющими его толщину, в случае загрязнения прокладок или неудачного выбора их материала. Прокладки из тефлона, плексигласа или чистой силиконовой резины не мешают полимеризации геля вблизи их поверхности. Однако некоторые сорта резины с наполнителями, а также смазки, которыми нередко герметизируют прокладки, могут препятствовать полимеризации. Смазку (лучше всего силиконовую) следует наносить тонким валиком из шприца со снятой иглой на таком расстоянии от внутреннего края прокладки, чтобы она не выдавливалась внутрь формы при ее сжатии пружинными зажимами (см. ниже). Для достаточно ровных стекол тефлоновые прокладки можно использовать без смазки.

Гели с высоким содержанием акриламида могут настолько прочно связываться со стеклом, что их последующее извлечение из трубок или снятие стеклянных пластин с геля становится затруднительным. В этом случае можно силиконировать стекло или использовать формы, изготовленные из плексигласа, к которому ПААГ прилипает хуже, чем к стеклу, но при высокой концентрации акриламида — вполне надежно. Полимеризацию геля между тонким стеклом и толстой (для жесткости) пластиной плексигласа удобно проводить для последующего горизонтального электрофореза. После окончания полимеризации плексиглас можно легко снять, а гель на стекле перенести на охлаждающий столик прибора. Полимеризацию ПААГ для горизонтального электрофореза можно вести просто в тонком слое, налитом на строго горизонтальное стекло, если его поместить в камеру, заполненную азотом.

Особого внимания требует полимеризация «градиентных» гелей с меняющейся по высоте концентрацией акриламида. Тепло-

выделение при полимеризации такого геля будет заметно больше в его нижней части, где содержание акриламида выше, а это может привести к тепловой конвекции в жидкости и нарушению градиента. Во избежание такого явления вместе с концентрацией акриламида по высоте геля варьируют и содержание в нем иницирующих добавок с таким расчетом, чтобы, полимеризация начиналась с верхнего края пластины или трубки и постепенно распространялась вниз.

Выбор концентраций мономеров

Для удобства изложения используются следующие обозначения: T — процентное отношение суммарной массы обоих мономеров к объему их раствора, C — процентное отношение массы метиленбисакриламида к общей массе обоих мономеров. Величина T практически варьирует в пределах 3—30 %, а C , как правило, составляет 1—5%, что соответствует отношению акриламид/Бис в пределах от 99 : 1 по 19 : 1. Однако в некоторых особых случаях, рассмотренных ниже, имеет смысл увеличивать C до 20% и более. При указании значений T и C значок «%» далее будет опущен.

Чем же диктуется выбор значений T и C ? Прежде всего, на этот выбор накладывают ограничения механические и адсорбционные свойства геля. Например, гели с $T \leq 10$ и $C=10$ оказываются слишком мягкими и липкими — их невозможно извлечь из стеклянной формы. Для крупнопористых гелей надо увеличивать степень сшивки (повышать величину C до 3—5), т. е. отношение акриламид/Бис брать в пределах от 35 : 1 до 20 : 1. При этом происходит одновременное повышение прочности геля и ухудшение его способности прилипать к стеклу — гель как бы «замыкается». Мелкопористые гели (T около 20) при высоком содержании «сшивки» оказываются хрупкими и мутными, поэтому для них величина C не должна превышать 1—2.

На первый взгляд кажется очевидным, что поры ПААГ тем мельче, чем больше содержание в нем мономеров, т. е. величина T . Но это не всегда так; имеет смысл разобраться в этом глубже.

Неправильно было бы считать ПААГ регулярной пространственной решеткой с жесткими ячейками определенного среднего размера. При малых значениях C он представляет собой скорее длинные нити, заполняющие весь объем и лишь в отдельных точках случайным образом сшитые между собой. Расстояние между этими точками вдоль нити (при $C \approx 1$) в среднем равно 50—100 мономерных единиц. Такая система не может быть внутренне жесткой. Мигрирующие в геле макромолекулы, по видимому, могут раздвигать гибкие длинные участки линейных полимеров акриламида. Разумеется, на это расходуется энергия, миграция молекул замедляется и происходит своеобразное «трение» их о гель. Однако жестких ограничений на размер

мигрирующих молекул такая система не накладывает, и это очень существенно.

Чем больше содержание акриламида (а величина T , в основном, определяется им), тем гуще нити полимера, меньше промежутки между ними и сильнее трение. Увеличение содержания «сшивки» (C) сначала повышает жесткость геля так как средняя длина свободных участков нитей уменьшается. Трение при этом увеличивается, а миграция биополимеров в геле замедляется, — именно этого и можно было ожидать. Однако далее картина меняется. Эксперимент обнаруживает, что с увеличением C выше 10 тормозящий эффект геля (при одних и тех же значениях T) ослабляется. При $C > 15$ гель ведет себя как крупнопористый даже при высоких значениях T . Дело в том, что внутренняя структура геля в этом случае приобретает, по-видимому, совсем иной характер. Благодаря частым сшивкам, расположенным теперь на расстоянии всего лишь нескольких мономерных единиц друг от друга, оказывается энергетически выгодным и вероятным многократное связывание нескольких параллельно идущих нитей в своего рода пучки, которые также образуют хаотически сшитую пространственную сетку. Однако эта сетка оказывается действительно жесткой — нити в пучках раздвинуть невозможно. Зато между пучками полимерных нитей образуются достаточно большие пустоты, заполненные жидкой фазой геля, по которым могут свободно мигрировать молекулы биополимеров.

Между прочим, такая же ситуация возникает и при затвердении агара или агарозы, однако нити линейных полисахаридов связываются в пучки не ковалентными, а водородными связями. Такая структура и обеспечивает удивительное сочетание крупнопористости и прочности, характерное для этих гелей.

Возвращаясь к ПААГ, следует указать, что гели с очень высоким содержанием метиленбисакриламида ($C > 15$) хрупки, легко отстают от стенок, непрозрачны и сильно окрашиваются. Этих недостатков лишены гели, сшитые NN' -диаллилтартардиамидом. Например, гель с $T = 5$ и $C = 15$, сшитый ДАТД, оказывается настолько крупнопористым, что не тормозит миграцию биополимеров с молекулярной массой 0,5 млн. дальтон; при этом он механически прочен, хорошо сцепляется со стеклом и прозрачен [Baumann, Chrambach, 1976]. Вспомним, что такой гель к тому же растворим в йодной кислоте. Недавно описано успешное использование для электрофореза белков еще сильнее сшитого геля этого типа. В нем величина C достигала 27, т. е. отношение акриламид/ДАТД не превышало 4:1 [Spath, Koblet, 1979].

Рассмотрим теперь подробнее влияние выбора значений T и C для обычного ПААГ на скорость миграции в нем биополимеров. Тормозящий эффект трения о гель проявляется в снижении *электрофоретической подвижности* заряженных макромолекул в геле (u') по сравнению с их подвижностью в свободной жидко-

сти с такими же, как у буфера геля, значениями рН и ионной силы раствора (u_0). Электрофоретическую подвижность определяют как величину скорости миграции заряженных молекул (см/ч) при напряженности поля 1В/см. Величина u_0 зависит от соотношения суммарного электрического заряда макромолекулы (при данном рН) и ее массы. Сила, действующая на молекулу в электрическом поле, пропорциональна заряду, а противодействующая миграции вдоль силовых линий поля сила трения о жидкость пропорциональна линейному размеру молекулы, а следовательно, кубическому корню из ее массы. Для ориентировки заметим, что электрофоретическая подвижность большинства кислых белков в свободной жидкости при рН8,8 лежит в пределах 0,1 — 0,5 см/ч на 1В /см. Прямой корреляции между массой молекулы и величиной u_0 , очевидно, быть не должно.

В геле трение существенно возрастает, причем тем сильнее, чем больше масса молекул и меньше средний размер пор, т. е. чем больше величина T (для малых значений C). Показано, что имеет место соотношение: $\ln(u'/u_0) = -k_R T$. Величина коэффициента торможения k_R (порядка 0,1—0,4) зависит от среднего радиуса молекулы R и степени сшивки геля C , слабо увеличиваясь с ростом последней в пределах от 1 до 7. Для глобулярных белков R лежит в диапазоне от 1,57 нм для лактальбумина ($M = 12\ 400$) до 3,61 нм для церулоплазмينا ($M = 151\ 000$).

Для эффективного разделения белков при электрофорезе в ПААГ соотношение u'/u_0 должно составлять 0,1 — 0,2. Отсюда следует, что оптимальная электрофоретическая подвижность белков в ПААГ лежит в пределах 0,01—0,1 см/ч на 1В/ см. При напряженности поля 10— 20 В/см этому соответствуют скорости миграции белков в диапазоне 0,1 — 2 см/ч. Таким образом, при рабочей длине геля 10 см за 5 ч электрофореза наиболее быстрые белки могут достигнуть конца геля, в то время как наименее подвижные продвинулись лишь на 0,5 см. Цифры эти — сугубо приближенные и приведены здесь лишь для общей ориентировки. В конкретных случаях возможны существенные отклонения от них. Например, если заранее известно, что разделяемые белки сильно различаются между собой по заряду или размерам, то можно вести электрофорез в условиях более высоких подвижностей (u'), т. е. в более крупнопористых гелях, и тем сократить время фракционирования в 2—3 раза.

Выбор значения T зависит от природы различия электрофоретических подвижностей белков в геле. Если сильно различаются размеры молекул, а отношение заряда к массе у них более или менее одинаково, то имеет смысл выбрать T максимальным. Разделение в этом случае будет происходить только за счет трения о гель, причем тем эффективнее, чем больше T , хотя при этом в связи с увеличением продолжительности электрофореза усилится диффузия белков. Если же компоненты анализируемой смеси имеют различные отношения заряда к массе, то может оказаться выгодным вести разделение в крупнопористом геле

при малых значениях T), т. е. как бы в свободной жидкости, почти не используя эффект трения молекул о гель. По крайней мере, это обеспечит выигрыш во времени фракционирования.

Ориентировочно о характере различия электрофоретических подвижностей двух белков в данных условиях разделения можно судить в том случае, когда известны их молекулярные массы и изоэлектрические точки, а также содержание в них ионогенных аминокислот. Чаще всего бывают, хотя бы приблизительно, известны молекулярные массы. Если они различаются незначительно, то имеет смысл ориентироваться сначала на крупнопористый гель и попробовать варьировать рН буфера.

Пожалуй, самый существенный вывод из проведенного качественного рассмотрения — заключение об определенной свободе выбора концентрации ПААГ и, особенно, содержания в нем «сшивки» (C в пределах 2 — 5 %). В любом случае выбор значений T должен быть сделан на основе ряда пробных опытов, в которых, в частности, следует варьировать рН буфера и продолжительность электрофореза (электрофорез белков в присутствии додецилсульфата натрия пока не рассматривается).

В качестве сугубо ориентировочной можно рекомендовать следующую полученную на практике таблицу соответствия молекулярных масс разделяемых белков (M) и концентраций ПААГ (T):

M , тыс. Дальтон	T , %	M , тыс. Дальтон	T , %
10–40	15–20	100–300	5–10
40–100	10–15	>300	5

Приступая к электрофоретическому фракционированию биополимеров, необязательно в точности воспроизводить значения T и C , приведенные в литературе для сходного типа экспериментов, но выбранные однажды условия следует, разумеется, точно воспроизводить в собственной серии опытов для надежной идентификации и сопоставления положения соответствующих полос.

АГАРОЗА

Сочетание прочности и крупнопористости делает гели агарозы незаменимыми при электрофорезе особенно крупных макромолекул, в частности нуклеиновых кислот. Агароза — это особая чистая фракция природного линейного полисахарида агара, который извлекают из некоторых видов морских водорослей. В полимерной цепи агарозы чередуются β -D-галактопираноза и 3,6-ангидро- α -L-галактопираноза. Молекулярная масса ее составляет 10^4 — 10^5 . Гелеобразование идет, как уже указывалось, путем связывания в пространственную сетку пучков нитей за счет водородных связей между ними. Некоторые виды агарозы образуют прочные гели уже при концентрации 0,3%.

При температурах 84 — 96° (а у специальных типов — уже при 70°) раствор агарозы переходит в прозрачную жидкость — «плавится». Вязкость расплавленного 1%-ного раствора агарозы составляет 10 — 15 с П, что примерно соответствует вязкости 50%-ного раствора сахарозы при комнатной температуре. Растворы агарозы характеризуются ярко выраженным гистерезисом: они затвердевают, образуя гель, при значительно более низких температурах (36 — 42°). У легкоплавких типов агарозы эта температура снижается до 30°. Такая особенность облегчает манипуляции с расплавленной агарозой — можно не опасаться преждевременного ее застывания в гель. Более того, расплавленную на кипящей бане агарозу предварительно охлаждают до 50 — 55° и уже при этой температуре дозируют и заливают в формы; это удобно и не связано с возникновением значительных тепловых деформаций.

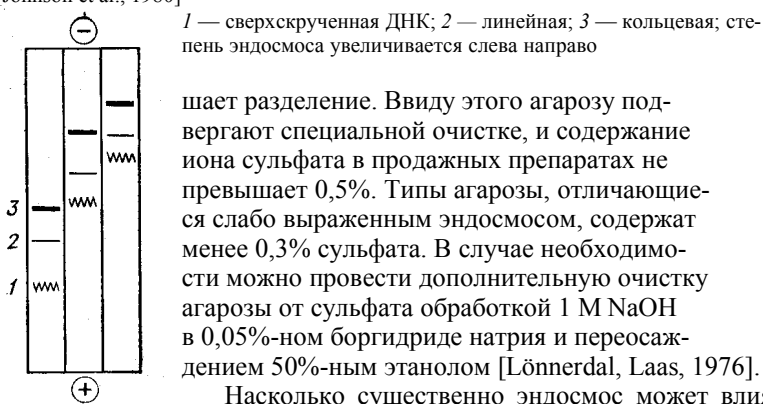
Гели агарозы не вполне прозрачны, однако это обусловлено не наличием примесей, а своего рода «кристаллизацией» геля и свидетельствует, скорее, о чистоте агарозы. Затвердевший гель представляет собой не вполне равновесную систему: со временем он несколько уплотняется, выдавливая из себя жидкость. Этот процесс идет вначале довольно быстро, а потом — очень медленно. Тем не менее гели агарозы перед опытом следует выдерживать в течение, по крайней мере, 12 ч (открытые пластины для горизонтального электрофореза выдерживают во влажной камере). Сжатие сильнее выражено у более концентрированных гелей агарозы.

Температуры плавления и гелеобразования зависят от содержания в агарозе метоксильных групп, которое может достигать 3 — 4%. Наличие этих групп затрудняет гелеобразование. В агарозе неизбежно содержатся и эфиры серной кислоты. Их присутствие существенно влияет не только на температуры плавления и застывания гелей, но и на сам процесс электрофореза. В частности, именно эфиры серной кислоты обуславливают сильно выраженное при электрофорезе в гелях агарозы явление *эндосмоса*, сущность которого сводится к следующему.

Отрицательно заряженные остатки серной кислоты неподвижно связаны с полимерными нитями агарозы. Соответствующие им положительные ионы, напротив, находятся в водной фазе и под действием электрического поля мигрируют в направлении катода. Их место занимают катионы, поступающие из анодного буфера. Возникает дополнительный ток сильно гидратированных катионов, которые увлекают за собой всю массу жидкости, находящейся внутри геля, и вместе с ней — растворенные в водной фазе геля макромолекулы. Они «дрейфуют» вместе с жидкостью, и это движение накладывается на их миграцию под действием электрического поля.

В большинстве случаев электрофорезом в агарозе разделяют отрицательно заряженные макромолекулы, мигрирующие к аноду. Эндосмос направлен в противоположную сторону и ухуд-

Рис. 4. Влияние эндосмоса в агарозном геле на характер фракционирования двунитевых ДНК одинакового размера [Johnson et al., 1980]



1 — сверхскрученная ДНК; 2 — линейная; 3 — кольцевая; степень эндосмоса увеличивается слева направо

шает разделение. Ввиду этого агарозу подвергают специальной очистке, и содержание иона сульфата в продажных препаратах не превышает 0,5%. Типы агарозы, отличающиеся слабо выраженным эндосмосом, содержат менее 0,3% сульфата. В случае необходимости можно провести дополнительную очистку агарозы от сульфата обработкой 1 М NaOH в 0,05%-ном боргидриде натрия и переосаждением 50%-ным этанолом [Lönnerdal, Laas, 1976].

Насколько существенно эндосмос может влиять на резуль-

таты электрофореза, видно из данных Джонсона и др. [Johnson et al., 1980]. Авторы использовали три типа агарозы с различной способностью к эндосмосу (значения $-m_r$ составляли соответственно 0,081, 0,175 и 0,441; см. ниже). В одном и том же опыте на параллельных полосках 1%-ной агарозы этих типов они разделяли смесь трех форм репликативной ДНК фага ФХ 174-сверхскрученной, кольцевой и линейной. С усилением эндосмоса не только происходило сильное замедление скорости миграции всех ДНК (более чем втрое), но и (что хуже) менялось взаимное расположение полос (рис. 4). По-видимому, различные формы ДНК увлекаются потоком эндосмоса по-разному.

Наличие заряженных сульфогрупп иногда обуславливает еще и неспецифическую сорбцию белков на агарозе, в результате чего полосы расплываются с образованием «хвостов».

Степень эндосмоса количественно оценивают с помощью коэффициента относительной миграции ($-m_r$). Знак «минус» здесь только напоминает о том, что за счет эндосмоса нуклеиновые кислоты «сносит» в сторону, противоположную направлению их миграции. Коэффициент представляет собой отношение скоростей миграции незаряженного полимера (за счет только эндосмоса) и сходного с ним по структуре полианиона при электрофорезе в агарозе данного типа. Для обозначения типов агарозы ниже будет использована номенклатура фирмы «Miles». По данным каталогов, в частности по значениям $-m_r$ ее нетрудно сопоставить с обозначениями других фирм, тем более что большинство из них получает свои препараты от одного и того же производителя — фирмы «Marine Colloids Inc.».

Для агарозы с малой степенью эндосмоса (тип LE) $-m_r = 0,1$ — 0,15. Для агарозы типа HE характерен сильно выраженный эндосмос ($-m_r = 0,23$ — 0,26). Агароза типа ME занимает промежуточное положение ($-m_r = 0,15$ — 0,2). Чем меньше в ага-

розе заряженных сульфогрупп, тем слабее силы электростатического отталкивания между молекулами полимера и выше их способность к связыванию водородными связями. Агароза с повышенными температурами плавления и гелеобразования (тип HGT) имеет $-m_r < 0,1$; и именно она чаще всего используется для обычного электрофореза. Вместе с тем специальная технологическая обработка (введение оксиэтильных групп) позволяет получать агарозу с малой степенью эндосмоса и пониженными температурами плавления и затвердевания — тип LGT («Sea plaque» по номенклатуре фирмы «Magine Colloids»). Такая агароза может быть полезна тем, что ее 1%-ный раствор остается жидким при физиологической температуре (37°); кроме того, плавление геля можно осуществить при температуре более низкой, чем температура денатурации ДНК. Наконец, для иммуноэлектрофореза, при котором иммуноглобулины мигрируют к катоду и эндосмос способствует, а не препятствует их разделению, была разработана специальная агароза типа НЕЕО с сильно выраженным эндосмосом ($-m_r > 0,3$). Этого удалось добиться не за счет увеличения числа сульфатов, содержание которых по-прежнему не превышает 0,3%, поэтому неспецифическая сорбция белков на агарозе этого типа почти не происходит.

Агароза для электрофореза выпускается обычно в виде лиофилизированного порошка. Для приготовления геля выбранной концентрации навеску порошка растворяют в соответствующем буфере и выдерживают на кипящей водяной бане или в термостате при $90\text{—}95^\circ$ около 2 ч для образования истинного раствора полимера. Иногда раствор агарозы просто кипятят с обратным холодильником.

Разнообразные буферы, детергенты и другие добавки смешивают с раствором агарозы в горячем виде (при $50\text{—}60^\circ$). Они не препятствуют ее застыванию. Впрочем, надо иметь в виду, что высокая концентрация агентов, диссоциирующих водородные связи, несколько затрудняет образование геля. Например, гели обычной агарозы с 6 М мочевиной плавятся за 1,5 мин при 75° , но не застывают за 1 ч. при 20° [Langridge et al., 1980].

Контакт с кислородом воздуха не мешает застыванию агарозы, поэтому плоские гели для горизонтального электрофореза готовят путем заливки дозированного объема расплавленной агарозы на строго горизонтальную стеклянную пластинку нужного размера. Тем не менее горячую смесь агарозы с буфером имеет смысл кратковременно деаэрировать под вакуумом.

Выбор концентрации агарозы, т. е. пористости ее геля, диктуется размерами фракционируемых макромолекул. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы приблизительно соответствует диаметру сферически упакованной молекулы биополимера с массой 50 млн. дальтон. Гели с более высоким содержанием агарозы используют для гель-фильтрации. При электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом

поле за счет трения, поэтому для электрофореза применяют агарозные гели с концентрацией 0,4— 2%. Ниже для ориентировки представлены примерные концентрации гелей агарозы (в %) для некоторых распространенных объектов фракционирования:

Высокомолекулярная ДНК вирусов и плазмид	0,4
Рестрикты ДНК (5 — 20 тыс. пар оснований)	0,7
мРНК, денатурированная обработкой метилртутью	1,0
Реовирусная двунитевая РНК (500 — 5000 пар оснований)	1,5
Рибосомная РНК	1,75
Нативные мРНК; рестрикты ДНК (100 — 1 000 пар оснований)	2,0

Перед заливкой в форму или на пластину раствор горячей агарозы охлаждают до 50° и выдерживают не менее 1 ч в термостате при данной температуре. Это необходимо для полного выравнивания температуры раствора по всему его объему, чем обеспечивается одновременное застывание всего геля и однородность его структуры.

СМЕШАННЫЙ ГЕЛЬ (АГАРОЗА+ПААГ)

Электрофорез крупных белков иногда бывает целесообразно вести в крупнопористом ПААГ, содержащем 1,5 — 2,5 % акриламида. Для придания прочности такому гелю его полимеризуют совместно с 0,5— 0,6% агарозы. Имеет место своеобразный «симбиоз»: чистая 0,5%-ная агароза, застывая, дает очень мягкий гель, 2%-ный ПААГ не удается даже запolyмеризовать, а их комбинация образует гели с отличными механическими характеристиками.

Пространственная сетка агарозы в силу указанных выше причин имеет гораздо более крупные поры, чем полимеризующийся внутри этой сетки ПААГ, и мало влияет на электрофоретическую подвижность белков, зато образует жесткий каркас, придающий необходимую прочность гелю в целом. Для образования такой структуры надо обеспечить условия, при которых агароза затвердевает раньше, чем полимеризуется ПААГ. Исходя из этого, подбирают концентрацию персульфата аммония и ТЕМЕД.

Агарозу растворяют в буфере с учетом последующего разбавления, прогревают, как описано выше, и выдерживают в течение часа при 50°. При этой же температуре добавляют соответствующий раствор мономеров акриламида, быстро деаэрируют смесь, вносят иницирующие добавки и немедленно заливают между подогретыми до 37° стеклами. Сначала застывает агароза; полимеризация акриламида обнаруживает себя появлением границы, лежащей на 2 — 5 мм ниже края геля агарозы. Для обеспечения формирования узкой начальной полосы препарата при вступлении его в гель имеет смысл спустя час после окончания полимеризации ПААГ снять одну стеклянную пластину и обрезать гель ниже границы полимеризации акриламида. Затем можно снова наложить пластину, зажать гель и за-

лить поверх него 0,3%-ную чистую агарозу, в которой и формировать «карманы» для внесения препаратов [Schwinghamer, Shepherd, 1980].

В качестве примера можно назвать успешное разделение путем электрофореза в смешанном геле (1,7% ПААГ + 0,5 агарозы) полисом печени мыши от мономеров до пентамеров [Nishinaga, Yamamoto, 1980].

АЦЕТАТЦЕЛЛЮЛОЗНАЯ ПЛЕНКА, ИМПРЕГНИРОВАННАЯ ПААГ

Вместо агарозы можно использовать жесткую, крупнопористую пространственную сетку ацетатцеллюлозы. Полоску этого полимера сначала помещают на поверхность раствора, где она смачивается, а затем погружают в раствор мономеров акриламида с иницилирующими добавками. ПААГ полимеризуется во всем объеме раствора, а также полоски целлюлозы. По окончании полимеризации гель с поверхности полоски можно отслоить и отмыть. Таким способом нетрудно получить «пластинку» толщиной 0,1 мм. Конец полоски следует оставить свободным от геля (не погружать). На него удобно наносить исходный белковый препарат, который легко впитывается в ацетатцеллюлозу [Frenkel, Blagrove, 1978].

Глава 2 ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГЕЛЕЙ И АППАРАТУРА

Рассмотрим основные технические приемы приготовления и использования гелей для электрофореза. Это рассмотрение целесообразно провести отдельно для трех вариантов *аналитического* электрофореза: вертикального в трубках, вертикального в пластинах и горизонтального в пластинах. Приемы препаративного электрофореза будут рассмотрены отдельно. Методы подготовки препаратов, выбора буферов и различных добавок к ним, а также условий протекания самого процесса электрофореза будут детально исследованы далее, в главах 3 и 4, посвященных описанию различных вариантов электрофоретического фракционирования белков и нуклеиновых кислот.

ВЕРТИКАЛЬНО РАСПОЛОЖЕННЫЕ ТРУБКИ

Вертикальное расположение трубок и пластин имеет то преимущество, что препарат, наносимый на гель сверху, при любом его объеме равномерно покрывает всю рабочую поверхность геля. Затруднения при вертикальном расположении могут возни-

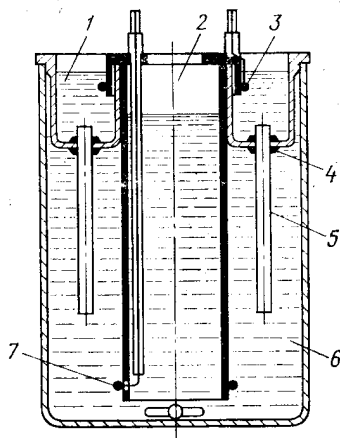


Рис. 5. Прибор для электрофореза в вертикальных трубках (в разрезе)

1 — верхний электродный резервуар; 2 — центральный цилиндр; 3 — верхний платиновый электрод; 4 — резиновая прокладка; 5 — трубочка с гелем; 6 — нижний электродный резервуар; 7 — нижний платиновый электрод

кость для гелей, недостаточно прочно сцепленных со стеклом (см. выше). Под действием собственного веса они могут постепенно сползать вниз. Реальные трудности такого рода возникают, главным образом, в случае препаративного электрофореза, когда соотношение поверхности и объема колонок геля способствует его сползанию.

Все приборы с вертикальным расположением гелей конструктивно сложнее, чем аппараты с горизонтальным расположением, так как верхний электродный резервуар должен быть поднят над гелем. Приходится заботиться об уплотнениях в местах сочленения его с трубками или пластинами. В приборах с трубками для уплотнения обычно служат резиновые кольцевые прокладки, укрепленные в отверстиях на дне верхнего резервуара. Схема такого прибора показана на рис. 5.

Трубки (12 — 18 ш. тук) с уже запolyмеризованным в них гелем вставляют снизу в резиновые прокладки так, чтобы их верхние концы выступали над дном резервуара. Если используют не все трубки, то на их место ставят заглушки. Собранный вместе с трубками верхний электродный резервуар устанавливают на нижний так, чтобы концы трубок оказались на некотором расстоянии от дна последнего и заполняют нижний резервуар электродным буфером, нередко до такого уровня, что трубки оказываются почти полностью погруженными в буфер. Это делается для улучшения теплоотвода в процессе электрофореза. С этой же целью нижний буфер перемешивают магнитной мешалкой или вводят дополнительную систему с циркуляцией охлаждающей воды. Оба резервуара цилиндрической или прямоугольной формы изготавливают из плексигласа, что позволяет следить за продвижением фронта красителя в процессе электрофореза. В резервуарах должны быть закреплены электроды из платиновой проволоки. Нижний электрод при этом должен располагать-

ся так, чтобы поднимающиеся от него пузырьки газа не попадали на нижние торцы трубок, что создавало бы помехи протеканию через них тока. Объемы электродных резервуаров достаточно велики, чтобы рН находящегося в них буфера не изменялся под влиянием продуктов электролиза.

Стекланные тонкостенные трубки, в которых ведут электрофорез, чаще всего имеют внутренний диаметр 5 —6 мм и длину около 10 см. Фирма «Bio-Rad» в своем приборе модели 155 предлагает широкий набор трубок с внутренним диаметром от 2 до 14,6 мм и длиной от 7,5 до 30 см. Их можно монтировать в пяти сменных верхних резервуарах. Торцы трубок отшлифованы. При изготовлении трубок в лаборатории не следует оплавливать их в пламени горелки во избежание образования незаметного на глаз сужения, которое будет мешать извлечению геля после окончания электрофореза.

Для заливки и полимеризации геля нижние торцы трубок заклеивают парафильмом или лейкопластырем и устанавливают их строго вертикально в штатив. Деаэрированный раствор мономеров сразу после добавления и надежного смешивания с ним раствора персульфата аммония заливают по стенке трубки из пипетки с полиэтиленовым наконечником так, чтобы верхний участок трубки, предназначенный для внесения препарата, оставался сухим. Затем осторожно по стенке наслаивают воду или изобутанол и ведут полимеризацию, как описано в предыдущем разделе. Если готовят гель для ступенчатого электрофореза (см. ниже), то после окончания полимеризации нижнего (рабочего) геля воду стряхивают, споласкивают поверхности буфером верхнего (формирующего) геля и точно так же заливают слой раствора мономеров верхнего геля, а затем наслаивают на него воду или изобутанол. Перед установкой готовой трубки с гелем в прибор парафильм снимают, а ее свободный конец промывают верхним электродным буфером.

Собрав прибор, заливают буфер в верхний электродный резервуар. При полимеризации геля часть трубки с верхнего ее конца оставляют свободной, и туда при заливке попадает электродный буфер. Затем под него, на поверхность геля, пипеткой с оттянутым полиэтиленовым наконечником наслаивают препарат, в который добавляют предварительно 5 —10 % сахарозы. Наконечник пипетки не следует подносить вплотную к поверхности геля; препарат должен выливаться с высоты 2 —3 мм над гелем и свободно растекаться по его поверхности за счет своей повышенной плотности. При любом варианте электрофореза надо быть уверенным в том, что исходный препарат свободен от взвешенных частиц (пыли или осадков), которые будут собираться на торце геля и нарушать однородность тока по его сечению, что повлечет за собой деформацию разделяющихся зон. В этом случае препарат следует отфильтровать или очистить центрифугированием.

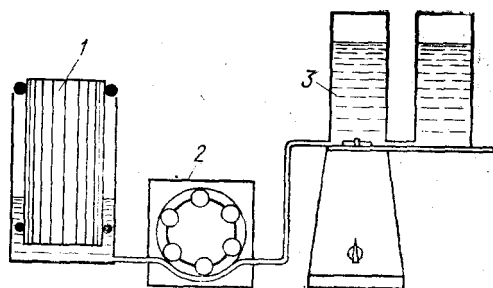


Рис. 6. Система для образования линейного градиента концентрации ПААГ в трубках
 1 — пачка трубок; 2 — перистальтический насос; 3 — смеситель градиента

Выше уже упоминалось о возможности использования градиента пористости геля с изменяющимся по его длине, т. е. по высоте трубки, содержанием акриламида. Были также приведены соображения, касающиеся подбора концентраций иницирующих добавок в этом случае. Преимущества таких «градиентных» гелей будут рассмотрены ниже. Для получения градиентных гелей используют такие же смесительные устройства, как при создании градиентов плотности сахарозы для ультрацентрифугирования. В этом случае также можно получать линейные и нелинейные градиенты, «выпуклые» и «вогнутые», в том числе экспоненциальные.

В смеситель можно поместить раствор мономеров с максимальным содержанием акриламида, а в резервуар смесительного устройства — соответственно разбавленный раствор. Затем можно заливать закрытую снизу трубку по стенке подобно центрифужной пробирке, однако это довольно неудобно ввиду малого объема трубки (2 — 4 мл). Кроме того, почти всегда желательно иметь несколько трубок с заведомо одинаковой формой градиента, поэтому лучше заливать одновременно целую пачку параллельно расположенных трубок. Всю пачку, скрепив ее резинками, закрепляют вертикально в стакане таким образом, чтобы нижние торцы трубок были слегка приподняты над его дном. Через отросток, припаянный у дна стакана (или через одну из трубок), насосом подают градиент смеси мономеров (рис. 6). Заполнение трубок идет снизу вверх, поэтому в смесителе градиентного устройства должен находиться раствор мономеров малой концентрации, а в резервуаре — концентрированный раствор. В него следует добавить до 10% сахарозы, чтобы по мере поступления в стакан с трубками плотность жидкости заметно увеличивалась одновременно с повышением содержания акриламида. Это обеспечит равномерное оттеснение менее концентрированных слоев вверх по трубкам. По окончании заполнения в каждую трубку следует наслоить одинаковое (и минимально необходимое) количество воды или изобутанола. Еще лучше начинать заполнение трубок с воды, а в раствор мономеров, находящийся в смесителе, добавить 2% сахарозы.

Следует помнить о необходимости промывки смесительного устройства и системы подачи растворов в стакан сразу после окончания их использования, до того как в них произойдет полимеризация акриламида. Разумеется, для этого всю систему нужно отсоединить от стакана, зажав предварительно подводящую к нему трубку.

По окончании полимеризации всю пачку трубок следует извлечь из стакана, разнять, с каждой удалить гель (снаружи) и обрезать его излишек у нижнего конца. Возможно, хотя технически и более сложно, создание линейного градиента ПААГ за счет перемешивания двух одинаковых по высоте слоев раствора мономеров разной концентрации в наклонном положении [Lorentz, 1976].

В описанном приборе для вертикального электрофореза электрическая цепь надежно замыкается непосредственными контактами обоих концов трубок с электродными буферами. Однако надо следить за тем, чтобы на нижних торцах гелей не было пузырьков воздуха, оставшихся там с момента погружения трубок в нижний резервуар. Пузырьки можно удалить струей жидкости, направленной из шприца с согнутой иглой.

По окончании электрофореза гель из трубки извлекают. В большинстве случаев это легко сделать с помощью длинной и затупленной иглы шприца, которую вводят с одного из концов трубки, круговыми движениями постепенно отслаивая гель от ее стенок. Если необходимо, такую операцию повторяют и с другого конца. Через иглу при этом поступает вода из закрепленного несколько выше иглы резервуара (или от насоса). Если гель отслаивается с трудом, в воду можно добавить 0,5 — 1 % какого-нибудь детергента. Во избежание поломки следует дать гелю возможность выскользнуть из трубки в сосуд с водой, над которым проделывают описанную манипуляцию. Иногда для удаления геля из очень длинных трубок по его периферии с концов трубки впрыскивают глицерин, а сам гель выталкивают водой из присоединяемого к трубке шприца. Если гель высокой концентрации вынуть не удастся, его приходится замораживать, а трубку разбивать молотком. Иногда можно решить проблему путем вымачивания трубки с гелем в метаноле: гель постепенно съезживается и отстает от стенки.

Основным недостатком электрофореза в трубках является затрудненный отвод тепла даже при диаметре 5 мм. На оси геля температура оказывается выше, чем у его прилегающей к стеклу поверхности. Это приводит к изгибу зон и соответственно окрашенных полос, поскольку электрофоретическая подвижность зависит от температуры. В условиях хорошего теплоотвода можно вести микроэлектрофорез в стеклянных капиллярах диаметром 0,7 — 1,5 мм [Condeelis, 1977].

ВЕРТИКАЛЬНО РАСПОЛОЖЕННЫЕ ПЛАСТИНЫ

Для электрофореза белков обычно используют пластины шириной 8—14 см и длиной (в направлении электрофореза) 8—28 см. Электрофорез нуклеиновых кислот и их фрагментов, например при секвенировании, нередко ведут в больших пластинах размером 33 × 43 см, что диктуется максимальным размером рентгеновской пленки для автордиографии. Для разделения гидролизатов тРНК Пиртл и др. недавно использовали пластины ПААГ длиной 90 см [Pirtle et al., 1980].

Полимеризацию акриламида или застывание агарозы, а затем и сам электрофорез ведут в форме, образованной двумя пластинами зеркального стекла толщиной 5—6 мм. Расстояние между пластинами задается толщиной прокладок из тефлона или плексигласа («спейсеров») и определяет толщину геля. Прокладки шириной 10—15 мм устанавливают вдоль боковых краев стекол. Для аналитических целей, как правило, используют пластины геля (и соответственно прокладки) толщиной от 0,4 до 1,5 мм. Эти же прокладки можно использовать и для уплотнения формы во время нахождения в ней еще не затвердевшего геля. Для этого устанавливают еще одну прокладку точно такой же толщины (фрезеровать совместно!) по нижнему краю стекол и плотно прижимают ее к фрезерованным торцам боковых прокладок.

Хорошо подогнанные тефлоновые прокладки в силу гидрофобности материала можно не смазывать. Прокладки из плексигласа смазывают силиконовой смазкой. Тонкий валик смазки из шприца без иглы наносят сначала с одной стороны трех хорошо промытых детергентом прокладок (примерно посередине), а также на нижние торцы двух из них (боковых). Боковые прокладки накладывают на одно из стекол формы смазкой вниз и к ним вплотную придвигают так же уложенную нижнюю прокладку. Руками (в перчатках) прижимают прокладки к стеклу, следя за тем, чтобы смазка не выдавливалась из-под них в полость формы. На образовавшуюся таким образом П-образную прокладку снова так же наносят сплошной валик смазки по всему периметру и накладывают второе стекло. Всю систему зажимают по трем сторонам пружинными зажимами для бумаг.

При заливке агарозы уплотнение формы можно осуществить проще — заклеить торцы стекол липкой лентой (лейкопластырем). Нижнюю прокладку при этом можно не устанавливать. Уплотнение не будет совершенным, но агароза в контакте с прокладками и лентой быстро застынет и заметного ее вытекания не произойдет. Для надежности можно сначала залить небольшой слой агарозы и дать ей застыть в нижней части формы, а потом залить остальной ее объем.

Описано применение в качестве прокладки П-образной полоски силиконовой резины с разрезом, позволяющим отнимать ее нижнюю часть после полимеризации геля. Такая прокладка

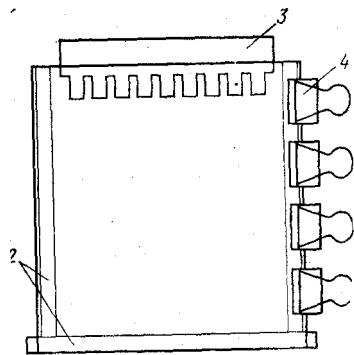
не нуждается в смазке [Stein, Varricchio, 1974]. Можно вместо нижней прокладки сделать в нижней части формы «пробку» из ПААГ повышенной концентрации. Для этого собранные с боковыми прокладками пластины (или пачку пластин) устанавливают в корытце, заполненное раствором мономеров с иницилирующими добавками, так, чтобы заполнить нижнюю часть формы на высоту 1 см и захватить при этом концы боковых прокладок. Для успешной полимеризации на раствор мономеров наслаивают воду. После полимеризации геля во всем объеме корытца и внутри формы пластины вынимают и лишний ПААГ обрезают. Перед заливкой рабочего геля следует отсосать воду над пробкой и промыть поверхность буфером геля. Фирма «Bio-Rad» предлагает для заливки пластин геля простое устройство, позволяющее с помощью винтов прижать собранные с боковыми прокладками стекла нижними торцами к полоске мягкой резины. Иногда, особенно для гелей толщиной менее 1 мм, нижнее уплотнение осуществляют просто пластилином.

Собранную и уплотненную одним из описанных способов форму устанавливают вертикально и заливают в нее раствор мономеров ПААГ или расплавленную агарозу. Впрочем, ПААГ толщиной 0,4 мм можно заливать в наклонном, а полимеризовать — в горизонтальном положении пластин. Это значительно упрощает задачу герметизации формы: достаточно оклеить ее по торцам пластин водостойкой липкой лентой.

В аналитических опытах на каждой пластине обычно ведут электрофорез нескольких препаратов, состав которых можно затем сопоставить при идентичных условиях разделения. Как было показано на фотографии (см. рис. 3), сопоставляемые препараты фракционируют в параллельных друг другу «треках».

В ходе полимеризации на верхнем крае геля формируют ряд одинаковых углублений прямоугольной формы — «карманов», куда затем и вносят различные препараты. Для этого в еще не запolyмеризовавшийся гель или горячую агарозу вставляют «гребенку» из тефлона или плексигласа такой же или чуть меньшей толщины, чем прокладки между стеклами. Прямоугольные зубцы гребенки и формируют карманы для препаратов. На рис. 7 изображена собранная форма с вставленной в гель гребенкой. На боковом сечении можно видеть, что верхняя часть гребенки немного толще, чем нижняя (с зубцами). Это удобно, так как гребенка ставится каждый раз одинаково и ровно — до упора выступа о торец стеклянной пластины. Кстати, на рис. 7 показаны и прокладки (пунктир). Можно заметить, что нижнюю прокладку делают чуть длиннее ширины стекол, так что ее концы выступают наружу. За эти концы нижнюю прокладку и вынимают из формы после застывания геля. Для ясности на чертеже показаны только три зажима (с правой стороны пластин).

Гель или агарозу заливают между пластинами с таким расчетом, чтобы при опускании гребенки до упора жидкий гель заполнил промежутки между ее зубцами. Гребенку начинают



в него устанавливают гребенку.

Рис. 7. Форма для полимеризации вертикальной пластины геля

1 — стеклянные пластины; 2 — прокладки; 3 — гребенка; 4 — зажим

вставлять с некоторым переко- сом, чтобы под ее зубцами не за- держивались пузырьки воздуха. Для этой цели торцы зубцов предварительно смачивают, по- терев их о стекло с налитым на него раствором акриламида. В тех случаях, когда готовят двухслойный гель, по окончании полимеризации нижнего геля во- ду отсасывают, поверхности про- мывают буфером верхнего геля, заливают этот последний и уже

Когда гель готов, вынимают нижнюю прокладку или снимают липкую ленту и осторожно вы- таскивают гребенку. При работе с концентрированным ПААГ гель

может прилипать к зубцам

гребенки и нижние плоскости карманов могут оказаться не- ровными. Это ухудшает условия формирования исходных полос в геле.

В таком случае имеет смысл ввести еще один слой геля пониженной концентрации и гребенку устанавливать в него. На границе между двумя слоями разной пористости полоса ис- ходного препарата будет выгодным образом сужаться.

Перегородки между близко расположенными карманами в агарозе малой концентрации могут оказаться непрочными. Опи- сан вариант формы, в которой одну из пластин изготавливают из плексигласа с рядом фрезерованных узких перегородок в ее верхней части, выступающих на всю толщину зазора между пла- стинами. Гребенку вставляют между этими перегородками, но не на всю их длину. Зубцы гребенки хорошо подогнаны по ши- рине интервалов между перегородками, так что форма оказыва- ется уплотненной с ее будущего верхнего края. Перевернув фор- му, заливают агарозу с противоположной стороны. После за- стывания агарозы и удаления гребенки карманы для препаратов оказываются разделенными перегородками из плексигласа, кон- цы которых погружены в гель [Sugden et al., 1975].

Для получения пластин с градиентом пористости геля по вы- соте используют те же приемы, что описаны выше. Для одной пластины смесь подают на дно формы через тонкую стеклянную трубку, прижатую к боковой прокладке. Разумеется, в этом слу- чае смеситель градиентного устройства должен содержать смесь мономеров малой концентрации, а резервуар — более концент- рированную смесь с добавкой сахарозы. Чтобы не нарушить гра- диента при вынимании трубки, ее можно оставить в полимери- зующемся геле.

Возможно одновременное заполнение целой стопки открытых снизу форм для геля (без нижних прокладок), которое проводят в сосуде прямоугольной формы, как описано выше для пучка трубок. Фирма «Pharmacia» (Швеция) предлагает для этой цели специальный сосуд прямоугольного сечения, где два любых набора могут быть зажаты с помощью клиньев, скользящих по двум наклонным плоскостям. Градиент концентрации акриламида подают на дно каждого из двух отделений сосуда через отдельные штуцеры. На фотографии (рис. 8) в сосуд установлена только одна пачка пластин. Бесполезный расход акриламида и загрязнение им пластин снаружи при использовании такого сосуда сведены до минимума. Подобного рода устройство из плексигласа для пластин любого размера легко изготовить в лаборатории. Кстати, в нем удобно заливать и обычные, не градиентные гели. Еще проще стопку пластин с боковыми прокладками безо всякой герметизации поместить в полиэтиленовый мешок, плотно обернуть его вокруг пластин, зажать всю стопку и залить обычный гель прямо в мешок. После полимеризации мешок снимают, а излишки геля с нижних концов пластин обрезают [Kerckaert, 1978].

Линейный градиент пористости геля в пластине или трубках можно создать смешиванием двух слоев растворов мономеров разной концентрации путем многократного переворачивания пластины или трубок в наклонном положении.

В литературе описано много конструкций приборов для электрофореза в вертикальных пластинах. Ряд моделей предлагают различные фирмы. Наибольшее распространение получила конструкция прибора из плексигласа, предложенная Стадьером (рис. 9) [Studier, 1973]. Ее легко реализовать и в лабораторных условиях. Верхний и нижний электродные резервуары прямоугольной формы соединены вертикальной стенкой, в которой имеется вырез, ведущий в полость верхнего резервуара. Такой же вырез имеет одна из двух стеклянных пластин, между которыми полимеризуется гель. Пластины прижимают пружинными зажимами к вертикальной стенке так, чтобы оба выреза совпали. Буфер в верхний резервуар заливают до такого уровня, чтобы он через вырез покрывал верхний торец геля. При этом вторая, не вырезанная, стеклянная пластина выступает в роли передней стенки резервуара. В месте совмещения двух вырезов, между стеклянной пластиной и стенкой, должно быть осуществлено уплотнение, препятствующее вытеканию верхнего буфера. Стадьер использовал для этой цели заливку агаром. Фирма «Bio-Rad» в своих моделях 220 и 221 использует ту же конструкцию, но обеспечивает уплотнение с помощью резиновой прокладки.

В оба резервуара вмонтированы электроды из платиновой проволоки. При установке в прибор форму с гелем частично погружают в буфер нижнего резервуара, так что она опирается там на разнесенные по сторонам выступы и ее нижний торец

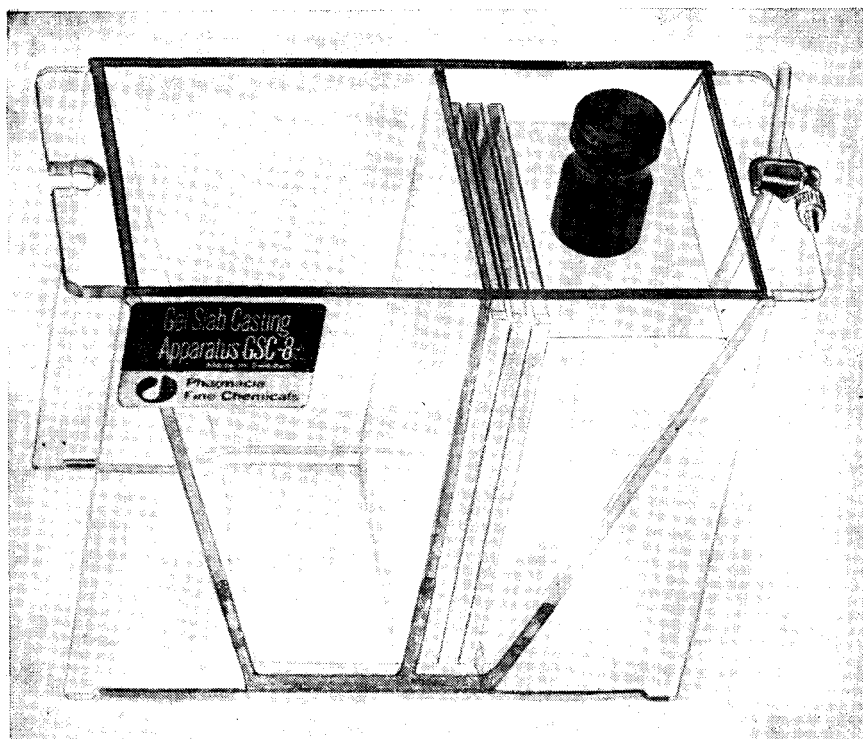


Рис. 8. Сосуд для формирования градиента концентрации ПААГ в пластинах (фирмы «Pharmacia»)

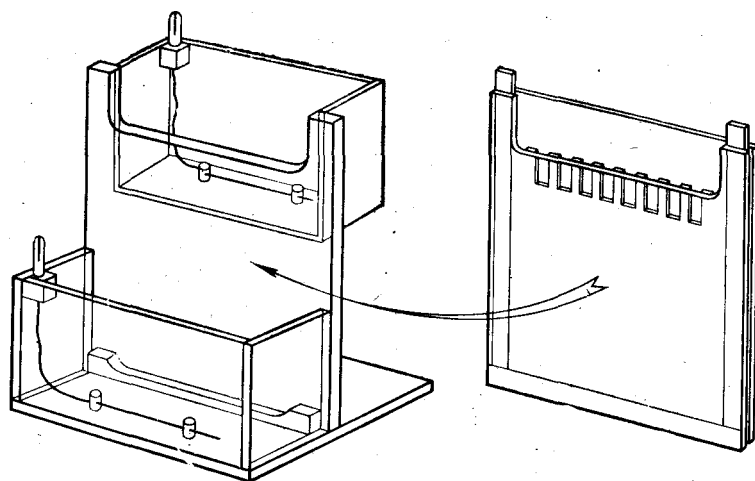


Рис. 9. Прибор Стадиера для электрофореза в вертикальных пластинах [Stauder, 1973]

оказывается приподнятым над дном резервуара. После погружения надо внимательно проверить, не осталось ли между пластинами и на торце геля пузырьков воздуха. Их можно удалить струей жидкости из согнутой иглы шприца.

Препараты с добавленной в них сахарозой или глицерином вносят в карманы геля после окончательной сборки прибора так же, как и в трубки, т. е. подслаивают их под электродный буфер на дно каждого из карманов. Их можно заполнять препаратом (постепенно поднимая кончик пипетки) почти на полную высоту. Приемы заполнения были описаны выше.

Недавно был предложен очень простой, целиком (включая пластины для геля) изготовленный из плексигласа прибор для вертикального электрофореза в пластинах [Broadmeadow, Wilce, 1979]. В нем используется схема Стадиера, но пластины по всей высоте омываются и охлаждаются с обеих сторон электродным буфером. Верхний и нижний буферы непрерывно перемешиваются и охлаждаются, проходя через находящийся вне прибора змеевик. Этим компенсируется худшая, чем у стекла, теплопередача через плексиглас. Для гелей малой концентрации этот прибор, по-видимому, непригоден ввиду относительно слабого сцепления ПААГ с плексигласом.

Некоторые фирмы используют для пластин такой же способ установки в прибор, что и для трубок. Пластины вставляют снизу через прорезы в дне верхнего электродного резервуара. Уплотнение осуществляют при помощи резиновых прокладок прямоугольного сечения. Собранные формы с гелем закрепляют за счет трения в прорезях прокладок («Bio-Rad», «Pharmacia») либо прижимают к ним шлифованными торцами («Desaga»). В любом случае пластины должны быть изготовлены точно, поэтому приходится ограничиваться использованием фирменных пластин и гелей определенной толщины.

Необходимость интенсивного теплоотвода от большой поверхности пластин заставляет некоторые фирмы вводить в прибор для электрофореза змеевик с охлаждающей жидкостью и насос, обеспечивающий циркуляцию электродных буферов. Впрочем, в случае тонких гелей воздушное охлаждение оказывается вполне достаточным. Протекающий ток нагревает гель до некоторой равновесной температуры, но в тонком слое геля эта температура оказывается практически одинаковой по всему его сечению. Именно это обстоятельство является решающим для обеспечения хорошего качества разделения.

В приборе Стадиера можно обойтись и без вырезов в стенке и пластине, а также без уплотнения, если электрическую цепь между верхним буфером и гелем замкнуть через смоченные тем же буфером фитили из фильтровальной бумаги [De Wachter, Fiers, 1971]. Конструкция прибора становится совсем простой, и отпадает необходимость делать вырезы в стеклянных пластинах. Тем не менее этот способ нельзя рекомендовать во всех случаях аналитического электрофореза, так как он имеет один недоста-

ток: открытые фитили могут неконтролируемым образом несколько обсыхать. Это приводит к изменению их электрического сопротивления, а следовательно, напряжения и тока, текущего через гель (см. ниже).

По окончании электрофореза пластины разнимают, отслаивая одну из них от геля с помощью шпателя. Его всовывают между пластинами со стороны карманов и слегка поворачивают. Эту операцию не следует форсировать; лучше сначала пройти шпателем с легким нажимом вдоль всего края пластины, наблюдая за тем, как между стеклом и гелем постепенно проникает воздух, а потом уже приподнять пластину. Со второй пластины гель снимают руками и переносят в ванночку для фиксации или окраски. Хотя всегда есть возможность поднять гель с пластины за «нерабочий» конец, лучше все же работать в перчатках. Случайное прикосновение кожи рук к рабочей поверхности геля при современных чувствительных методах окрашивания может оставить на геле артефактное белковое пятно. При автордиографии влажный гель, лежащий на одной пластине, можно прямо заворачивать в полиэтиленовую пленку.

ГОРИЗОНТАЛЬНО РАСПОЛОЖЕННЫЕ ПЛАСТИНЫ

Преимущество такого расположения — не только в компактности прибора, но и в отсутствии проблемы уплотнения. Оба электродных буфера находятся в резервуарах, расположенных ниже уровня горизонтального столика, на который кладут гель. Естественно, что этот столик используется и для отвода тепла от пластины геля — в его каналах циркулирует охлаждающая вода.

Гель, полимеризованный на тонкой стеклянной пластинке, помещают на столик открытой поверхностью кверху, поскольку препарат вносят не с торца геля, а в ряд специальных «колодцев», расположенных на некотором расстоянии от его края. Электрическая цепь замыкается через 8 — 10-слойные фитили из фильтровальной бумаги, одним концом погруженные в электродные резервуары, а другим — прижатые к гелю с перекрытием в 10 — 12 мм (рис. 10, 11). При наложении фитилей на гель следует внимательно следить за отсутствием воздушных пузырей между ними.

Показанные на рис. 10 перегородки в электродных камерах препятствуют конвекционному переносу продуктов электролиза от электродов к концам фитилей. В ходе электрофореза на аноде образуется свободная кислота, а на катоде — щелочь, которые по плотности отличаются от электродных буферов, а это может вызвать конвекцию. Если электрофорез идет более 24 ч, электродные буферы следует заменять. Если же они одинаковы и между электродными резервуарами обеспечена циркуляция жидкости, то кислота и щелочь взаимно нейтрализуются — и буфер можно не заменять. В изображенном на схеме приборе

«Мультифор» (ЛКВ, Швеция) циркуляция буфера не предусмотрена, но объем каждой камеры составляет 1,2 л.

Во избежание подсыхания фитилей и геля прибор во время работы закрывают прозрачной крышкой (рис. 12), которую иногда называют антиконденсационной. Она предохраняет гель в случае существенного охлаждения от конденсации на его поверхности влаги из окружающего воздуха. Впрочем, сама крышка изнутри может запотевать за счет влаги, испаряющейся с фитилей, особенно в случае их перегрева. Это ухудшает условия наблюдения за ходом электрофореза, поэтому в аналогичном по конструкции приборе фирмы «Bio-Rad» (модель 1415) по периметру крышки у ее краев с внутренней стороны проходит трубка с охлаждающей водой. Пары влаги конденсируются на трубке, оставляя крышку прозрачной. Электродные резервуары у этого прибора съемные, что облегчает их промывку. В качестве фитилей используется специально обработанная целлюлоза с повышенной влагоемкостью.

Рис. 10. Схема прибора «Мультифор» для электрофореза в горизонтальных пластинах (фирмы ЛКВ)

1 — антиконденсационная крышка; 2 — электродный резервуар; 3 — колодец для внесения препарата; 4 — гель; 5 — фитиль; 6 — охлаждающий столик

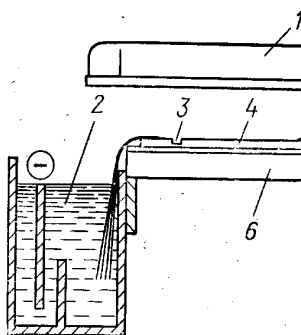
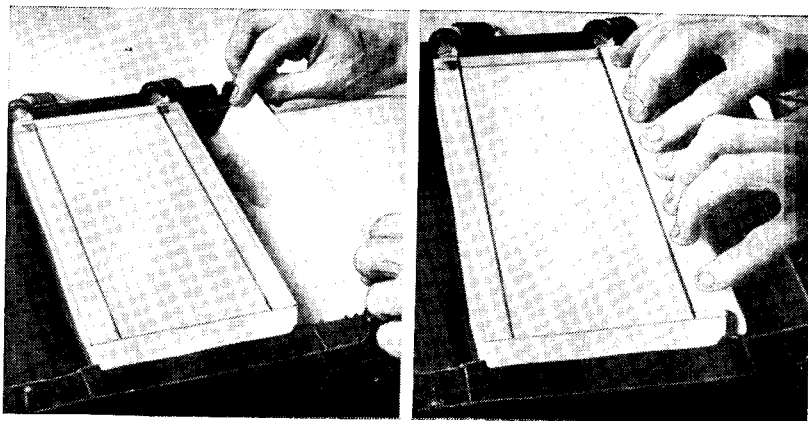


Рис. 11. Наложение фитилей на гель в приборе «Мультифор»



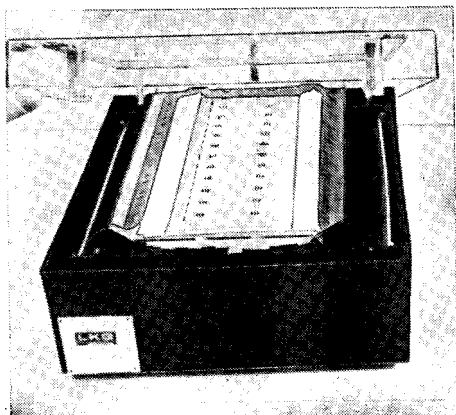


Рис. 12. Наложение антиконденсационной крышки



Рис. 13. Внесение препарата в колодцы геля

Описанные приборы не предъявляют строгих требований к качеству полимеризации геля у его краев, поскольку края геля не участвуют в электрофорезе. Полимеризацию пластины ПААГ для прибора «Мультифор» ведут в форме, уплотненной по всем четырем краям сплошной резиновой прокладкой. У одного из своих углов она разрезана, и через этот разрез, слегка отогнув прокладку, заливают раствор мономеров в форму. Последняя образована двумя пластинами: стеклянной (толщиной 1 мм) и толстой плексигласовой. На стеклянной пластине гель остается во время электрофореза. Пластины из плексигласа после полимеризации геля снимают; на ней имеется ряд прямоугольных выступов, которые при заливке формируют колодцы для внесения препаратов. Колодцы имеют фиксированный объем (для «Мультифора» — 5 и 10 мкл). В таком же объеме надо вносить и препарат, чтобы он заполнял все сечения геля, но не разливался по его поверхности. Для этого препарат дозируют микрошприцем (рис. 13).

При сборке формы на стеклянную пластину накладывают еще одну толстую пластину из плексигласа и все вместе зажимают пружинными зажимами. Здесь нет необходимости наглаивать воду, да и к материалу уплотнительной прокладки можно не предъявлять высоких требований, поскольку в контакте с ней гель может и не полимеризоваться. После освобождения геля оставшийся раствор мономеров по его краям можно убрать фильтровальной бумагой. Для облегчения разборки формы ее следует охладить в холодильнике.

Перед использованием ПААГ желательно выдержать не менее 12 ч обернутым в полиэтиленовую пленку во избежание подсыхания. Гели, содержащие додецилсульфат натрия (ДДС-Na),

не следует хранить в холодильнике, так как ДДС-Na может выпасть в осадок. При установке пластины с гелем на охлаждающий столик следует налить на него несколько миллилитров раствора детергента, чтобы обеспечить хороший тепловой контакт между столиком и пластиной. До этого имеет смысл провести на столике водонесмываемым фломастером две линии на расстоянии примерно 15 —20 мм от каждого из противоположных краев. Эти линии будут видны через гель и помогут ровно уложить края фитилей, что немаловажно для создания в геле однородного электрического поля.

Следует быстро вносить препараты в колодцы и сразу же начинать электрофорез, так как бромфеноловый краситель склонен диффундировать в геле. В процессе разделения нужно следить за тем, чтобы колодцы с оставшимся в них буфером препарата не обсыхали. Это нежелательно, так как искажает распределение тока по сечению геля. В ходе электрофореза можно пополнять колодцы буфером или с самого начала добавить в препарат 10—20% глицерина.

После электрофореза можно хранить гель на том же стекле, обернув его целлофаном, или предварительно перенести на металлическую фольгу. Можно положить на гель фильтровальную бумагу, которая хорошо к нему прилипает, и снять стекло. На этой же бумаге (после фиксации и окрашивания) гель можно и высушить.

Пластины для горизонтального электрофореза в агарозе можно приготовить чрезвычайно просто. На горизонтально установленную (по уровню) плоскость кладут тонкое стекло определенного размера и на него выливают расплавленный раствор агарозы в буфере. Его объем надо рассчитать или подобрать так, чтобы получить пластину нужной толщины. Колодцы для препаратов в этом случае можно и не делать. Фирма LKB рекомендует наносить препараты прямо на поверхность агарозы через прорези наложенного на пластину специального шаблона со щелями. Препарат объемом 2 —4 мкл вносят в щель шаблона, откуда он полностью впитывается в агарозу. Впрочем, сравнительно простое приспособление, смонтированное на столике для заливки, позволяет установить над пластиной (перпендикулярно к ее плоскости) гребенку и с ее помощью при заливке агарозы образовать колодцы для препаратов. Перед использованием пластину агарозы тоже следует выдержать во влажной атмосфере в течение суток.

При электрофорезе нуклеиновых кислот в агарозе используют относительно большие токи, которые могут нагревать фитили из фильтровальной бумаги. Было предложено фитили делать тоже из агарозы — заливкой ее 1 —2 %-ного раствора в специальные камеры; описаны конструкции соответствующих приборов [Kaplan et al., 1977; McDonell et al., 1977; Herrick, 1980]. На рис. 14 показан разрез одного из таких простых приборов. В приборе фирмы «Bio-Rad» (модель 1415) фитилями из 0,5%-

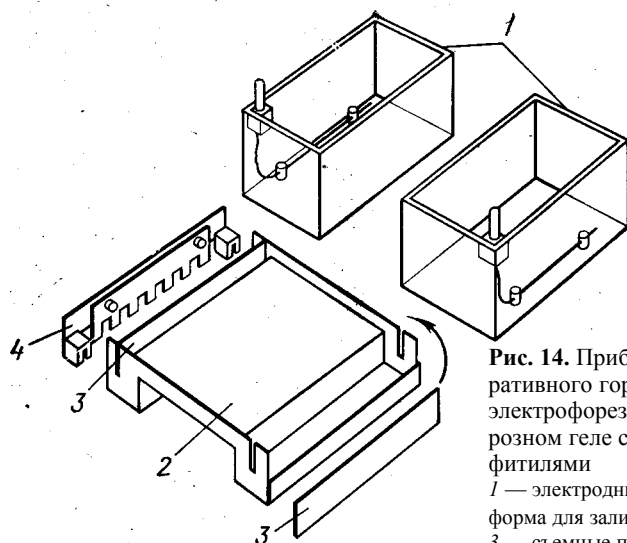


Рис. 14. Прибор для препаративного горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле с агарозными фитилями
 1 — электродные резервуары; 2 — форма для заливки агарозы; 3 — съемные перегородки; 4 — гребенка

ного геля агарозы толщиной 6 мм оснащены специальные мостики, на которых можно вести препаративный электрофорез ДНК в пластинах геля агарозы толщиной до 1 см.

Вместе с тем для работы с микроколичествами препарата описано приготовление гелей для горизонтального электрофореза толщиной 0,1 мм на предметных стеклах. После высушивания такой гель образует настолько тонкую, не заметную глазом пленку, что она позволяет вести автордиографию даже меченых ^3H препаратов [Amaldi, 1972].

Высоковольтный горизонтальный электрофорез в пластинах ПААГ толщиной 0,5 мм был использован для секвенирования нуклеиновых кислот. Для улучшения теплоотвода гель размером 30 × 50 см, подложив под него тонкую пленку, укладывали на металлический охлаждающий столик самодельного прибора, накрывали еще одной пленкой и плотно, по всей поверхности прижимали к столику давлением наполненной воздухом подушки [Kutateladze et al., 1979].

Глава 3

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

В двух предыдущих разделах были детально описаны практические приемы подготовки и проведения опытов по электрофорезу. Это позволяет приступить к подробному анализу, систематизации и сопоставлению физической сущности и потенциальных возможностей многочисленных и разнообразных вариантов этого метода, развитых за последние годы. В главах 3 и 4 мы попытались представить более или менее целостную картину бурного развития электрофоретических методов исследования белков и нуклеиновых кислот по состоянию на середину 1980 г. Главная задача из рассмотренных ниже вариантов. Однако следует еще раз подчеркнуть абсолютную необходимость совершенного овладения описанной выше техникой эксперимента, без которой попытки реализации самых блестящих замыслов заранее обречены на провал.

Из множества рассмотренных ниже экспериментальных работ в интересах экономии места и концентрации внимания на главном будут взяты только самые существенные количественные данные. Не следует пытаться по ним воспроизвести эти работы — для этого необходимо тщательно изучить цитируемый первоисточник.

Рассмотрению конкретных вариантов в обеих главах предпосланы довольно подробные замечания общего характера, которые постоянно следует иметь в виду при анализе и сопоставлении этих вариантов.

ЗАМЕЧАНИЯ ОБЩЕГО ХАРАКТЕРА

Миграция белков в геле

Ранее было показано, что электрофоретическая подвижность биополимеров в геле (u') пропорциональна их подвижности в свободной жидкости (u_0), которая определяется отношением суммарного заряда макромолекулы к ее массе. Фактором, обуславливающим отличие u' от u_0 , является сила трения о гель, которая зависит от соотношения линейных размеров макромолекул и пор геля, а следовательно, от молекулярных масс белков и концентрации ПААГ. Молекулярные массы подавляющего большинства индивидуальных белков не превышают 500000. Поэтому использование гелей агарозы оказывается нецелесообразным, кроме тех случаев, когда разделение белков хотят вести только по величине отношения заряда к массе. Как правило, электрофорез белков проводят в ПААГ, содержащем 5 — 20% акриламида.

Белки являются, цвиттерионами. Их суммарным зарядом, а следовательно и отношением заряда к массе, можно управлять

путем изменения рН буфера, в котором полимеризуют ПААГ и ведут электрофорез и который далее будем именовать рабочим. Очевидно, что оптимальное значение рН рабочего буфера обуславливает не максимальный заряд, а максимальное *различие* зарядов разных белков, составляющих исходную смесь. Поэтому в большинстве случаев нецелесообразно использовать экстремальные величины рН рабочего буфера, слишком удаленные от изоэлектрических точек всех белков смеси. Для обычных кислых белков оптимальные значения рН буфера оказываются в нейтральной или слабощелочной области; миграция белков идет в направлении от катода к аноду. Для щелочных белков (гистонов, белков рибосом и др.) целесообразно использовать слабокислые буферы (рН 4 —5). Эти белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют в направлении от анода к катоду.

Несмотря на малое количество фракционируемого белка, от рабочего буфера требуется существенная емкость, так как при образовании зоны локальная концентрация белка может оказаться значительной. Поэтому приходится использовать буферы с концентрацией 0,1 —0,2 М и более. При этом следует учитывать, насколько близко к границе буферной области лежит рабочее значение рН. Если такое приближение к границе необходимо, то для обеспечения достаточной буферной емкости молярность буфера приходится еще увеличивать. Вопрос об электропроводности буферов рассмотрен ниже.

Отметим далее, что эффект трения о гель зависит не только от молекулярной массы, но и от конфигурации и жесткости белковой макромолекулы. Глобулярные белки, неспособные к агрегации или диссоциации на субъединицы, ведут себя более или менее одинаково, хотя их размеры зависят от плотности упаковки глобулы. Рыхлые глобулярные и, особенно, фибриллярные белки могут деформироваться при взаимодействии с гелем и тем самым облегчать себе миграцию между его нитями. Этот эффект особенно сильно выражен у высокомолекулярных нуклеиновых кислот.

Для однозначного определения молекулярной массы белка по скорости его миграции при электрофорезе бывает целесообразно распрямить полипептидную цепочку белка и придать ей жесткость. Именно такой прием используется при электрофорезе белков, обработанных додецилсульфатом натрия (подробно это будет рассмотрено ниже).

Напряженность электрического поля (Н)

Разность потенциалов, или напряжение, приходящееся на весь гель, обозначим через E ; тогда для однородного участка геля длиной l $E = Hl$. В проводящей ток жидкости приложенному напряжению E всегда отвечает некоторая сила тока I , которая в соответствии с законом Ома определяется суммарным

сопротивлением цепи R ($I=E/R$). В ПААГ проводящей жидкостью служит буфер, находящийся между нитями полимера. Свой вклад в проводимость вносят и мигрирующие в геле заряженные макромолекулы, но ввиду их низкой концентрации этим вкладом можно пренебречь.

Электрическое сопротивление буфера определяется двумя факторами: концентрацией в нем свободных ионов и их электрофоретической подвижностью. Второй фактор играет очень важную роль. Например, при одинаковых концентрациях в двух буферах ионов Cl^- и CH_3COO^- электропроводность первого буфера будет заметно выше, чем второго. Следует также помнить о том, что электрический ток одинаков по всей длине электрической цепи, т. е. в любом сечении трубки или пластины. Разрывов или скачков тока по длине геля физически быть не может, это аксиома. Иначе обстоит дело с напряжением или напряженностью электрического поля.

Если в любой электрической цепи последовательно включены два различных по своей величине сопротивления R_1 и R_2 , то одинаковый для всей цепи ток I протекает через первое из них за счет падения на нем напряжения $E_1=IR_1$, а через второе — за счет $E_2=IR_2$. Полное напряжение по всей электрической цепи $E=E_1+E_2$. Если R_1 сильно отличается от R_2 , то и E_1 также отличается от E_2 . При изменении сопротивлений двух участков распределение напряжений на них может существенно измениться, оставаясь в сумме своей неизменным.

Такая ситуация может возникать в ПААГ, состоящем из двух последовательно расположенных участков, где при полимеризации были использованы разные буферы (содержащие ионы с разной подвижностью или просто различающиеся по концентрации). Сопротивления этих участков могут оказаться разными: следовательно, различными могут быть и падения напряжения на них, но эти параметры зависят от длины участков. Однако заведомо будут различаться в рассматриваемом случае значения напряженности поля на двух участках. Действительно, падение напряжения на участке пропорционально его сопротивлению, а следовательно, длине участка. Напряженность же поля есть результат деления падения напряжения на длину, поэтому соотношение напряженностей поля на двух участках геля не зависит от их длины и определяется только концентрациями и подвижностями содержащихся в них ионов. Это — очень важный вывод. В реальных буферных системах геля такую ситуацию можно себе представить в двух простейших вариантах.

Вариант 1. Предположим, что буферы и, соответственно, ионы на двух участках геля (A и B) одинаковы, но концентрация буфера на участке A в 10 раз меньше. Это приведет к тому, что напряженность поля в A будет вдесятеро больше, чем в B . Скорость миграции ионов пропорциональна напряженности поля, и ионы на участке A будут мигрировать в 10 раз быстрее, чем такие же ионы на участке B ; это компенсирует разницу в их

концентрациях. Число ионов, проходящее за 1 с через любое сечение обоих участков, а также через границу между ними, будет одинаковым, что и означает неизменность тока I по всей длине составного (ступенчатого) геля. При этом предполагается, что количество ионов в A не истощается — оно пополняется за счет ионов, поступающих из электродного буфера.

Вариант 2. Теперь допустим, что концентрации ионов на обоих участках одинаковы, но ионы на участке A отличаются на много меньшей электрофоретической подвижностью. Речь идет о подвижности в свободной жидкости (u_0), так как сетка геля не препятствует миграции малых ионов. Например, пусть в геле A содержатся отрицательные ионы глицина (при щелочном pH), а в геле B — ионы хлора. Меньшая подвижность ионов обуславливает большую величину сопротивления. Суммарное напряжение распределится между участками A и B так, что напряженность поля в A будет соответственно выше, причем именно настолько, чтобы скорость миграции ионов глицина, пропорциональная произведению подвижности на напряженность поля, стала точно такой же, как и у ионов хлора. Этого опять требует условие неизменности величины тока вдоль всего геля.

В более сложных случаях могут различаться как подвижности ионов, так и их концентрации, но в любом случае напряженности электрического поля в двух последовательно расположенных участках геля устанавливаются такими, что они компенсируют все различия и обеспечивают постоянство тока во всем геле. Значения напряженности могут при этом оказаться очень разными. Очень важно, что это различие существенным образом влияет и на соотношение скоростей миграции одних и тех же белков (или нуклеиновых кислот) в двух участках геля. На том участке, где напряженность поля выше, белки будут двигаться быстрее, чем на соседнем. Эта любопытная ситуация будет рассмотрена ниже при обсуждении проблемы сужения белковых зон для противодействия диффузии. В заключение заметим, что сам процесс электрофореза в рабочем геле следует вести в однородном по напряженности электрическом поле, чтобы разделение белков отражало истинное различие их собственных характеристик — молекулярных масс и электрического заряда.

Выбор буфера рабочего геля

Вернемся к зависимости тока и напряженности поля в геле от природы и концентрации рабочего буфера. Заметим сразу, что сама по себе величина pH практически не сказывается на электропроводности геля. Даже при pH 4 концентрации протонов (0,1 мМ) не даст заметного вклада в электропроводность по сравнению с ионами буфера, концентрация которых, как будет видно дальше, как минимум в 100 раз выше. То же относится и к ионам OH⁻ в реально используемом диапазоне pH щелочных буферов.

В то же время косвенным образом выбор рН может сильно влиять на электропроводность данного буфера, определяя степень диссоциации его ионов. Рассмотрим широко используемый Трис-НСI-буфер. В нем всегда находятся ионы Трис^+ , Cl^- и незаряженные молекулы Триса. Для этого буфера $pK_a = 8,1$. Это означает, что при рН 8,1 ровно половина молекул Триса несет положительный заряд, практически целиком за счет протонов соляной кислоты, которой титровали буфер. Очевидно, что в растворе находится такое же количество ионов Cl^- . Таким образом, при рН 8,1 0,1 М Трис-НСI содержит 0,05 М Трис^+ и 0,05 М Cl^- . Электропроводность этого буфера будет определяться, в основном, ионами Cl^- , так как их подвижность намного выше, чем у тяжелых ионов Трис^+ . 0,05М Cl^- обеспечивает достаточно высокую электропроводность. Трис-ацетатный буфер такой же концентрации и рН имеет значительно меньшую электропроводность, так как подвижность аниона CH_3COO^- явно ниже, чем Cl^- .

При рН 6,7 электропроводность 0,1 М Трис-НСI увеличится примерно вдвое, так как этот рН лежит вблизи границы буферной емкости Триса и почти все его молекулы будут ионизированы; следовательно, концентрация Cl^- составит около 0,1 М. Наоборот, при рН 8,9 электропроводность этого буфера значительно ниже, чем при рН 8,1, так как для титрования до рН 8,9 потребуется заметно меньше НСI.

Существенную роль в определении электропроводности играет выбор природы буфера, т. е. характера его ионов. Легко понять, что К- или Na-фосфатные буферы, как и Трис-НСI, отличаются высокой электропроводностью за счет ионов K^+ и Na^+ . То же относится к К- или Na-ацетатным буферам. Между тем электрофорез в чистой уксусной кислоте умеренной концентрации не связан с высокой электропроводностью. Имидазол-фосфатный буфер той же молярности, что и К-фосфатный, отличается меньшей электропроводностью. Относительно низкую электропроводность имеют Трис-боратный, Трис-глициновый и Трис-барбитуратный буферы. Вообще, можно утверждать, что электропроводности буферных систем, в которых не участвуют легкоподвижные ионы сильных неорганических кислот и щелочей, относительно невелики. Это важное заключение будет играть существенную роль в дальнейшем изложении. К сожалению, такие буферы нередко отличаются и меньшей емкостью.

Таким образом, электропроводность рабочего буфера определяется тремя факторами: концентрацией, необходимой для поддержания нужного рН в белковых зонах, степенью диссоциации буферных веществ при этом рН и характером участвующих в диссоциации ионов.

Очевидно, что буфер геля не должен содержать посторонних солей даже в малых концентрациях. Соль, зачастую присутствующую в исходном препарате, несмотря на его малый объем, следует предварительно удалить или хотя бы снизить ее концентра-

цию до 0,05 М. На избыток соли в препарате указывает, между прочим, размытый характер передней границы и резкая задняя граница полосы препарата сразу после его вступления в гель. При нормальном разделении должна иметь место как раз обратная картина — резкая передняя и более диффузная задняя граница полосы. Это можно проконтролировать путем окрашивания пробного геля через 20 — 30 мин после начала электрофореза или при использовании люминесцентных маркеров (см. ниже).

Помимо суммарной электропроводности, определенную роль играет электрофоретическая подвижность ионов буфера, мигрирующих в том же направлении, что и разделяемые макромолекулы. Качество полос выигрывает, если эти ионы по своей подвижности приближаются к самим макромолекулам. Таковы большие органические ионы: Трис⁺ (катион), остатки барбитуровой и какодиловой кислот (анионы) и такие цвиттерионы, как глицин и аланин. Следовательно, при прочих равных условиях Трисовый буфер следует предпочесть при фракционировании щелочных белков, а барбитуратный — для кислых белков вблизи нейтральной области рН буфера.

Выделение тепла при электрофорезе

Высокая электропроводность буфера нежелательна, поскольку ограничивает возможность повышения напряженности электрического поля в геле из-за увеличения тока и связанного с этим выделения тепла. Между тем, именно напряженность поля обеспечивает всегда желательное ускорение миграции белков.

Электрическая мощность, рассеиваемая в виде тепла в геле, равна произведению силы тока на падение напряжения по длине геля ($I E$). В главе 1 было отмечено, что разумной продолжительности электрофореза соответствует напряженность поля 10 — 20 В/см. Кстати, как показывает практика, при заметном превышении этих значений качество полос в обычных условиях охлаждения ухудшается. Для геля длиной 20 см такой напряженности соответствует напряжение 200 — 400 В. При воздушном охлаждении вертикально расположенных пластин эффективный теплоотвод возможен при рассеиваемой мощности не более 20 Вт, что соответствует силе тока 50 — 100 мА на пластину. В приборе GE-2/4 фирмы «Pharmacia» (рис. 15) с принудительным жидкостным охлаждением пластин уровень мощности может быть увеличен до 100 Вт с соответствующим повышением напряженности поля и ускорением фракционирования белков. Приборы для электрофореза в горизонтальных пластинах успешно осуществляют теплоотвод при мощности до 40 Вт.

В процессе электрофореза электрическое сопротивление геля может изменяться (чаще всего увеличивается). Причиной этого является замена более подвижных ионов буфера в геле на менее подвижные, например при ступенчатом электрофорезе.

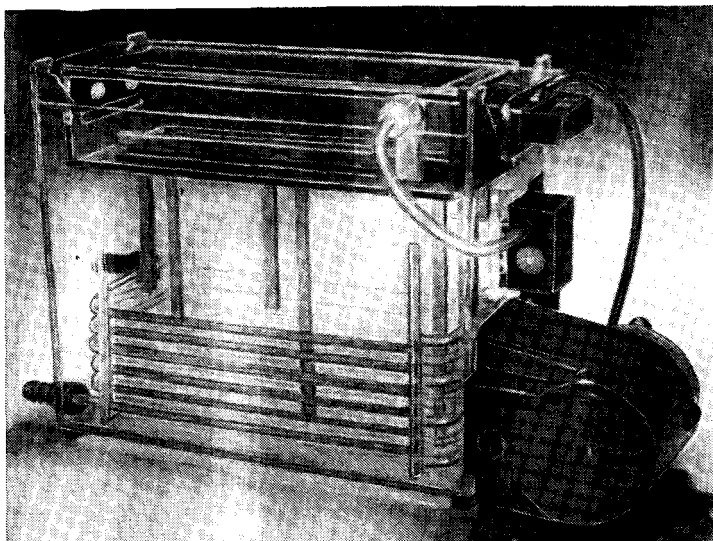


Рис. 15. Прибор для электрофореза в вертикальных пластинах с циркуляцией буфера (Тип GE-2/4 фирмы «Pharmacia»)

Как уже отмечалось, для сокращения продолжительности разделения и уменьшения диффузии зон электрофорез желательнее вести при максимальном напряжении. Его начальное значение ограничивается требуемой вначале силой тока и максимально допустимой для данного прибора мощностью. По мере роста сопротивления в геле сила тока снижается, и напряжение можно увеличивать. Современные источники напряжения делают это автоматически, поддерживая заданный постоянный уровень мощности, рассеиваемой в геле. От опасного (с точки зрения надежности изоляции) повышения напряжения при этом можно застраховаться, ограничив максимально допустимую его величину. Достигнув ее, прибор переключается на режим поддержания постоянного напряжения, поэтому при дальнейшем возрастании сопротивления сила тока и расходуемая в геле мощность начинают снижаться.

В некоторых случаях сопротивление всей цепи электрофореза может и уменьшаться. В частности, это может происходить как из-за нагревания геля (напомним, что подвижность ионов с температурой возрастает), так и за счет накопления ионов в электродных резервуарах. В этих случаях источник тока, отрегулированный на постоянную мощность, автоматически снижает напряжение, а максимально допустимая сила тока может быть заранее ограничена. Такого типа источники («Constant power supply») выпускаются фирмами «Pharmacia» (модель ECPS 3000/150) и LKB (модель 2103). В других типах источни-

ков (EPS 500/400 фирмы «Pharmacia» и модель 500 фирмы «Bio-Rad») можно заранее установить постоянные значения напряжения или тока и задать величину максимально допустимой мощности, по достижении которой соответственно напряжение или ток начинают автоматически уменьшаться.

Загрузка геля. Ширина белковых зон

Очевидно, что разделение близко идущих зон белков будет тем успешнее, чем уже сами эти зоны, поэтому при электрофорезе следует заботиться о максимальном сужении белковых зон (полос). Это накладывает ограничения на допустимую загрузку геля. Разумеется, строгость таких ограничений зависит от состава белковой смеси и характера разделения полос. В качестве ориентировочного максимума можно принять загрузку порядка 1 мг суммарного препарата белка на 1 см² сечения геля. Для кармана шириной 5 мм в пластине толщиной 1,5 мм это соответствует примерно 75 мкг белка, а для трубки диаметром 6 мм — до 200 мкг. Идентификацию полос белка по их окраске можно проводить при загрузках, в 10 раз меньших. При перегрузке белковые полосы бывают резкими в передней своей части и размытыми сзади. При этом следует всегда считаться с возможностью преципитации белка в момент вступления его в гель, когда все макромолекулы стягиваются в узкую полосу и локальная концентрация их сильно увеличивается.

Чем меньше загрузка геля, тем лучше разделение близких зон. Ограничения в этом случае накладываются только методами обнаружения слабых полос. Поскольку диффузия зон идет во времени, всегда желательна сокращение продолжительности электрофореза, но не за счет чрезмерно высокой силы тока, вызывающей неравномерный нагрев геля и искажение полос. Электрофорез при пониженной температуре в этом плане дает немного. Интенсивность диффузии уменьшается, но вместе с тем снижается и электрофоретическая подвижность белков, а следовательно, увеличивается продолжительность электрофореза.

В простом варианте электрофореза желательно наносить белковую смесь на гель в минимальном объеме, чтобы высота исходного слоя препарата была не более 2 — 3 мм. Выполнить это условие нередко бывает затруднительно ввиду недостаточной концентрации исходного препарата. На основании приведенных выше цифр легко рассчитать, что концентрация белка в препарате должна составлять 3 — 5 мг/мл. Ряд мер позволяет обойти эту трудность; они направлены на концентрирование белкового препарата в узкую зону в момент вступления его в рабочий гель. Основной прием заключается в том, чтобы создать перед гелем область с повышенной напряженностью поля, где белки мигрируют намного быстрее, чем в рабочем геле. В момент перехода из этой области в рабочий гель они будут стягиваться в узкую полосу, так как находившиеся первоначально далеко позади

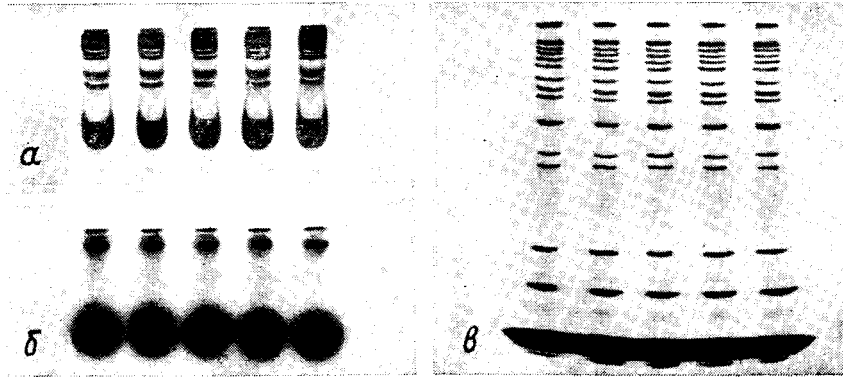


Рис. 16. Концентрирующий эффект электрофореза в градиентном геле (4—30% ПААГ)
a — начало фракционирования белков сыворотки; *b* — тот же гель после 60 ч диффузии при комнатной температуре и выключенном напряжении; *v* — через 6 ч после возобновления электрофореза

молекулы белка «догонят» впереди идущие молекулы, замедлившие свое движение при вступлении в рабочий гель.

Область с повышенной напряженностью поля можно создать в крупнопористом геле, полимеризованном в буфере с малоподвижными ионами (см. выше, вариант 2). Такой подход использован в системе ступенчатого электрофореза, рассмотренного ниже. Этого же можно добиться и путем растворения исходного препарата белка в том же рабочем буфере, но в 5—10 раз менее концентрированном (вариант 1). Нанесение препарата на гель в разбавленном рабочем буфере нашло широкое применение в силу простоты и достаточно хорошей эффективности этого приема.

Другой очень эффективный способ сужения полос — использование градиента пористого геля. В этом случае при миграции вдоль геля передний край каждой полосы все время оказывается в области чуть более концентрированного геля, чем задний. Молекулы белка, расположенные ближе к переднему краю полосы, тормозятся трением о гель сильнее, чем идущие сзади, что и приводит к непрерывному сужению полос в ходе их продвижения по гелю. Силу этого эффекта убедительно продемонстрировали специалисты фирмы «Pharmacia» на выпускаемых этой фирмой стандартных пластинах с градиентом концентрации ПААГ (4—30%). Начав электрофоретическое фракционирование белков сыворотки, они затем прерывали его и оставляли пластину на 60 ч при комнатной температуре. За это время диффузия полностью размывала сформировавшиеся было белковые полосы. Однако через 6 ч после возобновления электрофореза удавалось получить четкую картину полос, содержащую все обычно наблюдаемые компоненты сыворотки (рис. 16).

Введение мочевины и β-меркаптоэтанола. Некоторые артефакты

Высокая концентрация белков в зонах может привести к их осаждению или, по крайней мере, образованию агрегатов: димерных, тримерных и более крупных белковых комплексов, которые могут давать дополнительные полосы. Агрегация происходит, в основном, за счет водородных связей. Для ее предотвращения в рабочий буфер нередко добавляют *мочевину* в концентрации 4 — 8 М. Она должна быть хорошо очищена, в частности деионизована. Кроме того, следует всегда иметь в виду возможность частичного разложения мочевины с образованием циановой кислоты и карбамоилирования белков. Это особенно относится к долго хранящимся буферам, поэтому лучше добавлять сухую мочевину в буфер непосредственно перед приготовлением геля. Если все же возникает подозрение, что некая полоса появилась за счет карбамоилирования, то следует добавить в исходный препарат цианат и посмотреть, не усилится ли подозрительная полоса. Для предварительной деионизации маточный раствор мочевины (10М) суспендируют с бифункциональной ионообменной смолой (например, AG 501 Ж) в соотношении 5 г смолы на 100 мл раствора в течение часа при комнатной температуре.

β-меркаптоэтанол в концентрации 1 — 5 % нередко вносят в исходный белковый препарат для предохранения его от окисления и образования лишних дисульфидных мостиков. Более энергичное воздействие с разрывом нативных дисульфидных связей и разделением белковых субъединиц производят путем нагревания белкового раствора до 90 — 100 ° в присутствии не только β-меркаптоэтанола или его аналогов, но и ДДС-Na.

В некоторых случаях при использовании боратного буфера или буферов, содержащих аминокислоты (глицин, аланин), возможно образование комплексов компонентов буфера с белками. Их электрофоретическая подвижность может оказаться несколько иной, чем у чистых белков, и соответствующие белковые полосы раздвоятся. Проверить такого рода артефакт можно повторным электрофорезом. В силу равновесного характера процесса образования комплексов каждая из двух полос дублета при ее повторном электрофорезе в том же буфере даст снова две полосы.

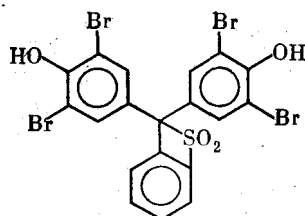
В главе 1 уже упоминалось об опасности, которую представляют для белков сохраняющиеся в геле после полимеризации долгоживущие свободные радикалы. Указывалось также на способ их удаления — «преэлектрофорез», т. е. пропускание тока через гель без внесения препарата. Добавим, что в особых случаях для полной очистки от радикалов во время преэлектрофореза через гель пропускают такие связывающие их соединения, как цистеин, меркаптоуксусная (тиогликолевая) кислота или гидрохинон.

При фракционировании очень малых количеств белка может оказаться заметной сорбция их на геле (белки «размазываются» по гелю). Блокировать это явление можно, вводя в исходный препарат дополнительный быстро мигрирующий белок. Проходя через гель впереди всех остальных белков препарата, он насыщает собой центры неспецифической сорбции в геле.

Лидирующие красители

Для наблюдения за ходом электрофореза в исходный препарат вносят краситель, мигрирующий в том же направлении, что и фракционируемые белки. Он не должен заметным образом связываться с белками, а скорость его продвижения по гелю должна быть заведомо больше, чем у наиболее быстро мигрирующего белка. Вместе с тем краситель не должен слишком сильно отрываться от белков, чтобы его прохождению до конца пластины или трубки соответствовало использование большей части находящегося в них геля для фракционирования белков. Быть может, по ассоциации с велосипедными гонками за лидером, этот краситель называют лидирующим («tracker dye»).

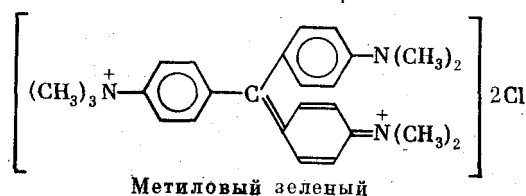
В щелочных и нейтральных буферах, когда кислые белки заряжены отрицательно и мигрируют к аноду, а также для любых белков в комплексе с ДДС-Na (см. ниже) используют отрицательно заряженные красители. Наибольшее распространение получил бромфеноловый синий, имеющий достаточно сложную структуру; в его состав, в частности, входят два дибромфенольных остатка. Иногда используют еще более сложно построенный краситель — ксиленцианол, электрофоретическая подвижность которого примерно вдвое ниже, чем бромфенолового синего, поэтому его используют при фракционировании крупных белков и нуклеиновых кислот.



Бромфеноловый синий

Для характеристики электрофоретической подвижности белка в данных условиях электрофореза принято указывать отношение расстояния, пройденного белковой полосой от начала рабочего геля, к аналогичному расстоянию до полосы красителя в этом же геле. Это отношение, как и в хроматографии, обозначают R_f .

В качестве положительно заряженного красителя для электрофореза в кислой среде, когда белки мигрируют в направлении катода, используют метиловый зеленый или пиронин.



РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО РАЗМЕРАМ И ЗАРЯДУ

В этом случае в электродных резервуарах и для полимеризации ПААГ используют один и тот же буфер, поэтому такую систему иногда называют непрерывной, или простой. Строго говоря, непрерывность нарушается тем, что буфер, в котором вносят белковый препарат, с целью концентрирования исходной зоны разбавляют в 5—10 раз в одой.

Подбор оптимальных условий электрофореза сводится к выбору следующих параметров: пористости геля и степени его сшивки, т. е. значений T и C (см. главу 1); природы, концентрации и рН буфера; диссоциирующих добавок (если это необходимо); максимально допустимой мощности, напряжения и силы тока, а также продолжительности разделения; объема и концентрации исходного препарата; процедуры предварительной обработки препарата.

Выбор значений T и C в зависимости от молекулярных масс разделяемых белков был подробно обоснован в главе 1. Чаще всего с белками работают при $T = 3, 5—20$ и $C = 1—3$.

Выбор рабочего буфера

Для обеспечения хорошей электрофоретической подвижности и сохранения вместе с тем ощутимых различий в суммарных электрических зарядах белков выбирают рН буфера, отличающийся на 3—4 единицы от среднего значения pI для белков данного типа. Если эти значения неизвестны, то желательно составить себе представление о характере зарядов белков при различных рН по характеру их сорбции на ионообменных смолах.

Для кислых белков часто используют буфер с рН 8,9, для щелочных — с рН 4,3—4,5. В качестве слабощелочных буферов

для кислых белков применяют Трис-НСI, Трис-глициновый, Трис-боратный или Трис-барбитуратный. Для щелочных белков чаще всего используют К-ацетатный и Трис-ацетатный буферы, а иногда, если белок это выдерживает, то и просто уксусную кислоту в концентрации 0,9 М или 5% (0,9 М CH_3COOH имеет $\text{pH} 2,4$; 0,1 М — $\text{pH} 2,87$). О преимуществах буферов, не содержащих легко подвижных ионов (Cl^- , K^+), было сказано выше.

Концентрацию буфера выбирают, исходя из допустимой мощности тепловыделения, и вместе с тем так, чтобы напряженность электрического поля в геле не превышала 15 В/см. При более высоких значениях напряженности возможны искажения формы белковых полос. Для 0,1 М Трис-глицинового буфера, например, такой напряженности отвечает плотность тока 20 mA/cm^2 . Это означает, что через трубку диаметром 6 мм и длиной 8 см в этом случае можно пропускать ток до 5,5 мА при напряжении 120 В. Поскольку трубки довольно трудно охлаждать, обычно используют меньшие величины тока — около 3 мА на трубку. Для вертикальной пластины размером 10 × 4 см и толщиной 1,5 мм в этих же условиях сила тока составит около 30 мА при напряжении около 210 В. Разумеется, эти цифры приведены лишь для ориентировки, и для других условий электрофореза они окажутся иными. Впрочем, вариации для хорошо выбранных систем оказываются не очень значительными, так как для любой буферной системы сохраняется одна и та же тенденция — использовать максимально возможную напряженность поля при максимально допустимой с точки зрения теплоотвода мощности тока.

В двух приведенных простейших примерах напряженность поля в геле можно рассчитывать просто путем деления напряжения, указываемого источником тока, на длину геля. При этом пренебрегают падением напряжения в электродных резервуарах — на участке цепи между электродами и гелем. В том случае, когда электродные буферы находятся в непосредственном контакте с гелем, это вполне допустимо.

Иначе обстоит дело в приборах с горизонтально расположенными пластинами. Например, для электрофореза в приборе типа «Мультифор» при ширине пластины 20 см и толщине геля 1 мм плотности тока 20 mA/cm^2 соответствует его сила 40 мА. Падение напряжения в самом геле длиной 10 см при напряженности поля 15 В/см составит, очевидно, 150 В. Однако напряжение, которое надо установить на источнике тока, должно быть существенно выше ввиду значительного падения напряжения на фитилях, соединяющих буферные резервуары с гелем. Это падение напряжения трудно оценить, поэтому для выяснения значения напряженности поля в самом геле прибор «Мультифор» снабжен специальным вольтметром, измеряющим падение напряжения между двумя точками поверхности геля, находящимися на определенном расстоянии друг от друга. В рассмотренном примере использовали Трис-глициновый буфер с довольно высоким элект-

рическим сопротивлением. Мощность, расходуемая в приборе «Мультифор», в этом случае составит всего лишь 6 Вт ($150\text{ В} \times 0,04\text{ А}$). Иная картина получится, если тот же гель заполимеризовать в 0,1 М Na-фосфатном буфере с pH 7,1. Электропроводность этого буфера довольно высока за счет легко подвижных ионов Na^+ . Измерения в том же приборе показывают, что уже при напряженности поля 5 В/см (падение напряжения — 50 В на пластину) плотность тока в геле возрастает до 100 мА/см². Если довести напряженность поля в геле до 15 В/см, то сила тока через пластину сечением 2 см² (20 × 1 см) составит 600 мА. При падении напряжения на геле, равном 150 В, это привело бы к совершенно неприемлемому уровню тепловыделения (мощность 90 Вт). Однако дойти до этого режима практически невозможно ввиду большого падения напряжения на фитилях, их разогрева, обсыхания и дальнейшего увеличения сопротивления. В итоге, при работе с фосфатным буфером приходится ограничивать силу тока (~200 мА) и работать при пониженных значениях напряженности электрического поля. Соответственно увеличивается и продолжительность электрофореза.

Еще раз подчеркнем, что электропроводность любого буфера определяется не только концентрацией, но степенью и характером его ионизации (близостью pH к pK_a буфера и подвижностью образующих ионов). Концентрации рабочих буферов в пределах 0,05—0,1 М можно считать ориентировочно нормальными, хотя для слабо ионизированных буферов, используемых вблизи границы их буферной области, можно встретить в литературе и более высокие значения концентрации — вплоть до 0,4 М.

В непрерывной системе сопротивление геля не должно заметным образом изменяться в процессе электрофореза. Как следствие этого, не должна изменяться и расходуемая мощность. Повышение напряжения источника, работающего в режиме постоянного тока, или уменьшение силы тока при постоянном напряжении говорят о каких-то неполадках в электрической цепи, например: о высыхании фитилей или нарушении контактов между ними и гелем.

Использование мочевины

Уже указывалось, что для предотвращения агрегации белков в рабочий буфер геля нередко вводят мочевины в концентрации от 2 до 8 М. Ее, разумеется, добавляют и в исходный белковый препарат. В электродные буферы вносить мочевины не нужно, так как, не будучи заряженной, она не мигрирует в геле, а следовательно, и не нуждается в пополнении. На электропроводности буфера присутствие мочевины практически не сказывается. Однако под влиянием нового окружения могут изменяться pK отдельных групп и суммарный заряд белка. Это может заметно повлиять на конфигурацию, а следовательно, и на подвижность белков.

В концентрированных растворах мочевины происходит денатурация белков, часть дисульфидных мостиков рвется и полипептидная цепочка, утратив вторичную структуру, ведет себя как хаотический клубок. Денатурация не является полной и может быть обращена. Степень и обратимость денатурации зависят от природы белка и концентрации мочевины, поэтому при выборе этой концентрации иногда приходится искать компромисс между опасностью агрегации белков и угрозой их необратимой денатурации. Об очистке мочевины было сказано выше; добавим только, что образование цианата в растворах мочевины идет ускоренно при щелочных рН, поэтому щелочные буферы с добавкой мочевины следует использовать сразу после их приготовления.

Для составления геля пользуются обычно «маточными» растворами повышенной концентрации. Удобно, например, приготовить 40%-ный водный раствор смеси мономеров ($T = 40$). Напомним, что T выражает процентное отношение массы обоих мономеров к конечному объему их раствора, а C — отношение массы NN' -метиленабисакриламида к сумме масс двух мономеров. Отсюда следует, что C не изменяется при разбавлении маточного раствора. Так, если предполагается иметь для рабочего геля параметры $T = 10$ и $C = 2,6$, то при составлении маточного раствора можно взять $T = 40$ и $C = 2,6$. Практически это означает, что надо отвесить $(40 \cdot 2,6)/100 = 1,04$ г метиленабисакриламида и $40 \cdot 1,04 = 38,96$ г акриламида и растворить их в воде до конечного объема 100 мл. Маточный раствор буфера может иметь двух- или пятикратную концентрацию. В последнем случае полезно проверить, что рН буфера сохраняется при соответствующем разбавлении. Смесь расчетных объемов маточных растворов мономеров и буфера доводят до нужного объема водой.

Персульфат аммония лучше добавлять в минимальном объеме, который можно не учитывать. Для этого готовят концентрированный, обычно 10%-ный, маточный раствор персульфата, остатки которого вскоре приходится выбрасывать, так как он не хранится. Объемом вносимого в смесь ТЕМЕД также всегда можно пренебрегать. Выбор содержания персульфата аммония и ТЕМЕД, порядок их внесения в раствор мономеров, необходимость деаэрации и контроль за процессом полимеризации геля были подробно рассмотрены в главе 1,

Для приготовления геля с высоким содержанием мочевины ее добавляют во все маточные растворы. При растворении мономеров до $T = 40$ концентрацию мочевины приходится ограничивать значением $2 \text{—} 3M$. Зато маточный раствор буфера можно приготовить на 10M моче-вине и такой же концентрации раствор ее использовать для доведения до расчетного объема вместо воды.

Особо гидрофобные белки, например тяжелые цепи миозина, при концентрировании их в полосах агрегируют даже в присутствии 8 M мочевины. Во избежание этого их можно обработать

фенолом, который играет роль мягкого детергента. Белок сначала растворяют в буфере до безопасной концентрации, а потом переводят в смесь, состоящую из 50% фенола, 25% уксусной кислоты, мочевины до концентрации 2 М и воды. Электрофорез проводят в ПААГ, полимеризованном в 35%-ной уксусной кислоте с 5 М мочевины [d'Abbis et al., 1979].

В некоторых случаях бывает необходимо при электрофорезе сохранить ферментативную активность белка — либо для последующей его элюции и использования, либо для обнаружения с помощью биологического теста, т. е. по превращению субстрата ферментативной реакции (см. ниже). Использование в этом случае концентрированного раствора мочевины является нежелательным, и уменьшать опасность агрегации приходится за счет снижения загрузки геля. Чувствительность биологических тестов зачастую позволяет это сделать. Необходимо точно проверить устойчивость фермента при выбранной величине pH рабочего буфера. При этом следует иметь в виду, что истинная величина pH в геле примерно на 0,5 ед. больше, чем у используемого щелочного буфера, и на 0,5 меньше, чем у кислого [Shuster, 1971].

Иногда следует проверить сохранность ферментативной активности белка в ходе электрофореза в связи с возможностью разобщения фермента с другими белками или необходимыми для его работы кофакторами. Такую проверку можно проводить следующим образом: на разных стадиях электрофореза вырезать и гомогенизировать участки геля, содержащие соответствующую белковую полосу, и прямо в гомогенате, в сопоставимых условиях, проверять сохранение активности фермента, используя возможность диффузии субстрата реакции в гель, а ее продукта — из геля.

Загрузка геля и подготовка препарата

Исходный белковый препарат растворяют в том же рабочем буфере, но меньшей концентрации (в 5 — 10 раз). По рассмотренным выше причинам это приводит к значительному сужению исходной зоны белков при ее вступлении в гель. Если электрофорез идет в присутствии мочевины, то ее концентрация в разбавленном буфере должна быть такой же, как в рабочем буфере геля. Еще раз подчеркнем необходимость удаления солей из препарата; в противном случае эффект концентрирования белка при вступлении в гель будет смазан. Недавно был предложен простой и остроумный способ диализа белкового раствора в капле на плавающем мембранном фильтре [Marusyk, Sergeant, 1980].

Иногда проводят предварительное полное восстановление белка путем прединкубации его в течение ночи при комнатной температуре в буфере с pH 8,5— 9, содержащем 0,1 М (β-меркаптоэтанол) и 9 М мочевины (щелочное значение pH буфера способствует восстановительному эффекту β-меркаптоэтанол).

В раствор препарата добавляют до 10% глицерина или сахарозы, чтобы облегчить его подслаивание под электродный буфер (см. выше). Наконец, в препарат вносят еще и краситель, например бромфеноловый синий до концентрации 0,01%. Миграция этой «лидирующей» зоны до конца геля определяет момент окончания электрофореза. Заметим кстати, что при последующей фиксации белков бромфеноловый синий обесцвечивается. Если далее предполагается определение величины R_f , то положение окрашенной полоски сразу после извлечения геля из формы следует отметить (например, вколоть в гель тонкую проволочку).

Как уже подчеркивалось, препарат должен быть заведомо свободен от пыли, нерастворенных белков и других частиц. После внесения препарата в трубку или карман пластины на 5 — 15 мин включают напряжение, пониженное примерно вдвое против расчетного. За это время лидирующий краситель должен полностью войти в гель. Такая процедура улучшает условия формирования исходной белковой полосы в геле. Затем переходят на расчетный режим электрофореза по напряжению и силе тока.

Вопросы фиксации, окраски и других методов обработки белков после электрофореза, как и способы определения радиоактивности и элюции белков, рассмотрены отдельно ниже.

Некоторые примеры

Теперь для иллюстрации целесообразно привести некоторые примеры, отнюдь не отражающие всего безграничного разнообразия приложений электрофореза белков, даже в его простейшем, только что рассмотренном варианте.

Обзорный клинический анализ белков сыворотки человека. В приборе с горизонтальным гелем (типа «Мультифор») одновременно можно обследовать сыворотку крови 20 пациентов. Условия разделения: гель указанных выше размеров, $T = 3,5$, $C = 2,6$; 0,1 М Трис-глициновый буфер, pH 8,9; напряженность поля 15 В/см, сила тока 45 мА; температура охлаждающей воды 10°; преэлектрофорез в течение 30 мин при силе тока 60 мА. Препараты сыворотки разбавляют в отношении 1 : 3 тем же буфером, разведенным в 10 раз. Объем каждого препарата 5 мкл. В первые 10 мин электрофореза силу тока снижают до 20 мА. Скорость миграции бромфенолового синего 4,5 см/ч; общая продолжительность электрофореза 1,3 ч. На рис. 17, А сопоставлены картины фракционирования белков сыворотки 10 пациентов с различными заболеваниями (по два препарата от каждого). Крайние слева и справа пары треков содержат сыворотку нормальных доноров. Направление миграции белков — снизу вверх. Интенсивные пятна вверху — низкомолекулярные компоненты сыворотки.

Заметно лучше, особенно в области крупных белков, те же препараты разделяются в более концентрированном геле ($T = 7,5$; $C = 2,6$), однако в этом случае часть наиболее крупных белков выпадает в осадок на границе геля

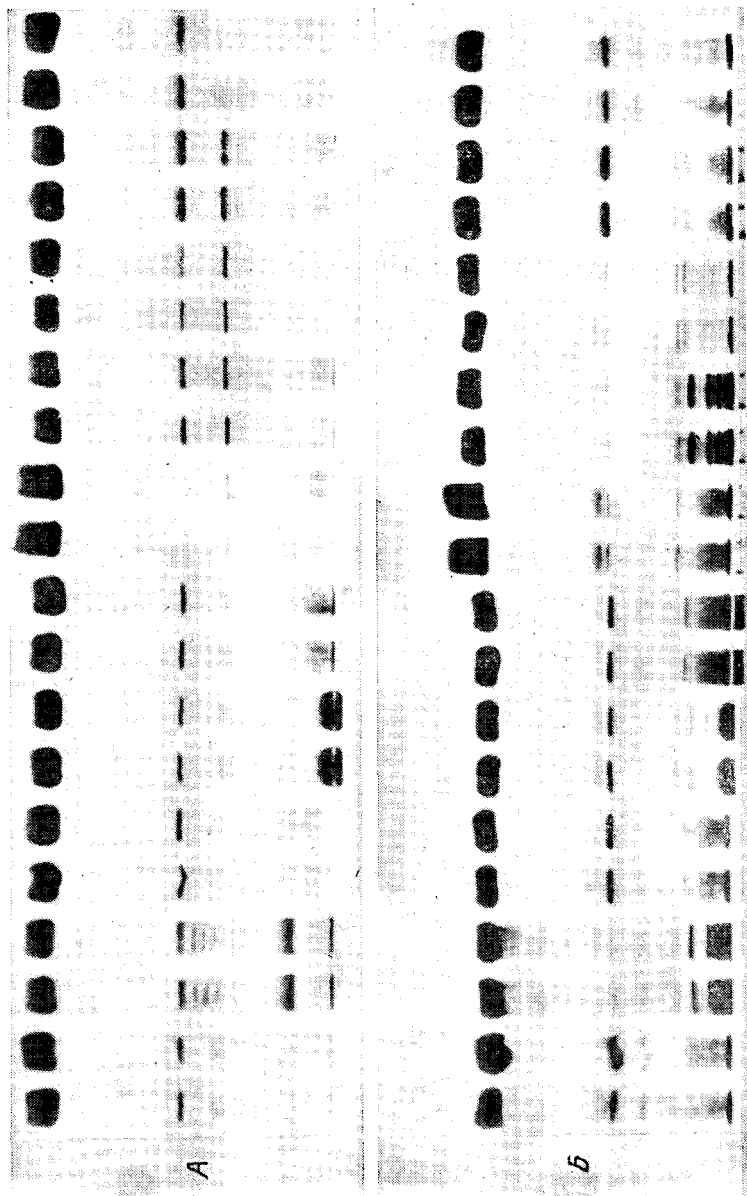


Рис. 17. Фракционирование белков сыворотки пациентов с различного рода заболеваниями в горизонтальной пластине на приборе «Мультифор» [Fehringström, Moberg, 1977]
 А — 3,5%-ный ПААГ; Б — 7,5%-ный ПААГ; миграция белков — снизу вверх

(рис. 17, Б). Скорость миграции бромфенолового синего 1,8 см/ч при рабочей силе тока 40 мА; продолжительность разделения 2,8 ч [Fehrström, Moberg, 1977].

Фракционирование гистонов и других щелочных белков.

5%-ный (0,9 М) раствор уксусной кислоты с добавлением 4 — 8 М мочевины часто используют для электрофоретического фракционирования гистонов [Panyim, Chalkley, 1969]. Молекулярные массы гистонов лежат в диапазоне 11 — 22 т. тыс. дальтон, поэтому для их разделения используют мелкопористые гели ($T = 15 — 20$). Положительно заряженные в кислой среде гистоны мигрируют в направлении катода. Наибольшей подвижностью обладает гистон Н4, затем следуют Н2А, Н2В и Н3, которые в этой простой системе разделяются довольно плохо. От них заметно отстают относительно более крупный гистон Н1. В качестве лидирующего красителя используют пиронин.

Недавно Спайкер описал систему фракционирования гистонов в двуступенчатом ПААГ с «кислой мочевиной». Основной рабочий гель — пластина (толщиной 0,5 мм) 15%-го ПААГ в 0,9 М CH_3COOH с 2,5 М мочевины. Над ним полимеризована полоска формирующего геля: 7,5% ПААГ в 0,375 М CH_3COOK , рН 4, с 2,5 М мочевины. Электрофорез при повышенном напряжении — за 1 — 2 ч. Качество полос и их разрешение в такой системе сильно выигрывают [Spiker, 1980].

Электрофорез «в кислой мочеvine» успешно используют и для фракционирования других щелочных белков: рибосомных, факторов инициации трансляции, субъединиц РНК-полимеразы и др. Впрочем, намного более совершенное разделение сложных смесей этих белков происходит при двумерном электрофорезе, когда фракционирование «в кислой мочеvine» используют в одном из направлений. Ниже, при анализе метода двумерного электрофореза, будут даны соответствующие ссылки.

Если есть опасение, что воздействие уксусной кислоты на белок может оказаться слишком жестким, то ее 50%-ный раствор титруют КОН до рН 4,3 — 4,5. При этом надо иметь в виду, что электропроводность такого буфера будет за счет ионов калия значительно выше, чем одной уксусной кислоты, что потребует соответствующего уменьшения напряжения, подаваемого на гель.

Описано электрофоретическое разделение гистонов и при рН 7,8 (0,18 М глицилглицин, титрованный NaOH), которое используется для изучения гистон-гистонового взаимодействия и некоторых лабильных модификаций гистонов. Все гистоны, кроме Н1, при этом почти одинаково и относительно слабо заряжены, поэтому фракционирование идет главным образом по молекулярной массе. Добавление мочевины предупреждает агрегацию гистонов, однако несколько изменяет взаимное расположение полос. Мочевина разворачивает гистоны Н2А, Н2В и Н3, но не влияет на конфигурацию Н1 и Н4. По-видимому, эти по-

следние развернуты и в отсутствие мочевины [Hoffman, Chalkley, 1976].

Щелочные белки рибосом удается разделять не только в кислых, но и в слегка щелочных условиях, например в Трис-боратном буфере, рН 8,7. Электрофорез проводят в 4%-ном ПААГ [Howard, Traut, 1973]. Исходный белковый препарат полимеризуют в геле с мочевиной на середине высоты трубки. Вблизи изоэлектрической точки часть рибосомальных белков оказывается заряженной отрицательно, а другая — положительно. Миграция в электрическом поле идет в обе стороны, к катоду и аноду. Щелочные белки рибосом при рН 8,7 растворяются с трудом и только в присутствии 6 М мочевины, которую вводят также и в буфер геля.

Электрофорез хроматина. Электрофоретическое фракционирование хроматина после его обработки микрококковой нуклеазой ведут в буфере низкой ионной силы, например в 0,01 М триэтиламмоний-НСI (рН 7,6; 2 мМ ЭДТА), что обусловлено плохой растворимостью хроматина в более концентрированных буферах. Хроматин в целом (благодаря ДНК) заряжен отрицательно и мигрирует к аноду. Удастся разделить субнуклеосомы, мононуклеосомы с различным содержанием ДНК и белков, лежащих вне их «ядра» («соге»), а также ди- и тринуклеосомы. Ввиду малой электропроводности разбавленного буфера при напряженности 15 В/см сила тока через трубку диаметром 6 мм составляет всего лишь 3 мА. Электрофорез в трубках длиной 7 см занимает 1,5 ч.

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПО РАЗМЕРУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДДС-Na

Существо метода

Рассмотренный выше электрофорез белков в простой системе удобно использовать для их разделения, но не для характеристики. Электрофоретическая подвижность каждого белка в простой системе зависит одновременно и от его суммарного заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации, и, наконец, от жесткости упаковки полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов неизвестен и может существенно изменяться в зависимости от условий электрофореза. Для установления строгой количественной корреляции между каким-либо одним из перечисленных параметров и электрофоретической подвижностью белка надо исключить влияние всех остальных.

Электрофорез в ПААГ с использованием ДДС-Na позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра — их молекулярной массы. Для этого белки в исходном растворе препарата обрабатывают не менее чем трехкратным избытком ДДС-Na. За счет гидрофобных взаимодействий детергент примерно одинаково связывается с подавляющим большинством белков в соотношении 1,4 мг ДДС-Na на

1 мг белка [Reynolds, Tanford, 1970]. Огромный избыток полностью диссоциированных остатков сульфокислоты, привносимых с детергентом, в большинстве случаев делает несущественной роль собственного заряда белка. Постоянство соотношения детергент/белок делает практически одинаковым отношение отрицательного заряда к массе для любого белка, даже для гистонов с их заметным собственным положительным зарядом. Бла-

годаря электрическому отталкиванию тесно расположенных по поверхности белка остатков серной кислоты полипептидная цепочка распрямляется и приобретает форму жесткого эллипсоида вращения. Его малая ось имеет длину 1,6 нм, а размер большой линейно связан с числом аминокислотных остатков, а следовательно, с молекулярной массой белка. Это справедливо лишь для неразветвленных полипептидов, лишенных дисульфидных мостиков, поэтому одновременно с обработкой ДДС-На необходимо обеспечить полную денатурацию белка и разрыв всех S—S-связей. С этой целью белковый препарат обрабатывают высокой концентрацией β-меркаптоэтанола при повышенной температуре.

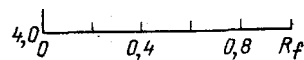
Электрофоретическая подвижность (u') жесткого комплекса белок— ДД С-На оказывается связанной с молекулярной массой белка (M) простым соотношением:

$u' = A - B \lg M$, где A и B — коэффициенты, зависящие от пористости геля, температуры и других условий эксперимента. Величину u' удобнее представлять в

относительных единицах, выражающих отношение путей миграции белка и бромфенолового синего за время электрофореза, т. е. в значениях введенной ранее величины R_f . Такая замена отразится только на значениях коэффициентов A и B . Нет смысла определять эти коэффициенты в каждом опыте. Одновременно с фракционированием исследуемой смеси можно провести электрофорез набора белков-«маркеров», молекулярные массы которых точно известны. Разумеется, вся предварительная обработка ДДС-На и меркаптоэтанолом должна быть строго одинаковой для исследуемого препарата и маркеров. При электрофорезе в пластине для смеси маркеров можно отвести отдельный трек. При использовании трубок маркеры лучше добавить прямо в препарат, так как нельзя гарантировать строгой идентичности условий электрофореза в двух разных трубках.

По окончании электрофореза, измерив пути миграции бромфенолового синего и каждого из маркеров, можно рассчитать значения R_f и, зная молекулярные массы маркеров, построить

Рис. 18. Линейная зависимость логарифма молекулярной массы ($\lg M$) от относительного расстояния миграции белков (R_f) при электрофорезе в ПААГ



экспериментальную зависимость $\lg M$ от R_f для данного опыта. Если пористость геля выбрана удачно (см. ниже), такая зависимость получается линейной (рис. 18). Определив теперь R_f для интересующего нас белка, из графика можно найти для него величину $\lg M$ и подсчитать M . Положение и наклон прямой на графике изменяются при вариации концентрации ПААГ и других условий эксперимента, поэтому нельзя пользоваться какой-либо стандартной калибровкой. График зависимости $\lg M$ от R_f надо строить для каждого опыта. Отметим также, что при определении R_f надо вводить поправки на набухание или сжатие геля при фиксации, окраске белков и удалении красителя, приводя все к исходному линейному размеру.

Метод определения молекулярной массы белков электрофорезом в ПААГ с ДДС-На завоевал себе прочную репутацию и используется очень широко. Тем не менее следует проявлять известную осторожность. Исследуемый белок может оказаться принадлежащим к той, по-видимому, сравнительно немногочисленной, категории белков, для которой количественное соотношение в комплексе с ДДС-На существенно отличается от 1 : 1,4.

Есть данные о том, что на полноту комплексообразования с ДДС-На может влиять распределение зарядов по полипептидной цепочке. Показано, например, что обработка рибонуклеазы малеиновой кислотой снижает количество связывающегося с ней ДДС-На с 1,9 до 0,3 г на 1 г белка. Такая обработка не изменяет заметным образом молекулярной массы рибонуклеазы, но вносит отрицательный заряд карбоксила на место положительного заряда аминогруппы. С другой стороны, на связывании ДДС-На с лизоцимом обработка малеиновой кислотой никак не сказывается [Tung, Knight, 1972]. Ненормальное связывание ДДС-На может быть также обусловлено необычной обогаченностью белка какой-либо гидрофильной аминокислотой. Гликопротеиды хуже связываются с ДДС-На, чем чистые белки.

Разной степенью связывания ДДС-На, по-видимому, следует объяснить и успешное разделение α и β цепей глобина кролика электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ с ДДС-На. Различие молекулярных масс этих цепей (15419 и 16000) вряд ли само по себе могло бы обеспечить это разделение (Wood, Shaeffer, 1975]. Недавно было показано, что единственная мутационная замена аминокислоты (Арг-Цис) в белке с молекулярной массой 26000 приводит к кажущемуся изменению этой величины на 1000. Существенно отметить, что такое изменение связано с заменой только одного из нескольких остатков аргинина, входящих в состав белка. Следовательно, в этом случае играет роль еще и окружение аргинина [Noel et al., 1979].

Рассмотренные примеры не могут дискредитировать плодотворный метод определения молекулярной массы белков электрофорезом с участием ДДС-На. Они лишь указывают на необходимость некоторой осторожности и критичности в оценке результатов эксперимента, особенно с малоизученными белками.

Выбор пористости геля

При данной пористости (концентрации) геля описанная выше линейная зависимость имеет место только для белков, молекулярные массы которых лежат в определенном интервале. Слишком крупные для данного геля белки, очевидно, вовсе не смогут мигрировать в нем. Подвижности слишком малых белков, для которых поры геля практически не создают препятствий, будут зависеть не от их молекулярной массы, а только от отношения заряда к массе. Как указывалось, в присутствии ДДС-На это отношение одинаково для большинства белков. Для ориентировки можно назвать некоторые цифры. Так, для одинаково сшитых гелей ($C = 3,3$) были рекомендованы следующие значения T в зависимости от молекулярной массы белков (M) [Dunker, Rueckert, 1969]:

$T, \%$	5	10	15
$M, \text{ тыс. дальтон}$	18—330	10—100	10—60

Фирма BDH для своего стандартного набора белков-маркеров в интервале M 56 — 280 тыс. дальтон предлагает использовать гели с $T = 3,3$, а в интервале 14 — 72 тыс. — с $T = 10$; в обоих случаях $C = 2, 6$. Отметим попутно, что эффект торможения миграции биополимеров в слабосшитых гелях с $C < 2,6$ быстро ослабляется с уменьшением C при неизменном значении T . Повидимому, в этом случае ярко проявляется способность жесткого комплекса белок— ДДС-На раздвигать гибкие, слабосшитые нити акриламида.

Для определения молекулярных масс пептидов та же фирма выпускает набор стандартных фрагментов миоглобина с диапазоном M 2,5 — 17 тыс. Для него и соответствующих пептидов рекомендуется использовать сильно сшитый гель ($T=12,5$; $C = 9$), содержащий 8 М мочевины, которая усиливает торможение малых пептидов в геле.

О важности правильного выбора пористости геля можно судить из сопоставления двух картин разделения набора из семи маркерных белков (рис. 19) [Fehnström, Moberg, 1977]:

Белок	$M, \text{ дальтон}$	$\lg M$	Белок	$M, \text{ дальтон}$	$\lg M$
Цитохром <i>c</i>	11 700	4,068	Овальбумин	43 000	4,634
Миоглобин	17 200	4,236	γ -Глобулин (H-цепь)	50 000	4,699
γ -Глобулин (L-цепь)	23 500	4,371	Человеческий альбумин	68 000	4,832
Карбоангидраза	29 000	4,462	Трансферрин	77 000	4,886

Разделение вели в приборе «Мультифор», используя 5%- и 10%-ный ПААГ. Легко видеть, что в 5%-ном геле миоглобин движется почти с такой же скоростью, как и цитохром *c*. При перенесении результатов этих опытов на графики (рис. 20) получается, как и следовало ожидать, что точка, отвечающая по-

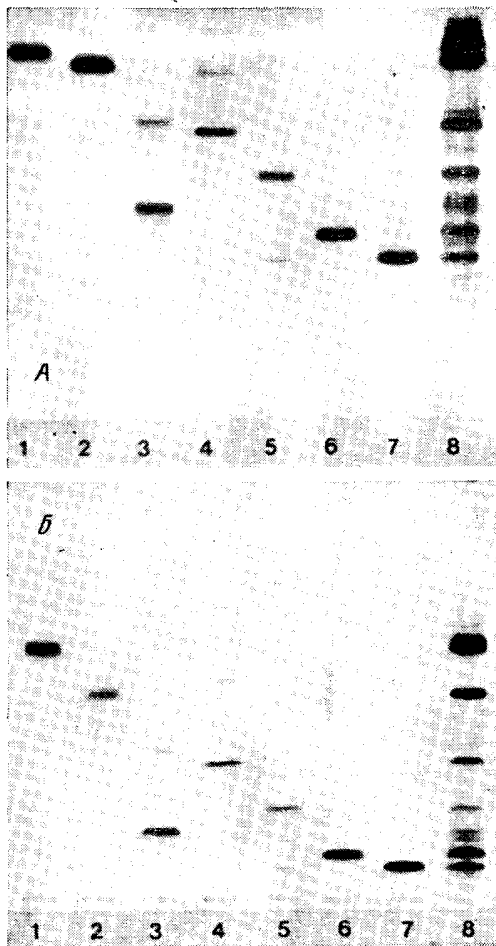
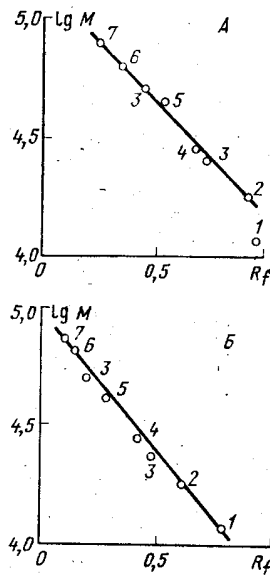


Рис. 19. Влияние пористости геля на характер миграции различных белков-маркеров [Fehrnström, Moberg, 1977]

1 — цитохром с; 2 — миоглобин; 3 — γ -глобулин; 4 — карбоангидраза; 5 — овальбумин; 6 — человеческий альбумин; 7 — трансферрин; 8 — смесь всех маркеров. А — 5%-ный ПААГ; Б — 10%-ный ПААГ

Рис. 20. Графики зависимости $\lg M$ от R_f , построенные по данным рис. 19



ложению цитохрома с в 5%-ном геле, выпадает из прямой линии, проходящей через все остальные точки, тогда как для 10%-ного геля она оказывается на такой прямой.

Присутствие мочевины и неионных детергентов

Хотя для коротких олигопептидов присутствие мочевины оказывается полезным, при электрофорезе белков ее не следует вводить в гель. Мочевина вносит конформационные изменения в структуру белка. Влияние этих изменений как на степень связывания ДДС-Na, так и на характер миграции комплекса белок — ДДС-Na в геле еще не изучено.

Из аналогичных соображений следует удалять из белкового препарата перед его обработкой ДДС-Na другие детергенты, в частности неионные. Иногда это удается добиться за счет внесения в препарат еще большего избытка ДДС-Na, с тем чтобы он вытеснял неионный детергент из связи с белком, образуя с ним свободно растворенные смешанные мицеллы. Такие мицеллы могут «уходить» от комплекса белок — ДДС-Na, быстро мигрируя в электрическом поле [Nielsen, Reynolds, 1978]. Широко используемый для растворения мембранных белков Тритон X-100 сильно мешает проведению электрофореза в ПААГ с ДДС-Na. Его можно извлечь из белкового препарата экстракцией хлороформом. Чтобы предотвратить выпадение плохо растворимых белков в осадок, перед экстракцией к препарату следует добавить ДДС-Na до 1%, который в хлороформ не переходит [Hogikawa, Ogawara, 1979].

Выбор рабочего буфера геля

Из изложенного ясно, что pH буфера в этом варианте электрофореза не играет существенной роли, так как заряд белка определяется его комплексообразованием с ДДС-Na. Обычно работают с нейтральными буферами. По традиции, идущей еще от пионерской работы Вебера и Осборн [Weber, Osborn, 1969], часто используют 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,1. Его концентрация обусловлена только желанием обеспечить 10-кратное различие в электропроводностях буферов геля и препарата. В качестве последнего берут 0,01 М Na-фосфат, pH 7,1. Как уже указывалось, такое различие обеспечивает концентрирование исходной полосы при переходе белков из буфера препарата в гель. Однако ввиду большой электропроводности Na-фосфатного буфера напряженность поля приходится ограничивать значением 5В/см, что замедляет процесс разделения, поэтому вместе Na-фосфатного имеет смысл использовать другой, менее проводящий буфер, например имидазолфосфатный, pH 7. Молярность рабочего буфера можно снизить до 0,05 М, сохранив для буфера препарата концентрацию 0,01 М. Это позволит значительно увеличить напряженность поля и сократить продолжительность электрофореза.

В электродных резервуарах обычно используют тот же буфер, что и в геле. В буферы вносят и ДДС-Na до концентрации 0,1%. Необходимость присутствия ДДС-Na в рабочем буфере геля одно время оспаривалась [Stoklosa, Latz, 1974]. Авторы цитируемой работы утверждали, что ДДС-Na образует с белком прочный комплекс, не разрушающийся в процессе электрофореза. В более поздней работе, напротив, подчеркивается необходимость введения ДДС-Na в буфер геля или хотя бы в катодный буфер, откуда он будет поступать в гель. Показано, что ДДС-Na может выходить из комплекса с белком. В тех случаях, когда скорость миграции детергента в геле намного больше, чем бел-

ка, последний будет терять ДДС-Na и изменять свою подвижность в геле [Kubo et al., 1979]. Это обстоятельство было предложено использовать в своеобразном процессе двухстадийного электрофореза [Sorimachi, Condliffe, 1977]. После обычной обработки ДДС-Na и β-меркаптоэтанолом авторы сначала вели электрофорез в течение 2 ч в 10%-ном ПААГ, полимеризованном, как обычно, в 0,1 М Na-фосфатном буфере (рН 7) с 0,1% ДДС-Na. Через некоторое время буфер в катодном резервуаре заменяли на такой же, но без ДДС-Na. Это приводило к быстрой очистке геля от детергента, мигрирующего к аноду. Затем от ДДС-Na освобождались и белки. Дальнейшее разделение шло уже по заряду белков. При этом рН буфера можно с самого начала выбрать оптимальным именно для второго этапа разделения, поскольку на первом этапе в присутствии ДДС-Na рН роли не играет.

Подготовка белкового препарата

На эту операцию следует обратить особое внимание. Сопоставлять молекулярные массы белков по скорости их миграции можно только в том случае, когда есть уверенность в полной денатурации белка при обработке его ДДС-Na.

Вебер и сотрудники ввели широко употребляемую до сих пор процедуру обработки. Белковый препарат диализуют против 0,01 М Na-фосфата, содержащего 0,1% ДДС-Na и 0,1% β-меркаптоэтанол, удаляя из него остатки соли. Затем концентрации ДДС-Na и β-меркаптоэтанол увеличивают до 1% (каждого) и прогревают препарат при 100° в течение 2 мин. Концентрация белка при этом должна составлять около 1 мг/мл [Weber et al., 1972]. Если предполагается присутствие в препарате протеаз, прогрев можно продлить до 5 мин. Показано, например, что трипсин и химотрипсин сохраняют значительную каталитическую активность в присутствии 1% ДДС-Na, но прогрев при 100° в течение 5 мин эту активность полностью подавляет [Rogtsi, Preston, 1975]. Если же при высокой температуре наблюдается неферментативный гидролиз белка, то прогревание при 100° можно заменить инкубацией при 37° в течение 2 ч. Перед нанесением препарата на гель в него дополнительно добавляют β-меркаптоэтанол до концентрации 4 — 5%.

Несмотря на жесткость описанной обработки, авторы метода рекомендуют при определении молекулярной массы малоизученного белка проверить полноту его денатурации. Для этой цели они предлагают обрабатывать контрольный препарат белка по более сложной прописи, гарантирующей его полную денатурацию (7 М гуанидинхлорид и 1,5%-ный β-меркаптоэтанол с последующим алкилированием йодацетамидом). После этого формируют комплекс белка с ДДС-Na и сопоставляют картины электрофореза белка, обработанного обычным способом, и контрольного препарата.

С другой стороны, некоторые белки, в частности липопротейды, при кипячении с 1 % ДДС-На и 1 % β меркаптоэтанола могут выпасть в осадок и не войти в гель. В этих случаях приходится уменьшать концентрацию β меркаптоэтанола или не вводить его совсем.

При повышенной температуре иногда обнаруживается усиленный протеолиз исходных белков. Известно, что денатурация белка многократно увеличивает его доступность для атаки протеолитическими ферментами. ДДС-На не входит в число их эффективных ингибиторов. Если опасность протеолиза существует, в исходный препарат до денатурации белков вводят мощные ингибиторы протеаз: фенилметилсульфонилфторид (300 мкг/мл) и 1,10-фенантролин (1 мг/мл).

Проведение электрофореза

Что касается режима электрофореза, т. е. выбора рабочего напряжения, силы тока и продолжительности разделения, то здесь остаются в силе все те соображения, которые были приведены в предыдущем разделе. Вкладом ДДС-На в электропроводность рабочего буфера можно при этом пренебречь. Электрофорез не следует вести на холоду, так как это может повлечь за собой выпадение ДДС-На в осадок (его растворимость очень сильно зависит от температуры). При длительном электрофорезе электродные буферы следует обновлять.

Для белков с молекулярной массой менее 12000 определение ее электрофорезом в ПААГ с ДДС-На становится ненадежным даже при высокой концентрации геля. В этом случае локальные различия в составе и заряде белков, влияющие на их взаимодействие с ДДС-На, уже не усредняются. Степень надежности определения молекулярной массы малых белков и олигопептидов увеличивается, как было указано, при введении в буфер 8М мочевины, а также при увеличении степени сшивки геля. В 12,5%-ном ПААГ с 0,1% ДДС-На в присутствии 8М мочевины при электрофорезе малых (данзилированных) олигопептидов с диапазоном M от 1 до 12 тыс. дальтон наблюдалась хорошая линейная зависимость $\lg M$ от R_f [Kato et al., 1975], однако точки для инсулина ($M=5782$) и глюкогона ($M=3483$) и з графика этой зависимости выпадали.

Разделение улучшается в случае малых исходных количеств белка (1 — 5 мкг) и длинных гелей с расстоянием миграции около 15 см. При определении молекулярной массы неизвестного белка лучше начать подбор условий с 7,5%-ного ПААГ и соответствующего набора стандартных маркеров. Затем следует варьировать условия — и, в частности, сопоставить значения молекулярной массы исследуемого белка, получающиеся в гелях с различным содержанием акриламида.

В цитированной выше работе Вебера и др. приведен список около 40 стабильных белков, которые можно использовать в ка-

честве стандартных маркеров в интервале M 12— 20 0 тыс. дальтон. Однако молекулярные массы продажных белков, особенно при $M > 70$ тыс., далеко не всегда надежно известны, поэтому фирма BDH при разработке своих стандартных наборов маркеров пошла по другому пути. Она готовит каждый из наборов на основе только одного белка с хорошо известным значением M , сшивая его в димеры, тримеры и далее вплоть до гексамеров обработкой глутаровым альдегидом. Аналогичный подход в свое время был описан и в лабораторной практике [Почуе, 1971]. Кстати, автор цитируемой работы проводил одновременно и данирование своих маркерных белков, что позволяло ему фиксировать их положение при УФ-освещении без окраски геля.

При определении молекулярной массы *коллагена* использование глобулярных белков в качестве маркеров возможно в том случае, если строить график зависимости от расстояния миграции не самой молекулярной массы белка, а длины его полипептидной цепи (логарифма числа аминокислотных остатков). Скорость миграции зависит именно от размера молекулы белка — переход к молекулярной массе предполагает некое среднее ее значение, приходящееся на один остаток. Между тем, в состав коллагенов входит необычно много легких аминокислот: глицина, аланина, пролина [Noelken et al., 1981].

Окрашивание и элюция белков

Эти вопросы рассмотрены ниже в специальных параграфах, но все же имеет смысл несколько замечаний, связанных с использованием ДДС-На, сделать именно здесь

После электрофореза в присутствии ДДС-На гель окрашивают, как обычно, например, в 0,25%-ном растворе СВВ R-250 (см. ниже) в 9%-ной уксусной кислоте, содержащей 45% метанола, в течение нескольких часов при комнатной температуре, а затем отмывают в 7,5%-ной уксусной кислоте с 5% метанола и добавкой ионообменника AG 501 Ж для связывания красителя. Фиксация белков идет одновременно с их окрашиванием. Однако следует иметь в виду, что ДДС-На является эффективным детергентом и препятствует осаждению, а следовательно, и фиксации белков. Для малых белков фиксация при окрашивании может оказаться ненадежной. Их лучше фиксировать предварительно, вымачивая гель в 10%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). ДДС-На, находясь в комплексе с белком, еще и препятствует в некоторой мере самому процессу окрашивания. 10%-ная ТХУ частично отмывает белок от ДДС-На. Еще лучше это можно делать, вымачивая гель в 50%-ном растворе ТХУ (в течение ночи). Изопропанол ускоряет вымывание ДДС-На, поэтому его целесообразно включить в фиксирующий белки раствор.

Можно окрашивать белки в геле, вымачивая его прямо в 0,05%-ном растворе СВВ R-250 в 10%-ной ТХУ. Краситель до-

вольно плохо растворим в ТХУ, поэтому происходит его распределение между жидкой фазой и белками в пользу последних. Белковые полосы проявляются очень быстро, и гель можно от красителя не отмывать. Однако чувствительность окраски несколько снижена по сравнению со стандартной процедурой. Ниже будут оценены возможности повышения ее чувствительности с помощью таких флюоресцентных красителей, как данзилхлорид, флюоресцамин, ортофталевый альдегид и др. Здесь уместно отметить, что их присоединение к белкам исходного препарата не влияет на электрофоретическую подвижность этих белков.

Белок из неокрашенного геля можно извлекать одним из подробно рассмотренных ниже способов, в частности повторной элюцией из кусочков геля встряхиванием в течение 6 — 12 ч при 37° с четырехкратным объемом 0,01 М бикарбоната аммония с 0,1% ДДС-На. Объединенные элюаты лиофилизируют, удаляя бикарбонат, и растворяют в воде до 0,1 исходного объема. Затем для удаления ДДС-На добавляют 9 объемов (по отношению к воде) ацетона, лучше подкисленного, так как в нем хорошо растворяется ДДС-На. Белок осаждают центрифугированием и промывают 90%-ным ацетоном. В случае необходимости более полного освобождения белков от ДДС-На лиофилизированный, как указано выше, элюат из геля растворяют снова в 0,1 объема, но не воды, а 0,05 М раствора бикарбоната аммония с 6 М мочевиной (для предотвращения неспецифической сорбции белка на смоле). Раствор пропускают через микроколонку с Dowex 1 × 2 (200 — 400 МЕШ), уравновешенную тем же буфером. Мочевину затем удаляют диализом.

Электрофорез белков в комплексе с ДДС-На сейчас в подавляющем большинстве случаев ведут в системе, предложенной Лэммли [Laemmli, 1970]. В этой системе обработка белка ДДС-На совмещена с использованием описанной ниже схемы ступенчатого электрофореза. Такое усложнение не кажется всегда оправданным, поскольку достаточно хорошее сужение исходной белковой полосы можно получить просто за счет добавления буфера, в котором вносится препарат. Большой интерес, по-видимому, представляет сочетание обработки белка ДДС-На с использованием градиента пористости геля. Этот прием будет рассмотрен ниже.

Электрофорез белков в комплексе с ДДС-На был успешно использован для фракционирования белков хроматина без их предварительной очистки. Хроматин диализовали в течение 12 ч против 0,01 М Na-фосфата с 1% ДДС-На и 1% β-меркаптоэтанола при комнатной температуре, а затем еще 12 ч — против свежей порции такого же раствора при 37°. Только после этого его прогревали в течение 3 мин при 100° и диализовали еще 2 раза по 12 ч против того же буфера, но содержащего вдесятеро меньше ДДС-На и (β-меркаптоэтанола. При такой обработке ДНК отделяется от белка и не мешает протеканию последующего электрофореза белков хроматина [Elgin, 1975].

СТУПЕНЧАТЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ (DISC-ELECTROPHORESIS)

Отличительной особенностью этой системы является полимеризация в одной трубке или пластине двух гелей: рабочего, мелкопористого, и непосредственно над ним — «формирующего», крупнопористого. Кроме степени пористости, эти два геля резко различаются по pH и молярности буферов, в которых они полимеризуются. Отсюда и название системы — ступенчатый электрофорез. По-английски его сокращенно называют «disc-electrophoresis» (от слова «discontinuous» — прерывистый). Этот вид электрофореза был предложен Орнстейном и Дэвисом еще в самом начале становления метода электрофореза в ПААГ [Ornstein, Davis, 1964].

Пористость, длина и выбор буфера для нижнего (рабочего) геля определяются точно такими же соображениями, что и для простого непрерывного электрофореза. Единственное, что здесь своеобразно — это обязательное использование в составе рабочего буфера быстроподвижных ионов, мигрирующих в том же направлении, что и белки, например: иона Cl^- для щелочных буферов или иона K^+ — для кислых. Выше отмечалось, что использование таких ионов невыгодно, так как приводит к ограничению напряженности поля и скорости миграции белков. Однако в данном случае использование «быстрых» ионов диктуется самим существом метода, как это будет ясно из дальнейшего изложения. Заметим, кстати, что если концентрация этих ионов и зависит от pH буфера, то их электрофоретическая подвижность от pH совершенно не зависит.

В формирующем геле небольшой протяженности (1—3 см) фракционирования белков не происходит. Наоборот, назначение этого геля — собрать смесь всех белков перед переходом в рабочий гель в одну узкую полосу, толщина которой может составлять сотые доли миллиметра независимо от первоначального объема препарата. Для рабочего геля она является исходной зоной для фракционирования, а это резко повышает его разрешающую способность. Поскольку в формирующем геле белки разделяться не должны, его концентрацию стараются сделать минимальной ($T=2,5—3$). Формирующий гель полимеризуют обычно в таком же по составу буфере, что и рабочий гель (следовательно, он тоже содержит быстроподвижный ион), однако по концентрации и значению pH эти буферы не одинаковы. Буфер формирующего геля, как правило, почти нейтральный, буфер рабочего геля — щелочной или кислый. Смысл этого различия будет раскрыт ниже.

Важную роль в ступенчатом электрофорезе играет выбор электродного буфера, находящегося в контакте с белковым препаратом и формирующим гелем («верхнего» буфера в случае использования системы с вертикальным расположением геля). В этом буфере подвижность иона, мигрирующего в том же на-

правлений, что и белок, должна сильно зависеть от pH. Для этого удобно использовать цвиттерионы, например простые аминокислоты (глицин и β -аланин). Их изоэлектрические точки лежат в нейтральной области pH (для глицина $pI=5,97$). При этом диссоциации карбоксила с потерей протона и появлением отрицательного заряда соответствует $pK_{a1}=2,34$, а ионизации концевой аминогруппы с присоединением протона и образованием положительного заряда— $pK_{a2}=9,6$. При pH 5,97 все молекулы глицина ионизированы по обоим концам и их суммарный заряд равен нулю.

При сдвиге pH окружающей среды в щелочную сторону происходит нейтрализация *части* молекул глицина по аминогруппе, в то время как карбоксильные остатки всех молекул сохраняют свой отрицательный заряд. Процесс этот—чисто статистический, и для каждой отдельной молекулы можно говорить только о большей или меньшей вероятности того, что она превратится в отрицательный ион или останется нейтральной. В совокупности же множества молекул при данном pH заряд будет нести вполне определенная их доля. При незначительном сдвиге pH от изоэлектрической точки, например при pH 6,8, эта доля будет очень мала. При $pH=pK_{a2}$ (9,6), согласно определению pK , уже половина всех молекул должна быть нейтрализована по аминогруппе и, следовательно, заряжена отрицательно. Для фигурирующих ниже значений pH 8,3 и 8,9 количество отрицательных ионов глицина будет меньше 50%, но все-таки значительным.

Описанные изменения доли заряженных молекул глицина (или аланина) используются в системе ступенчатого электрофореза. Для разных ступеней используют разные буферы, содержащие, однако, в своем составе одно и то же слабое основание или слабую кислоту, обеспечивающие собственно буферный эффект: в щелочной буферной системе, где удобно фракционировать кислые белки, это может быть Трис, а в кислой системе для разделения гистонов—уксусная кислота.

Рассмотрим для примера щелочную систему Орнштейна и Дэвиса (рис. 21). Верхним буфером служит 0,005 М Трис, титрованный добавлением глицина до pH 8,3. Глицин по отношению к Трису выступает в роли слабой кислоты. Для достижения pH 8,3 концентрацию глицина приходится довести до 0,038 М. При pH 8,3, как мы видели, значительная доля его молекул должна быть заряжена отрицательно, что обеспечивает хорошую электропроводность верхнего электродного буфера.

Крупнопористый формирующий гель полимеризуют в 0,0625 М Трис-НСl, pH 6,8. В таком же буфере вносят и препарат (с добавкой, как обычно, до 10% глицерина или сахарозы). Первоначально электропроводность этого буфера будет тоже высокой благодаря ионам Cl⁻. Их концентрация при pH 6,8 достаточно высока (см. выше).

Наконец, рабочий гель полимеризуют в 0,375 М Трис-НСl, pH 8,9. Обращает на себя внимание высокая концентрация бу-

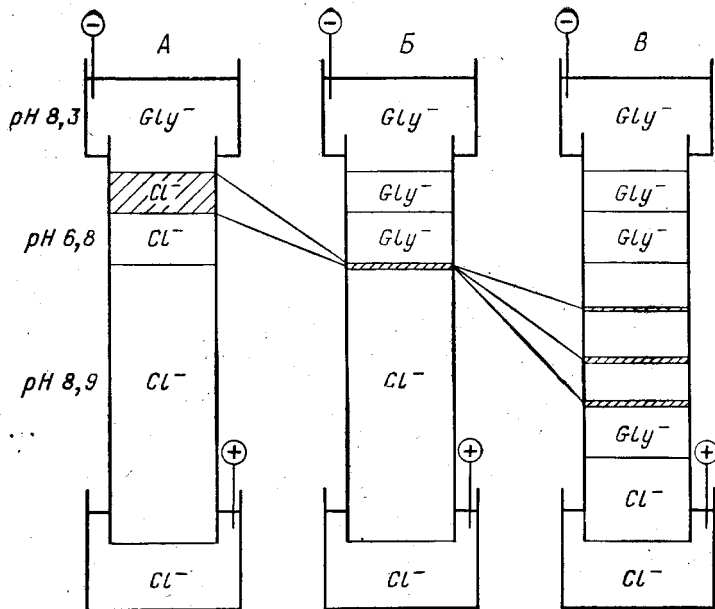


Рис. 21. Схема ступенчатого электрофореза
A — перед включением напряжения; *Б* — момент концентрирования препарата в тонкую исходную полоску; *B* — фракционирование белковых зон

фера, необходимая по двум причинам. Во-первых, при pH 8,9 буферная емкость Трис-НСI уже мала, а в этом буфере должны мигрировать сконцентрированные белковые полосы. Во-вторых, относительное содержание ионов Cl⁻ при таком значении pH невелико, и для обеспечения необходимой электропроводности концентрацию буфера приходится увеличивать. Нижний электродный буфер существенной роли не играет. Например, можно взять 0,1 М Трис-НСI, pH 8,1.

Теперь рассмотрим процессы, протекающие в этой системе после включения электрического напряжения. В первый момент напряженность поля будет примерно одинаковой во всех ступенях системы и начнется переход белков из буфера препарата в формирующий гель. В это же время в верхней части формирующего геля начнет развиваться новая ситуация. Под действием поля ионы Cl⁻ будут быстро уходить в направлении рабочего геля, а на их место из электродного буфера будут поступать ионы глицина. Но здесь они окажутся в буфере с pH 6,8. При этом, как следует из изложенного, большинство молекул глицина восстановит заряд своих аминокрупп, нейтрализуется и перестанет участвовать в проведении тока. Сопротивление буфера препарата, а за ним и верхней части формирующего геля резко возрастет. Вместе с ним возрастет и напряженность поля. Не-

многочисленные при pH 6,8 заряженные молекулы глицина ускорят свое движение к аноду, обеспечивая непрерывность электрического тока по всему гелю.

Неправильно представлять себе дело так, что только малое число молекул глицина будет мигрировать в поле, а остальные останутся на месте. Состояние диссоциации-ассоциации аминокислотных групп—это статистическое равновесие, захватывающее всю совокупность молекул глицина, находящихся в растворе. Поэтому все они (рывками) будут мигрировать в направлении анода, но в каждое мгновение электрический заряд будет переносить лишь небольшое число молекул, заряженных именно в это мгновение. Но вернемся к событиям, развивающимся в геле.

Мы видели, что в верхней части формирующего геля возникает область повышенной напряженности поля, в которой оказываются и успевшие перейти в гель белки. Естественно, что они мигрируют в ней относительно быстро. Так же быстро идет переход белков из буфера препарата в формирующий гель. Впрочем, белки мигрируют все же медленнее, чем ионы глицина, так как отношение заряда к массе у белков меньше. Описанные явления постепенно распространяются на весь формирующий гель. Ионы хлора, отступая, очищают весь объем этого геля. Вплотную за ними к границе с рабочим гелем подходит глицин. Теперь весь формирующий гель находится в зоне повышенной напряженности поля. В этом поле ускоренно движутся белки, уже перешедшие из исходного раствора препарата в формирующий гель. Никакого их концентрирования пока не происходит; оно начнется лишь тогда, когда впереди идущие молекулы белка достигнут границы рабочего геля. Тем временем линия раздела ионов хлора и глицина уйдет уже в рабочий гель, где замена одних ионов на другие не вызовет увеличения напряженности поля. Дело в том, что здесь молекулы глицина оказываются при pH 8,9, который обеспечивается степенью ионизации и высокой концентрацией Триса. При этом pH большая часть нейтральных молекул глицина снова превращается в ионы. Эти нейтральные молекулы оказались в рабочем геле в силу статистического характера миграции глицина, который был описан выше. Электропроводность Трис-глицинового буфера в верхней части рабочего геля оказывается столь же высокой, как и Трис-HCl (этого добились подбором pH 8,9 и концентрации всех компонентов системы). Напряженность электрического поля в рабочем геле соответственно остается низкой, и это обстоятельство играет решающую роль в концентрировании белков.

Впереди идущие молекулы белков достигают границы раздела и переходят в рабочий гель, где попадают в область низкой напряженности поля. Скорость их миграции резко падает. Между тем следующие за ними молекулы белка еще движутся в объеме формирующего геля, т. е. в области высокой напряженности поля, и движутся быстро. Потом и они входят в рабочий гель и почти останавливаются. Это происходит со всеми моле-

кулами препарата. Находившиеся далеко сзади молекулы белка догоняют (почти догоняют) ушедшие вперед молекулы. Весь исходный препарат, каков бы ни был его начальный объем, в самом верху рабочего геля стягивается в тонкую полоску белков. Отсюда и начинается их медленная миграция в мелкопористом геле при щелочном значении рН, т. е. фракционирование белковой смеси. Между тем граница раздела ионов хлора и глицина уходит все дальше вперед, и через какое-то время весь рабочий гель оказывается в Трис-глициновом буфере примерно с тем же рН. Замена буфера не сказывается на разрешающей способности рабочего геля, а то обстоятельство, что фракционирование белков начинается с узкой исходной зоны, дает колоссальный выигрыш—разрешающая способность системы в целом резко увеличивается. Для полноты картины отметим, что заряженные ионы Трис⁺, участвуя в поддержании рН буфера, будут, замещая друг друга, медленно мигрировать вверх, в сторону катода. Ввиду малой подвижности этих ионов их вклад в электропроводность невелик.

Аналогичную картину ступенчатого электрофореза легко Представить себе и для кислого буфера рабочего геля. В качестве слабой («буферной») кислоты можно использовать уксусную, а роль быстро мигрирующего иона «поручить» К⁺. В качестве цвиттериона, поставляющего медленно мигрирующие ионы, берут β-аланин. Подбор количественного соответствия концентраций и рН дает следующую пропись для построения системы. Для получения буфера рабочего геля 4,3%-ный водный раствор уксусной кислоты титруют КОН до рН 4,3. Буфер формирующего геля готовят аналогичным титрованием 0,35%-ного раствора уксусной кислоты до рН 5,8. Буфер верхнего электрода (анода) получают из 0,035 М водного раствора α-аланина, титруя его до рН 4,5 опять-таки уксусной кислотой. Напомним (и это следует не упускать из виду, особенно для лабильных белков), что рН буфера рабочего геля во время фракционирования в нем белков оказывается несколько иным, чем первоначальный (примерно на 0,5 выше в случае использования щелочного буфера и настолько же ниже — для кислого).

Мочевину, детергенты (ДДС-На, Тритон Х-100 и Твин-80), а также β-меркаптоэтанол или дитиотреитол можно вводить в состав буферов обоих гелей, например: с целью растворения труднорастворимых белков или для защиты их от окисления.

Как уже упоминалось, ступенчатый электрофорез можно использовать и для разделения белков, находящихся в комплексе с ДДС-На. Такая система была разработана Лэммли еще десять лет назад [Laemmli, 1970]. С тех пор она приобрела чрезвычайную популярность. Хотя выше и было высказано некоторое сомнение в том, что ее использование всегда оправдано, система заслуживает подробного описания.

В качестве рабочего геля в ней используют 10%-ный ПААГ, формирующего—3%-ный; для обоих гелей $S=2,6$. Буфером

рабочего геля, как и у Ористойна и Дэвиса, служит 0,375 М Трис-НС1 (рН 8,8) с добавлением ДДС-На до 0,1%. Попутно отметим, что 0,1%-ный ДДС-На не препятствует развитию бактериальной флоры при комнатной температуре, поэтому его надо хранить на холоду. Электрофорез ведут в трубках диаметром 6 мм и длиной 15 см. Рабочий гель полимеризуют на длину 10 см, формирующий—на 1 см. Для формирующего геля Лэммли использовал буфер вдвое большей концентрации, чем Орштейн и Дэвис (0,125 М Трис-НС1, рН 6,8, с 0,1% ДДС-На). Для полимеризации в оба геля он вносил по 0,025% персульфата аммония и ТЕМЕД. Верхний электродный буфер Лэммли содержал Трис впятеро более высокой концентрации, чем цитировалось выше (0,025 М), титрованный глицином до той же величины рН (8,3), чему соответствовала и впятеро более высокая концентрация глицина (0,192 М). 0,1% ДДС-На присутствовал и в этом буфере.

Белковый препарат (0,2—0,3 мл) вносят в 0,0625 М Трис-НС1 (рН 6,8), содержащем 10% глицерина и 0,001% бромфенолового синего. В препарат добавляют ДДС-На до 2% и β-меркаптоэтанол до 5%, а затем прогревают его в течение 1,5 мин на кипящей водяной бане. Цель такой обработки была указана выше. Если исходный белковый препарат имеется в виде осадка, то его следует сначала растворить в буфере, а потом уже добавлять ДДС-На из концентрированного раствора. В противном случае на поверхности осадка комплекс белок—ДДС-На может образовать корку, препятствующую его полному растворению [Maizel, 1971].

Электрофорез при силе тока 3 мА на трубку занимает 7 ч. Фиксацию белков в 50%-ном растворе ТХУ ведут в течение ночи, окрашивание свежеприготовленным 0,1%-ным раствором СВВ R-250 в 50%-ной ТХУ—в течение часа при 37°. Избыток красителя из геля вымывают диффузией в 7%-ной уксусной кислоте.

Система Лэммли так же успешно используется для электрофореза в пластинах ПААГ. Для иллюстрации на рис. 22 показано расположение полос при сопоставлении субъединичного состава трех РНК-полимераз амёбы [D'Alessio et al., 1979]. Хорошо видна высокая степень разрешения близких по молекулярной массе полипептидов. Иногда ступенчатый электрофорез по Лэммли используют в сочетании с градиентом пористости рабочего геля, что еще более повышает разрешающую способность метода [Mahadik et al., 1976]. В случае угрозы агрегации, например при фракционировании кислых белков хроматина, в оба геля системы Лэммли можно ввести мочевины [Wilson, Spelsberg, 1975].

Имеются подтвержденные данные о том, что система, предложенная Лэммли, чувствительна к качеству ДДС-На [Swaney et al., 1974; Matheka et al., 1977]. Препараты, полученные от одних фирм («Pierce», «Matheson, Coleman and Bell»), дают хорошие результаты, в то время как с другими препаратами ДДС-

Na (BDH, «Serva») разрешение получается плохое, а белки менее подвижны. Этот эффект зависит и от того, какие белки разделяются. Для других буферных систем он не наблюдается, но белки разделяются в них зачастую вообще хуже, чем в системе Леммли. Природа описанного эффекта непонятна. По-видимому, при высокой концентрации Триса связывание ДДС-На с белками зависит от молекулярного состава детергента. Анализ методом газовой хроматографии показывает, что продажные препараты ДДС-На неоднородны. В них может содержаться до 10% примесей, имеющих значительно больше чем 12 атомов углерода на молекулу.

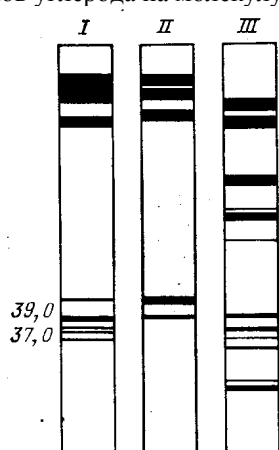


Рис. 22. Фракционирование РНК-полимераз I, II и III амебы в системе Лэммли [D'Alessio et al., 1979] Цифры слева — молекулярные массы некоторых субъединиц (тыс. дальтон)

Отмечено также, что некоторые, особенно высокомолекулярные, белки после первоначального полного их восстановления обработкой β меркаптоэтанолом и ДДС-На в ходе электрофореза снова частично окисляются с образованием дисульфидных мостиков между полипептидными цепями, что приводит к размыванию полос и невоспроизводимости результатов разделения. Рекомендуется восстановленное состояние белкового препарата закреплять путем его алкилирования по SH-группам обработкой йодацетамидом. Для этого исходный препарат инкубируют с избытком этого реагента по отношению к количеству внесенного для восстановления белка β меркаптоэтанолола при 50° в течение 15 мин. От избытка йодацетамида и побочных продуктов реакции можно не избавляться, а наносить всю инкубационную смесь прямо на гель [Lane, 1978].

Ступенчатый электрофорез в сочетании с

обработкой ДДС-

На успешно используется для пептидного анализа и сопоставления белков по пептидному составу. В 1977 г. группа авторов с участием Лэммли предложила для этой цели систему двумерного электрофореза, в которой ферментативный гидролиз белков проводят без их элюции, непосредственно в геле, после чего ведут электрофорез во втором направлении, позволяющий сопоставлять пептиды [Cleveland et al., 1977]. В первом направлении используют описанную выше систему Лэммли для разделения смеси сопоставляемых белков. После кратковременной окраски с целью обнаружения полос индивидуальных белков последние

вырезают и вымачивают в буфере формирующего геля. Затем их помещают в карманы пластины геля второго направления, добавляют туда по 10 мкл того же буфера, но содержащего 20% глицерина, а потом наслаивают еще по 10 мкл буфера, но с 10% глицерина, в котором растворена соответствующая протеаза. Во втором геле снова сформирована система ступенчатого электрофореза по Лэммли. Включают напряжение, а когда бромфеноловый синий приблизится к границе рабочего геля, напряжение на 30 мин отключают. За это время протеаза, которая тоже перешла в формирующий гель, гидролизует белок непосредственно в нем. В присутствии ДДС-На протеолиз проходит не полностью, но в определенных условиях воспроизводимо. В ходе дальнейшего электрофореза пептиды разделяются и могут быть сопоставлены в параллельных треках пластины.

Без существенных изменений этот подход был использован и другими авторами [Przybyla et al., 1979; Gadasi et al., 1979]. В аналогичной работе (Bordier, Crettol-Jarvinen, 1979) в первом направлении использовали систему Лэммли в сочетании с градиентом пористости рабочего геля в пластине—концентрация ПААГ изменялась от 5 до 17,5%. При внесении в карманы геля второго направления полоски индивидуальных белков, вырезанные из пластины первого направления, заливали расплавленным 1%-ным раствором агарозы, чтобы фиксировать их исходное положение на дне кармана. В другой недавней работе [Nikodem, Fresco, 1979] белки гидролизовали бромистым цианом. Как и в предыдущей работе, в первом направлении белки фракционировали ступенчатым электрофорезом с обработкой ДДС-На в градиенте пористости геля, вырезали слегка окрашенные полоски белков и обрабатывали их VgCN прямо в геле. Реакцию вели в маленьких пластмассовых флаконах под тягой. Затем полоски геля вымачивали в буфере и переносили в карманы пластины второго направления для разделения пептидов. Другие авторы [Boulikas et al., 1980] аналогичным образом проводили промежуточный гидролиз белков в геле N-бромсукцинимидом. В первом направлении белки разделяли электрофорезом в «кислой мочеvine».

Особенно совершенной оказалась двумерная система фракционирования белков и пептидов, предложенная О'Фаррелом [O'Farrel, 1975]. В этой системе во втором направлении также использована методика Лэммли в сочетании с градиентом пористости ПААГ. Подробный разбор системы О'Фаррела и ее модификаций здесь провести нельзя, поскольку в первом направлении в ней используется не электрофорез, а электрофокусирование.

ГРАДИЕНТ ПОРИСТОСТИ ПААГ

В конце предыдущего раздела было рассмотрено несколько примеров использования градиентов пористости ПААГ. Теперь рассмотрим возможности этого метода подробнее.

Техника приготовлений гелей с изменяющимися вдоль направления миграции белков размерами пор, или, как их называют, «градиентов пористости ПААГ», была подробно описана в главе 2. Постепенное уменьшение среднего размера пор вдоль градиента достигается путем увеличения концентрации акриламида. Электрофорез в градиенте пористости ПААГ имеет целый ряд существенных преимуществ.

Во-первых, ему присуще *самоограничение миграции* белков в геле. По мере продвижения в электрическом поле белковые зоны попадают в области все более мелких пор, трение о гель усиливается и движение зон замедляется. Если размеры белков достаточно велики, то в какой-то момент времени миграция их может практически прекратиться. Для разных зон этот момент наступает не обязательно одновременно. Белки каждой зоны мигрируют до своего конечного положения, соответствующего их размерам, независимо друг от друга. Достигнув этого положения, они могут оставаться в нем неограниченно долго. Для белков разной величины конечные положения окажутся в разных участках градиента пористости. К моменту окончания процесса фракционирования в целом все белковые зоны займут свои стационарные положения и останутся в них до тех пор, пока будет включено электрическое напряжение. Таким образом, экспериментатору нет нужды наблюдать за окончанием электрофореза. Его продолжительность можно выбрать «с запасом», например поставить опыт на ночь.

Во-вторых, в ходе электрофореза происходит непрерывное *сужение* белковых зон. Оно происходит потому, что белки в передней части каждой зоны постоянно оказываются в области чуть более мелких пор, чем идущие в задней части этой же зоны. Впереди идущие белки, таким образом, тормозятся гелем немного сильнее, а идущие сзади их постепенно догоняют. Этот процесс противодействует диффузии белков из зоны. Убедительная иллюстрация эффективности такого противодействия была приведена выше (см. рис. 16).

При электрофорезе в градиенте пористости ПААГ отпадает необходимость в первоначальном сужении полос. Можно вести электрофорез в простой непрерывной системе и не очень заботиться об объеме исходного препарата. Сделанное замечание находится в противоречии с цитированными выше недавними работами, где градиентный гель использовали в сочетании со ступенчатым электрофорезом по Лэммли. Возможно, что при таком сочетании хорошее разделение зон достигается быстрее, но не исключено, что в некоторых конкретных случаях оно обусловлено определенным консерватизмом и «перестраховкой».

По существу, картина разделения белковых зон при электрофорезе в градиенте пористости ПААГ зависит только от соотношения размеров белков в препарате и характера градиента пористости. Выбор буфера и электрического режима электрофореза играет второстепенную роль. Поэтому, в частности, можно

использовать любые буферы сравнительно малой концентрации (0,03—0,05 М), достаточной лишь для сохранения знака заряда белка. Это позволяет повысить напряженность поля, что для данного метода немаловажно, так как скорости миграции белков при приближении к конечным положениям существенно уменьшаются.

Указанные преимущества объясняют растущую популярность градиентных гелей, несмотря на большую сложность их приготовления по сравнению с обычным ПААГ. Легко понять, почему такая ведущая фирма, как «Pharmacia», специализировалась на выпуске стандартизированных градиентных ПААГ. Фирма предлагает гели в виде пластин с рабочими размерами 78x78x2,7 мм для двух интервалов концентраций ПААГ: 2—16% и 4—30% (РАА 2/16 и РАА 4/30). Профиль градиента пористости в этих пластинах подобран так, что в пределах некоторого диапазона молекулярных масс нативных глобулярных белков они обеспечивают линейную зависимость расстояния миграции белка (до конечного положения) от логарифма его молекулярной массы. Калибровочные данные прилагаются фирмой к каждому гелю вместе с указанием стандартных условий фракционирования. Рабочие диапазоны молекулярных масс таковы: для РАА 2/16—от 100 тыс. до 5 млн. дальтон, для РАА 4/30—от 50 тыс. до 2 млн. Для РАА 4/30, например, это означает, что при достаточно длительном электрофорезе белки с молекулярной массой менее 50 тыс. могут выйти из геля, а имеющие массу более 2 млн.—не войдут в него. Последняя цифра может относиться, конечно, только к белковым комплексам или нуклеиновым кислотам.

Градиентами пористости ПААГ можно, как мы видели, пользоваться и для разделения комплексов белок—ДДС-Na. Ламбен обнаружил, что для белков, обработанных ДДС-Na, линейный градиент концентрации ПААГ в интервале 3—30% позволяет проводить электрофорез до полной обстановки белков с молекулярными массами от 13 до 950 тыс. дальтон. При этом справедливо следующее линейное соотношение: $\lg M = A \lg T + B$, где M —молекулярная масса белка, а T —концентрация ПААГ в месте расположения белковой полосы. Для линейного градиента эта концентрация легко вычисляется по расстоянию полосы от начала пластины. A и B —коэффициенты, указывающие на линейный характер зависимости. Определять их нет нужды, если имеется возможность воспользоваться, как обычно, набором маркерных белков. Обработку исходного препарата можно проводить в тех же условиях, что для обычного электрофореза в ПААГ с ДДС-Na [Lambin, 1978].

Недавно Ламбен и Фаин [Lambin, Fine, 1979] предложили способ определения молекулярной массы нативных белков (без ДДС-Na) по кинетике их миграции в линейном градиенте концентрации ПААГ (3—20%). Оказалось, что для любого белка характер его непрерывно замедляющегося движения в таком

геле хорошо описывается линейной зависимостью: $\sqrt{t} = aD + b$, где t —любой момент времени с начала электрофореза, пока белок еще движется; D —пройденное им к этому моменту расстояние в геле; a и b — постоянные в данном опыте величины.

Для каждого конкретного белка такую зависимость легко получить экспериментально. Удобно, например, в разные карманы одной пластины геля последовательно, через известные промежутки времени, вносить аликвоты раствора исследуемого белка. К моменту прекращения опыта для каждого трека на пластине будет известна продолжительность электрофореза, а расстояние миграции легко измерить. Это можно сделать даже для смеси нескольких белков. Далее по экспериментальным точкам строят график зависимости \sqrt{t} от D , имеющий вид прямой линии. Тангенс угла наклона этой прямой—значение коэффициента a в написанном выше уравнении. Ясно, что этот коэффициент должен зависеть от молекулярной массы белка: чем он крупнее, тем медленнее мигрирует в геле. Оказывается, что соотношение между логарифмами коэффициента a и молекулярной массы белка имеет тоже приблизительно линейный характер в широком интервале молекулярных масс—от 20 до 950 тыс. дальтон. Коэффициенты в этом втором линейном уравнении зависят от выбора буфера. Авторы дают их значения для трех стандартных буферов: фосфатного (рН 7,2), Трис-боратного (рН 8,2) и Трис-барбитуратного (рН 9,8). Так, для 0,01 М Na-фосфатного буфера (рН 7,2) имеет место зависимость: $\lg M = 1,93 \lg a + 6,99$. Точность определения молекулярной массы невысока—в среднем $\pm 20\%$. Однако важное достоинство метода состоит в возможности оценивать суммарную молекулярную массу белков, состоящих из субъединиц, которые диссоциируют при обработке ДДС-Na. Таким образом, комбинируя результаты определения молекулярной массы некоего белка описанным методом с тем, что дает для него же электрофорез с использованием ДДС-Na, можно выяснить субъединичное строение белка.

В заключение следует подчеркнуть, что градиентный гель хорош только для разделения белков по размерам. В случае разделения по заряду он может даже ухудшить результат, так как белки с различной величиной заряда, но одинаковых размеров при длительном электрофорезе остановятся в одном и том же месте.

ДВУМЕРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПААГ

Полное разделение сложной смеси белков далеко не всегда удается осуществить в ходе одного опыта даже с применением описанных выше приемов повышения разрешающей способности электрофореза в ПААГ. Всегда достаточно высока вероятность того, что в данной системе электрофореза различные белки мигрируют в одной зоне либо в силу близости их размеров, либо ввиду совпадения значений их электрофоретических под-

вижностей при выбранном значении рН, либо, наконец, в результате неблагоприятной для разделения комбинации этих параметров. Поэтому в сложных случаях каждую полосу после первого электрофоретического фракционирования смеси белков следует проверить на гомогенность, используя ее как исходный препарат для электрофореза в *других* условиях. Это можно сделать одновременно для всех полос первого разделения, или, как его часто называют, «разделения в первом направлении». Для этого трубку или полосу, вырезанную по всей длине трека из пластины первого направления, накладывают на стартовую зону пластины «второго направления». Контакт между двумя гелями обеспечивают, заливая место их соприкосновения стартовым буфером или, для надежности, расплавленным раствором агарозы в этом же буфере. Электрофорез ведут в направлении, перпендикулярном длине трубки или полоски. Каждая неомогенная белковая полоса может дать несколько пятен, если при новых условиях электрофореза подвижности первоначально образовавших ее нескольких белков окажутся неодинаковыми. В результате на пластине второго направления после прокрашивания выявляется картина распределенных по всей поверхности пятен, напоминающая «фингерпринт» в двумерной тонкослойной хроматографии. Число пятен, которое удастся различить на одной пластине, в некоторых случаях приближается к двум тысячам (!).

При сочетании гелей двух направлений вовсе не обязательно, чтобы они были одинаковой толщины. Например, гель из трубки диаметром 6 мм вполне можно совместить с пластиной толщиной 1 мм. Для этого в месте перехода от трубки к пластине следует образовать продольно расположенную полость, предпочтительно клиновидного сечения, куда можно заложить цилиндр геля и залить его там буфером, агарозой или даже заполимеризовать в переходный, крупнопористый ПААГ. Способ образования и форма сечения этой полости не играют большой роли. Необходимо выполнить только одно условие: цилиндр или полость геля первого направления должны лежать параллельно краю геля в пластине второго направления. Можно, например, воспользоваться простым вкладышем из плексигласа (рис. 23). Этот вкладыш легко монтируется в обычный прибор для электрофореза в вертикальной пластине [Hoffman, Dowben, 1978a]. Иногда из цилиндрика вдоль его продольной оси вырезают плоский, тонкий слой и накладывают его на гель второго направления, как и полосу трека, вырезанную из пластины. Для вырезания плоского слоя из трубки (в замороженном состоянии) удобно воспользоваться простым приспособлением, описанным Уоттсом и др. [Watts et al., 1977].

В каждом из направлений двумерного электрофореза используют одну из рассмотренных выше систем, отвечающую специфическим особенностям фракционируемых белков. Широкое применение двумерный электрофорез нашел, например, для

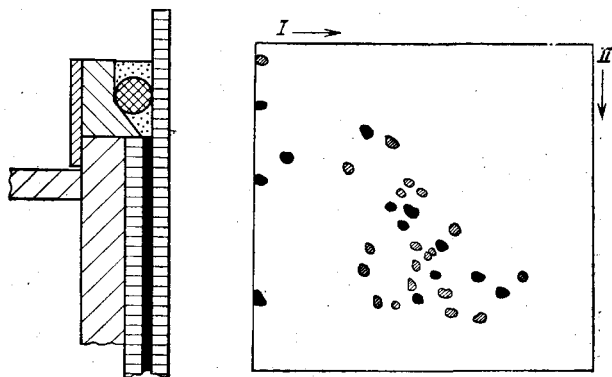


Рис. 23. Вкладыш из плексигласа для двумерного электрофореза [Hoffman, Dowber, 1978a]

Рис. 24. Результаты двумерного электрофореза рибосомальных белков [Mets, Bogorad, 1974]

I—первое направление; II—второе направление

анализа белков рибосом из разных источников. Это, в основном, слабощелочные белки, и в первом направлении их разделяют чаще всего по заряду. Для этого используют крупнопористый гель, чтобы различие молекулярных размеров по возможности не сказывалось на разделении белков в этом направлении, т. е. не накладывалось на разделение по заряду. Во втором направлении в этом случае белки разделяют по их размерам.

Так, Мете и Богорад электрофорез рибосомальных белков в первом направлении проводили в трубках диаметром 4 мм и длиной 10 см [Mets, Bogorad, 1974]. 4%-ный ПААГ полимеризовали в буфере с pH 5. При этом все рибосомальные белки заряжены положительно и различия значений их суммарных зарядов выражены наиболее ярко. В буфер вводили 8 М мочевины, чтобы помешать агрегации белков. При полимеризации геля вносили больше ТЕМЕД, чем персульфата аммония (0,1 и 0,03%), так как в кислой среде каталитическая активность ТЕМЕД понижена (см. главу 2). 0,1—0,2 мг смеси рибосомальных белков вносили растворенными в 8 М мочевины с 10 мМ диэтиотреитолом. Разделение вели при силе тока 1,5 мА на трубку в течение 4—5 ч. Во втором направлении использовали ступенчатый электрофорез. Рабочим гелем служил 10%-ный ПААГ, полимеризованный в буфере с pH 6,75. Формирующий гель—такой же, как гель первого направления (4% ПААГ, pH 5). Его полимеризовали вокруг геля из трубки, уложенного в клиновидное расширение над пластиной. Концентрацию мочевины в этом геле снизили до 7 М, чтобы цилиндр не мог всплыть во время полимеризации. В качестве медленно мигрирующего иона верхнего электродного буфера использовали MES (2-(N-морфолино-

этенсульфокислоту) — продажный препарат для составления буферов с pK_a 6,15. Быстрым ионом служил остаток уксусной кислоты. В состав верхнего буфера ввели также 1% ДДС-Na и 0,01% тиогликолевой кислоты, которая, как уже упоминалось, служит для очистки гелей от остаточных свободных радикалов персульфата аммония. Она мигрирует из электродного буфера в гель, где и движется впереди белков. Отметим, что преелектрофорез в ступенчатой системе невозможен—он нарушил бы распределение ионов по ступеням. Однако его можно провести предварительно, используя в качестве верхнего обычный буфер с быстро мигрирующим ионом, а затем заменить его, как описано выше. Верхний электрод является катодом, анод расположен внизу. Под действием поля ДДС-Na из верхнего электродного буфера мигрирует в гель. В цилиндрике геля первого направления он образует комплексы с белками. Далее отрицательно заряженные комплексы белок — ДДС-Na выходят из цилиндрика и фракционируются ступенчатым электрофорезом в пластине. Обработка белков ДДС-Na, таким образом, происходит в отсутствие β-меркаптоэтанола. Его отчасти заменяет мочевины; кроме того, исходно, до электрофореза в первом направлении, белки восстанавливают 10 мМ дитиотреитолом. Электрофорез во втором направлении ведут в течение 5 ч при силе тока 25 мА на пластину. Метод удобен тем, что между разделениями в первом и втором направлениях нет надобности вымачивать гель, так как буфер геля первого направления—тот же, что и у формирующего геля второго направления. Результаты электрофореза представлены на рис. 24.

В другой работе [Howard, Traut, 1973] разделение рибосомальных белков по заряду в первом направлении вели тоже в 4%-ном ПААГ в присутствии 6 М мочевины, но в 0,4 М Трис-боратном буфере, рН 8,7. При этом рН часть белков рибосом оказывается заряженной отрицательно, а другая часть—положительно. Белковый препарат смешивали с расплавленной 1%-ной агарозой и вносили в середину трубки, наслаивая его на заполимеризованный нижний участок ПААГ. После затвердевания агарозы в трубку заливали новую порцию смеси мономеров и полимеризовали верхний участок ПААГ. При этом в интересах концентрирования полос на обеих границах с ПААГ агарозу с белковым препаратом полимеризовали в разбавленном (0,06 М) Трис-боратном буфере. При включении напряжения миграция белков шла в обе стороны—к катоду и аноду. Во втором направлении разделение белков вели по их размерам, но без обработки ДДС-Na. Для этого использовали пластину еще более мелкопористого геля, чем в предыдущей работе ($T=18,25$; $C=1,37$), полимеризованного в 0,9 М уксусной кислоте, титрованной КОН до рН 4,5, также с добавлением 6 М мочевины. В этом случае все белки были заряжены положительно и мигрировали к катоду. В качестве лидирующего красителя использовали 0,1%-ный раствор пиронина. Из цилиндрика геля

вдоль его продольной оси вырезали плоскую полоску, вымачивали ее в 0,013 М К-ацетатном буфере (рН 5,2) с 8 М мочевиной. Полоску зажимали между стеклянными пластинками формы и прямо на нее заливали раствор мономеров рабочего геля. Катионом верхнего электродного буфера служил глицин (~0,19 М), титрованный уксусной кислотой до рН 4. Таким образом, осуществлялась система ступенчатого электрофореза, где в качестве быстрого иона выступал K^+ , а медленного—глицин. Отметим, что в системе Орнштейна и Дэвиса глицин фигурировал в качестве медленного аниона, а здесь он служил катионом. Возможность такого двойного использования вытекает из цвиттерионной природы глицина. Формирующим гелем в этой системе служила сама полоска, вырезанная из геля первого направления. Аналогичная система двумерного электрофореза рибосомальных белков описана и в другой работе [Sherton, Wool, 1974].

Гамильтон [Hamilton, 1974] при разделении рибосомальных белков по заряду в первом направлении использовал ступенчатый электрофорез в кислом буфере (7,5%-ный ПААГ с рН 4,6—в рабочем геле, 2,5%-ный ПААГ с рН 6,5—в формирующем). Во втором направлении он вел разделение белков в комплексе с ДДС-На в 15%-ном ПААГ. Обработку детергентом он осуществлял, вымачивая извлеченный из трубки гель первого направления в 1%-ном растворе детергента. В работе были определены молекулярные массы рибосомальных белков (путем сравнения с маркерами во втором направлении) и оценены их количественные соотношения в составе малой субъединицы рибосом печени крысы.

Интересный подход к фракционированию рибосомальных белков был использован в недавней работе [Hoffman, Dowben, 1978b]. При разделении в первом направлении авторы использовали различие в протяженности гидрофобных участков поверхности у разных белков рибосомы. Оно проявлялось в степени связывания этих белков с мицеллами Тритона X-100, который вводили при полимеризации геля до концентрации 0,15%. Комплексы белков с Тритоном X-100 разделяли по размеру в 8%-ном ПААГ в присутствии 2 М мочевины. Концентрация детергента была оптимальной; при меньших концентрациях он мало влияет на подвижность белков, а при больших, как уже отмечалось, препятствует последующей обработке ДДС-На, который в этой работе использовали при фракционировании белков во втором направлении. Подробнее об использовании Тритона X-100 в этих целях будет сказано в следующем разделе.

В качестве лидирующего красителя при фракционировании рибосомальных белков в кислом буфере недавно было предложено использовать $FeCl_3$. Ионы Fe^{3+} в присутствии уксусной кислоты образуют стойкие комплексы коричневого цвета, мигрирующие к катоду впереди самого мелкого из рибосомальных белков [Bernabeu et al., 1979].

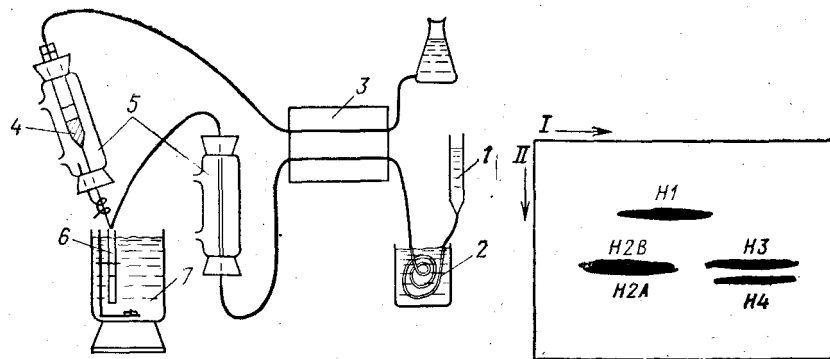


Рис. 25. Сочетание хроматографии с электрофорезом в геле агарозы [Bloom, Anderson, 1979]

I — хроматографическая колонка; 2—обессоливание в «биофибрах», 3 — перистальтический насос; 4—раствор агарозы; 5 — нагреватели; 6— трубка для электрофореза; 7— охлаждающая смесь

Рис. 26. Разделение гистонов сочетанием хроматографии на оксиапатите (направление I) и электрофореза в градиенте концентрации ПААГ (направление II) в присутствии ДДС-Na [Bloom, Anderson, 1979]

Двумерным электрофорезом часто разделяют и другие щелочные белки. Например, факторы инициации белкового синтеза из ретикулоцитов образуют много пятен при фракционировании каждого из них в первом направлении по заряду в кислой мочеvine, а во втором— по размерам ступенчатым электрофорезом в системе Лэммли [Floyd et al., 1979].

Двумерный электрофорез белков хроматина описан Бакаевым и соавторами (Бакаев et al., 1978). В первом направлении хроматин после обработки микрококковой нуклеазой фракционировали в 5%-ном ПААГ и буфере низкой ионной силы (0,01 М ТЭА-HCl, pH 7,6) на олиго-, моно- и субнуклеосомы за счет заряда входящей в их состав ДНК, как это было описано выше. Во втором направлении авторы использовали в одном случае фракционирование белков хроматина по размеру в системе Лэммли после вымачивания геля первого направления в 1%-ном растворе ДДС-Na. Детергент обеспечивал диссоциацию белков от ДНК. В другом варианте разделения диссоциацию осуществляли с помощью цетавлона, а электрофорез во втором направлении вели в кислой мочеvine. Во втором варианте хорошо выявлялась группа быстро мигрирующих негистоновых белков хроматина (HMG-белков). Для анализа этих белков авторы экстрагировали их 0,35 М раствором Na₂S₂O₄, очищали осаждением ТХУ (2—20%) и разделяли двумерным электрофорезом, причем в первом направлении использовали фракционирование по заряду в кислой мочеvine, а во втором — разделение по размерам в 15%-ном ПААГ после обработки ДДС-Na.

Двумерный электрофорез субъединиц различных РНК-полимераз в уже цитированной работе д'Алесслио и соавторов проводили в двух вариантах разделения белков по заряду в первом направлении. В обоих вариантах использовали ступенчатую систему электрофореза: в одном—с кислым буфером (рН 4,3) для рабочего геля, в другом—со щелочным (рН 9,4). Во втором направлении в обоих случаях белки фракционировали по их размерам после обработки ДДС-Na в системе Лэммли [d'Alessio et al., 1979].

Мы не случайно в качестве примеров двумерного электрофореза рассмотрели только случаи фракционирования щелочных белков. Для кислых белков все другие варианты двумерного фракционирования вытеснила уже упоминавшаяся система О'Фарелла. Щелочные белки до последнего времени плохо разделялись в этой системе, однако недавно была предложена ее модификация, позволяющая успешно вести разделение и щелочных белков.

Блум и Андерсон предложили оригинальный метод двумерного разделения белков [Bloom, Anderson, 1979]. Собственно, электрофорез в нем используется только во втором направлении. Фракционирование белков в первом «направлении» осуществляется на хроматографической колонке (рис. 25). Элюат с колонки обессоливают, пропуская его через «биофибры», погруженные в 10%-ный раствор ДДС-Na с 1% β-меркаптоэтанола. Затем его подогревают до 96° и по каплям смешивают с раствором расплавленной при такой же температуре агарозы. Оба раствора подают одним двухканальным перистальтическим насосом, и горячая смесь постепенно заполняет погруженную в лед трубку. Таким образом, в трубке полимеризуется элюат с хроматографической колонки, т. е. по длине геля располагаются белковые зоны в той последовательности, как они выходят из колонки. Затем гель извлекают из трубки и накладывают на пластину ПААГ, заливают расплавленной агарозой и ведут электрофорез в системе Лэммли. В частности, авторы элюировали гистоны с колонки оксиапатита линейным градиентом концентрации NaCl (0—1,5 М) в 1 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6) с 6 М мочевиной. Гистоны выходили, не разделившись, а лишь растянувшись по элюату. Во втором направлении использовали электрофорез в присутствии ДДС-Na в градиенте пористости ПААГ (8—25%). На пластине гистоны оказались прекрасно отделенными друг от друга (рис. 26). В частности, гистоны H2A и H2B далеко отошли от H3 благодаря значительному различию в их сродстве к оксиапатиту.

Исходный препарат в такой постановке опыта может быть и не элюатом с колонки, а реакционной смесью, в которой со временем происходят изменения белкового состава, например в результате протеолиза. Маркерные белки с известной молекулярной массой можно прикалывать при заполнении трубки так, что их положение по ее длине будет заведомо определенным.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРИТОНА X-100 И ЦЕТАВЛОНА

Тритон X-100

Многие белки, например: рибосомальные и мембранные, плохо растворимы в водных буферах. Добавление Тритона X-100 зачастую улучшает их растворимость и, к тому же, в отличие от мочевины, не влечет за собой их денатурации. Сохраняются вторичная и третичная структура белков, а в ряде случаев и их биологическая активность.

Авторы одной из работ [Hearing et al., 1976] растворяли белки до концентрации 1 мг/мл в течение нескольких часов в 1%-ном растворе Тритона X-100. Затем этот раствор смешивали с равным объемом 20%-ной сахарозы в верхнем электродном буфере удвоенной концентрации и в таком виде наносили на формирующий гель в трубке. Тритон X-100, связавшись с белком, может мигрировать вместе с ним, сохраняя растворимость белка, однако разделение полос оказывается более надежным, если 0,1% Тритона X-100 вводят в гель. Правда, при фиксации белков ТХУ Тритон X-100 дает опалесцирующий фон, который приходится дольше отмывать.

Образование комплексов с Тритоном X-100 можно использовать не только для растворения, но и для фракционирования белков. Характер комплекса и количество связанного с белком детергента зависят от протяженности гидрофобного участка на поверхности белковой глобулы. Некоторые белки могут связывать по несколько десятков молекул Тритона X-100 на молекулу (родопсин—до 70). Это дает прирост эффективной молекулярной массы в тысячи, а иногда и в десятки тысяч дальтон (молекулярная масса Тритона X-100 равна 632). Такой прирост легко обнаружить электрофорезом в мелкопористом геле.

В работе Фернандеса и соавторов [Fernandes et al., 1978] белки из бактериальной мембраны экстрагировали до концентрации 4 мг/мл 5%-ной уксусной кислотой с 4 М мочевиной и 5% (v/v) метилцетанола. Иногда уже при экстракции добавляли Тритон X-100 до концентрации 2%, что улучшало выход белков из мембраны, но приводило к появлению дополнительных полос в верхней части геля при электрофорезе. Весьма существенно вносить Тритон X-100 и мочевину в сам гель, причем в определенной пропорции. Мочевина препятствует связыванию Тритона X-100 с белком, тем самым повышая избирательность этого процесса. Оптимальное соотношение концентраций детергента и мочевины для данного типа белков подбирают экспериментально. В цитируемой работе использовали пластину 12%-ного ПААГ ($C = 0,8$), полимеризованного в 5%-ном растворе уксусной кислоты с 8 М мочевиной и 12 мМ (0,75%) Тритоном X-100. Следует иметь в виду, что детергент ухудшает сцепление ПААГ со стеклом. Этим, по-видимому, и было обусловлено понижен-

ное против обычного содержание метиленбисакриламида. Иногда, во избежание выскальзывания мелкопористого геля, содержащего Тритон X-100, из трубки или пластины под ним приходится предварительно заполимеризовать «пробку» обычного ПААГ. Тритон X-100 усиливает опасность окисления белков за счет остаточных свободных радикалов, поэтому особое внимание следует уделить преэлектрофорезу. Авторы работы вели его сначала в течение 3—4 ч при напряжении 240 В до постоянства силы тока, подключив анод к нижнему электроду. Затем в электродные резервуары заливали свежую 5%-ную уксусную кислоту, а в карманы пластины вносили 0,2 М цистамина и до 2 мг/мл протамина, растворенных в 5%-ной уксусной кислоте с 8 М мочевиной. Возобновляли преэлектрофорез еще на 45 мин, меняя полярность напряжения, подаваемого на гель. Только после этого вносили белковые препараты и вели электрофорез при постоянном напряжении 100 В в течение суток при той же полярности напряжения (белки мигрируют к катоду).

В рассматриваемой работе удалось наблюдать значительные различия белкового состава мембран разных штаммов *E. coli* и даже мутантов одного штамма. Было использовано и двумерное разделение. Полоски геля после электрофореза в присутствии Тритона X-100 и мочевины вымачивали по 5 мин сначала в 1,5 М Трис-HCl (pH 8,8) с 1% ДДС-Na, потом в 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8) с 1% ДДС-Na и, наконец, в воде. После этого их переносили на вторую пластину для ступенчатого электрофореза в комплексе с ДДС-Na. Такой двумерный электрофорез позволяет разделять белки, не поддающиеся разделению одним только электрофорезом в присутствии Тритона X-100 и мочевины или ступенчатым электрофорезом по Лэммли.

Электрофорезом в 12,5%-ном ПААГ, полимеризованном в 5%-ной уксусной кислоте с 0,5% Тритона X-100 и 6 М мочевиной, удастся также хорошо разделять разные формы α - и β -цепей глобина [Rovera et al., 1978]. Предварительную денатурацию белков в этом случае проводили в присутствии 5% (β -меркаптоэтанола, так как окисление может существенно изменять гидрофобные свойства белка.

Аналогичное фракционирование гистонов проводили в геле, полимеризованном в 0,9 М уксусной кислоте с 0,38% Тритона X-100 и 8 М мочевиной [Newrock et al., 1978]. Здесь также преэлектрофорез вели сначала с цистамином, затем с протамином. В более поздней работе [Levy et al., 1979] для разделения гистонов использовали другую пропорцию тех же компонентов буфера геля: 7%-ная уксусная кислота+0,22% Тритона X-100 + 4 М мочевины.

Электрофорез в кислой мочеvine с добавкой Тритона X-100 использовали и для очистки гистонов от примеси рибосомальных белков. Тритон X-100 плохо связывается с последними, поэтому при электрофорезе в первом направлении благодаря комплексу с Тритоном X-100 гистоны удается отделить от рибосо-

мальных белков с близкими молекулярными массами. Гистоны мигрируют вместе с относительно более крупными белками рибосом. Во втором направлении электрофорез в пластине 15%-ного ПААГ в присутствии 0,1% ДДС-На позволяет выявить различие истинных молекулярных масс этих двух типов белков. ДДС-На вытесняет Тритон X-100 из комплекса с белком, и относительно более низкомолекулярные гистоны уходят вперед, отделяясь от рибосомальных белков [Savic, Rossia, 1978].

Вообще, двумерный электрофорез гистонов, включающий комплексообразование с Тритоном X-100 в одном из направлений, использовался довольно часто [Hamana, Iwai, 1976; Garnird, 1976; Franklin, Zweidler, 1977; Blankstein et al., 1977]. В последние годы описано применение в тех же целях других, сходных с Тритоном X-100 неионных детергентов. Так, после обычного электрофореза в кислой мочеvine для второго направления был использован 15%-ный ПААГ, полимеризованный в 0,8 М уксусной кислоте, содержащей 0,4% Lubrol WX (фирмы «Sigma») и 6 М мочеvinу [Bhatnagar, Bellve, 1978]. Гистон H2A печени и других органов мыши при этом удалось разделить на два компонента, гистон H3—на три или четыре; в ряде случаев расщеплялся и гистон H1. В другой работе [Allis et al., 1979] был использован Тритон DF-16. В 12%-ном ПААГ, полимеризованном в 5%-ной уксусной кислоте с 0,4% Тритона DF-16 и 6 М мочеvinой, гистоны мигрируют в следующем порядке: H4, H1+H2B, H3 и H2A. Электрофорез по размерам во втором направлении (система Лэммли) разделяет их очень хорошо.

Цетавлон

Цетилтриметиламмонийбромид (цетавлон) — положительно заряженный ионный детергент. Как известно, ДДС-На растворяет не все щелочные белки, зато хорошо растворяет нуклеиновые кислоты, которые могут создавать помехи при электрофорезе белков, входящих в состав нуклеопротеидов. Паним и соавторы предложили заменить ДДС-На на цетавлон [Panym et al., 1977]. Как и ДДС-На, цетавлон способствует растворению белков за счет связывания с гидрофобными участками полипептидов. Благодаря электростатическому отталкиванию положительно заряженных аммониевых групп цетавлона белковые цепи распрямляются и приобретают жесткость. Комплекс белка с цетавлоном, особенно в кислой среде, заряжен заведомо положительно. Вместе с тем цетавлон взаимодействует с нуклеиновыми кислотами как «жирный катион» и осаждает их из раствора.

Использование цетавлона имеет и свои трудности. При взаимодействии с персульфатом аммония он довольно легко выпадает в осадок, поэтому полимеризацию геля приходится вести при слегка повышенной температуре (37°), в термостате. Кроме того, цетавлон осаждает красители типа CBV R-250, поэтому окрашивание геля ведут при температуре 80—100°.

Паним и соавторы для разделения смеси стандартных белков использовали 10%-ный ПААГ ($C=1,5$), полимеризованный в 0,09 М Na-ацетатном буфере (рН 4,6) с 0,09% цетавлона. Примерно таким же буфером заполняли электродные резервуары. Исходный препарат готовили, растворяя белки до концентрации 0,25—0,5 мг/мл в 0,01 М Na-ацетатном буфере (рН 4,6) с 0,5% цетавлона и 1% р-меркаптоэтанола. Назначение последнего — такое же, как при обработке белков ДДС-Na. Белковый раствор кипятили 5 мин или инкубировали 2 ч при 37°, а затем добавляли мочевины до концентрации 6 М. На трубку (10x0,6 см) вносили 20 мкл раствора препарата (5—10 мкг белка). Электрофорез вели при силе тока 8—10 мА на гель и напряженности поля 8—10 В/см. В качестве лидирующего красителя использовали 0,05%-ный раствор Azge A. Белки окрашивали 0,25%-ным раствором СВВ R-250 в 10%-ной уксусной кислоте, содержащей 45% метанола, в течение 30—60 мин при температуре 80—100°. Отмывали излишек красителя в 0,9 М уксусной кислоте при той же температуре.

Как и при электрофорезе с ДДС-Na, в случае обработки цетавлоном также наблюдается линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы белка и расстоянием его миграции в геле. Пользуясь этой зависимостью, удается оценивать молекулярные массы белков в интервале 15—90 тыс. дальтон.

Эли и соавторы недавно предложили модификацию описанной выше системы [Ely et al., 1979]. Они заменили персульфат аммония на флавиномононуклеотид (ФМН) в качестве инициатора полимеризации, которая идет при освещении (ФМН растворим лучше, чем рибофлавин). Это снимает проблему осаждения цетавлона при полимеризации геля.

В качестве рабочего буфера геля использовали 0,1 М Na-фосфат (рН 7) с 0,1% цетавлона. Белковый препарат перед электрофорезом денатурировали в течение 1 мин на кипящей водяной бане в том же буфере, но содержащем 0,5% цетавлона и 10—15% р-меркаптоэтанола. Лидирующий краситель — малахитовый зеленый. Электрофорез в 10%-ном ПААГ при силе тока 8 мА на трубку (10x0,6 см) занимал около 5 ч. Белки фиксировали в кипящей 10%-ной ТХУ, затем окрашивали при комнатной температуре 0,5%-ным раствором СВВ R-250 в 10%-ной уксусной кислоте, содержащей 45% этанола, в течение 10 ч.

Обработку цетавлоном удобно использовать для диссоциации белков от ДНК в хроматине с одновременным осаждением ДНК и последующим электрофорезом комплексов белков с цетавлоном. При низких значениях рН связывание цетавлона с гистонами и негистоновыми белками хроматина носит избирательный характер, что способствует их электрофоретическому разделению.

Фракционирование белков по степени их гидрофобности можно преобразовать в разделение по заряду с помощью следующего приема [Helenius, Simons, 1977]. Для исключения роли размеров белков электрофорез ведут в 1%-ной агарозе, растворенной в 0,05 М глициновом буфере с 0,1 М NaCl и 0,5% Тритона

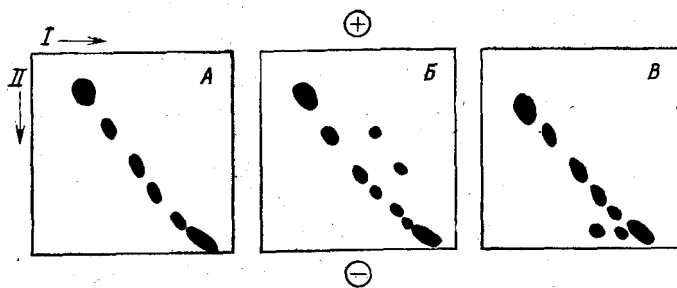


Рис. 27. Обнаружение гидрофобных белков двумерным электрофорезом «со сдвигом заряда» [Bhakdi et al., 1977]
A — без дополнительных детергентов; *Б* — с добавлением ДОХ; *В* — с добавлением цетавлона

X-100 с добавлением в него либо цетавлона до 0,5%, либо дез-оксихолата натрия (ДОХ) до 0,25%. Тритон X-100 образует мицеллы, которые связываются с гидрофобными участками белка в количестве, пропорциональном размеру этих участков. Цетавлон или ДОХ объединяются с Тритоном X-100 в смешанные мицеллы, привнося тем самым в комплекс с белком соответственно положительный или отрицательный заряд, существенно превышающий собственный заряд белка. При электрофорезе белки мигрируют со скоростью, обусловленной знаком и величиной принесенного заряда. Такой прием можно назвать «электрофорезом со сдвигом заряда». Необычное введение в буфер геля 0,1 М NaCl по-видимому, способствует как растворимости белков, так и образованию мицелл. Напряженность поля при этом приходится снижать до 4,5 В/см.

Аналогичный подход был использован для обнаружения гидрофобных белков в двумерном варианте электрофореза [Bhakdi et al., 1977]. Разделение белков в первом направлении (I) вели в 1%-ной агарозе с 0,5% Тритона X-100. Вырезали полоску, переносили ее в форму, куда заливали такой же раствор агарозы, но с добавлением цетавлона или ДОХ. После электрофореза во втором направлении (II) все гидрофильные белки ложились на диагонально расположенную прямую, а гидрофобные выпадали из нее (рис. 27).

Комбинация электрофореза в кислой мочеvine с Тритоном X-100 в первом направлении и такой же системы, но с цетавлоном вместо Тритона, во втором позволила Боннеру и соавторам выявить значительное число дополнительных фракций при разделении гистонов двумерным электрофорезом. В обоих направлениях использовалась система ступенчатого электрофореза (3,3%-ный ПААГ—формирующий, 15 %-ный— рабочий). Полимеризацию вели с рибофлавином. После электрофореза в первом направлении белки фиксировали и окрашивали СВВ. При этом отпадала необходимость вести электрофорез во втором на-

правлении немедленно по окончании первого разделения И обеспечивалась возможность оценить качество последнего. Цетавлон, который вносили в верхний электродный буфер (0,15%), мигрируя под действием поля через полоску препарата, снова растворял белки и освобождал их от красителя. Во избежание образования дисульфидных мостиков в раствор красителя для геля первого направления добавляли до 0,1% цистамина. Для предупреждения фотоокисления гистонов гели держали вдали от яркого света [Bonner et al., 1980].

В заключение отметим, что при электрофорезе мембранных липопротеидов главная проблема связана с их растворением. Даже в 1%-ном ДДС-На при 100° не удается добиться надежного растворения. Между тем липопротеиды хорошо растворяются в смеси 6 г глицина и 10 мл 98%-ной муравьиной кислоты. Электрофорез можно вести в 13 М НСООН (50%). Для этого полимеризуют гель в воде, потом его вынимают, вымачивают в 13 М НСООН и с каплей глицерина вставляют в трубку, диаметр которой на 0,1—0,2 мм больше, чем у той, которая использовалась при полимеризации. В ней и ведут электрофорез [Mokgasch, 1978]. В другом варианте электрофореза водонерастворимых белков в качестве рабочего буфера геля использовали смесь фенола, этиленгликоля и воды в соотношении 3:2:3 (масса/объем/объем). Мономерный акриламид реагирует с фенолом, поэтому полимеризацию ПААГ в пластинах проводили опять-таки в водной среде, которую затем путем вымачивания геля заменяли описанной выше смесью [Pusztai, Watt, 1973].

ОКРАШИВАНИЕ БЕЛКОВ В ПААГ

Обнаружение и локализацию белковых зон после их разделения электрофорезом в ПААГ в большинстве случаев осуществляют путем их прокраски в геле. Зоны проявляются как окрашенные полоски или пятна различной интенсивности, в зависимости от содержания в них белка. Для окраски гель вымачивают в растворе красителя, который диффундирует внутрь него и прочно связывается с белками. Процесс диффузии, как правило, занимает несколько часов. Во избежание размывания полос за это время белки иногда предварительно фиксируют осаждением. Для этого гель сначала вымачивают в 10%- или 50%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Чаще фиксацию совмещают с окрашиванием, используя раствор красителя в смеси уксусной кислоты и метанола или в ТХУ.

Одновременно с белками окрашенным оказывается и сам гель. Это происходит как за счет простого замещения буфера геля на раствор красителя, так и в результате некоторой сорбции его на геле. Однако связывание красителя с гелем значительно менее прочно, чем с белками, поэтому от «фона» удастся без особого труда избавиться «отмывкой» геля, например вымачиванием его в относительно большом объеме растворителя с не-

сколькими сменами. Если отмывка идет только за счет диффузии красителя из геля, она занимает несколько часов, обычно ее ведут в течение ночи. Во избежание растворения осажденных белков краситель отмывают тоже уксусной кислотой, часто в смеси с метанолом, который улучшает растворимость красителя. Отмывка ускоряется при повышенной температуре (37—50°) и перемешивании растворителя, однако при этом есть опасность ослабления окраски полос.

Все типы обычно используемых красителей для белков несут на себе электрический заряд того или иного знака, поэтому от-

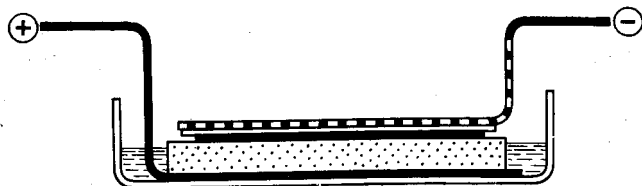


Рис. 28. Устройство для электрофоретической отмывки гелей [Shortess, 1974]

мывку геля можно еще ускорить, если в растворителе суспендировать немного ионообменной смолы, связывающей краситель и тем самым сдвигающей равновесие диффузии. Часто используют для этой цели смолу смешанного типа AG 501x8.

Наконец, процесс отмывки можно сократить до десятков минут, если воспользоваться электрофорезом. Электрическое поле накладывают на гель в поперечном направлении — перпендикулярно оси трубки или поверхности пластины. Не связанные с белками молекулы красителя благодаря своему заряду быстро выходят из геля. Разумеется, для этой цели нужно иметь специальный, хотя и очень простой, прибор для поперечного электрофореза. Такие приборы («дестейнеры») имеются в продаже, но их легко изготовить и в лаборатории.

Простое устройство для этой цели описано и схематически изображено на рис. 28 [Shortess, 1974]. На пластинку из нержавеющей стали с отогнутым концом кладут кусок поролона, смоченного 10%-ным раствором уксусной кислоты. Его помещают в ванночку и заливают таким же раствором до уровня чуть ниже верхней поверхности поролона. Ряд трубок или пластину геля кладут на поролон, накрывают фильтровальной бумагой, смоченной уксусной кислотой, и прижимают перфорированной алюминиевой пластинкой или сеткой, также с отогнутым концом.

К отогнутым концам обеих пластинок присоединяют провода от источника тока; стальная пластинка служит анодом. Перфорации в катодной пластинке нужны для выхода пузырей газа. Через пластину геля размером 12x7x0,3 см нужно пропускать ток силой 0,6 А. Отмывка занимает 15—20 мин. Находящиеся в

осадке белки и прочно связанный с ними краситель при непродолжительном поперечном электрофорезе остаются на своих местах в геле.

До сих пор речь шла о неспецифической окраске белков. Если в ходе электрофореза ферменты не утрачивают своей биологической активности, то их локализацию в геле можно осуществить с помощью специфической ферментативной реакции или цепи реакций, дающих окрашенные продукты. В этом случае гель вымачивают в растворе соответствующих субстратов. Разумеется, фиксировать белки осаждением в этом случае нельзя и приходится мириться с некоторым размыванием белковых полос. Впрочем, низкомолекулярные субстраты зачастую диффундируют в гель быстрее, чем довольно крупные молекулы красителей, и продолжительность вымачивания бывает можно сократить.

Иногда возникает необходимость вести наблюдение за миграцией белковых зон в ходе электрофореза. Для этого исходную смесь белков можно окрасить красителем «Remazol» [Griffith, 1972], который ковалентно связывается с белком и мигрирует вместе с ним. Реакцию между белком и красителем проводят в присутствии ДДС-Na, в щелочной среде. Например, к 2 мг белка, растворенного в 0,2 мл 0,15 М NaCl с 0,2 М Na₂HPO₄ и 10% ДДС-Na, добавляют краситель до концентрации 0,16% и прогревают при 56° в течение 20 мин. Для очистки от свободного красителя белок переосаждают ацетоном.

Чувствительность окрашивания белков многократно увеличивается при использовании перечисленных ниже флюоресцентных красителей. Многие из них связываются с белками или пептидами, в основном по концевым аминокетам. Их также можно использовать для наблюдения за ходом электрофореза после предварительной обработки исходного препарата.

Рассмотрим теперь подробнее наиболее распространенные марки красителей и особенности их применения.

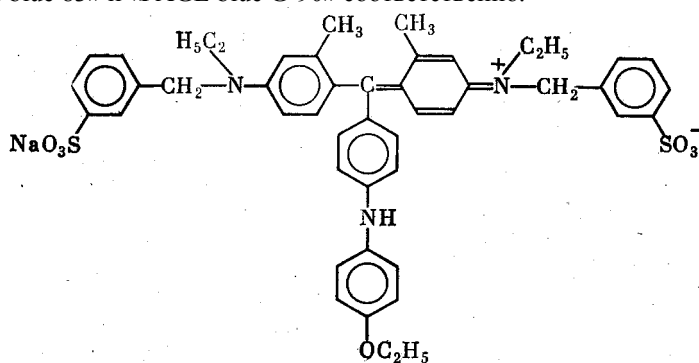
Кислые красители

Исторически для окраски белков в геле были прежде всего использованы давно апробированные промышленные красители для шерсти — сложные молекулы с несколькими ароматическими кольцами и заряженными группами. Механизм их взаимодействия с белками еще далеко не ясен. По-видимому, первоначальное связывание идет за счет кулоновского взаимодействия сульфогрупп красителей с положительно заряженными аминокислотными остатками в белке. Затем оно, вероятно, закрепляется ван-дер-ваальсовскими, водородными, а возможно, и гидрофобными связями.

Как уже упоминалось, для фиксации белковых полос окрашивание ведут в кислой среде. Какой бы буфер ни использовался при электрофорезе, к моменту окрашивания он замещается на довольно крепкий раствор (10% и более) уксусной кислоты

или ТХУ, поэтому преимущественный заряд любого белка оказывается положительным за счет остатков лизина, аргинина и гистидина, так что для белков используются преимущественно кислые красители, несущие остатки сульфокислоты. Они сохраняют свой отрицательный заряд и при низких значениях рН.

В прошлом десятилетии широко использовали «амидошварц»—краситель с фирменным названием «Amido Black 10B» (сейчас его выпускают под названием «Naphthalene Black 12B»). Его растворяли до концентрации 1% в 7%-ном растворе уксусной кислоты. В настоящее время его вытеснил другой краситель—кумасси ярко-голубой («Coomassie brilliant blue», сокращенно СВВ). Этот краситель дает лучшую чувствительность и линейную зависимость интенсивности окраски от концентрации белка в более широком ее диапазоне. Краситель выпускают в двух модификациях: R-250 и G-250. Здесь для ориентировки приведена структурная формула второго из них. Структура СВВ R-250 отличается только отсутствием двух метальных групп. Фирма BDH сейчас выпускает эти красители под названиями «PAGE blue 83» и «PAGE blue G-90» соответственно.



Кумасси G-250

Обилие ароматических колец в структуре красителей типа СВВ делает их плохо растворимыми не только в воде, но и в разбавленной уксусной кислоте. Для улучшения растворимости к кислоте часто добавляют метанол. Обычно используют водные растворы, содержащие 9—10% уксусной кислоты и 40—45% метанола (по объему), однако рабочая концентрация СВВ R-250 в этой смеси составляет 0,1—0,25%, реже 0,5%. Иногда СВВ R-250 растворяют в 25%-, 50%-ной ТХУ или в смеси, содержащей 10% ТХУ и 25% изопропанола (остальное—вода). Возможны и другие варианты, не меняющие существа дела: краситель должен полностью раствориться в кислом растворителе, осаждающем белок. Не растворившиеся примеси следует отфильтровать. Их наличие не говорит о плохом выборе растворителя, так как

Препараты красителя, изготавливаемые для промышленных целей, редко бывают чистыми.

Продолжительность окрашивания зависит от толщины и пористости геля и может варьировать от 2—3 до 12 ч. Для ускорения процесса можно окрашивать гель при 37°, а ванночку с раствором красителя покачивать. Отмывку от не связавшегося с белком красителя ведут, как описано выше, например вымачивая гель в 7%-ной уксусной кислоте или в смеси, содержащей 7,5% уксусной кислоты и 5% метанола. В этих условиях растворимость красителя достаточна для вымывания его свободных молекул, а десорбция его с белка незначительна. Если электрофорез вели в присутствии высокой концентрации мочевины, то лучше отмывать смесью, содержащей 7,5% уксусной кислоты и 20% метанола.

Гель из трубки отмывают в пробирке, пластину геля— в ванночке. При окрашивании соотношение объемов жидкости и геля должно составлять примерно 3:1, при отмывке — 5:1 или даже 10:1 с двумя-тремя сменами растворителя. Если в растворитель добавлена ионообменная смола, то его менять не нужно. Отмывку можно вести поперечным электрофорезом, как подробно описано выше.

Окрашенный гель из трубки можно сканировать в специальном приборе или с помощью приставки, которой комплектуются сейчас многие продажные спектрофотометры. Не следует, впрочем, слишком полагаться на соотношение размеров пиков такой электрофореграммы при оценке количественного соотношения белков в полосах, так как связывание красителя зависит не только от концентрации, но и от химического состава и конформации белка.

Если электрофорез проводили в кварцевых трубках, то гели можно сканировать, не извлекая их из трубок, по ультрафиолетовому поглощению белков (или нуклеиновых кислот, что значительно легче).

В этом случае необходимо тщательно очищать или перекристаллизовывать акриламид для уменьшения его собственного поглощения в ультрафиолетовой области спектра.

Другая возможность количественной регистрации электрофореграммы заключается в денситометрировании его фотографии. В этом случае ошибка в оценке истинного соотношения количеств белка в полосах может еще усугубиться за счет нелинейности чувствительности фотопленки и других особенностей фотографического процесса.

Наиболее надежным способом количественных измерений является счет радиоактивности в белковых полосах при условии однородности радиоактивной метки по всем компонентам смеси и обеспечения полноты выхода счета, о чем будет подробнее сказано ниже.

После окрашивания СВВ R-250 можно качественно, но вполне надежно обнаружить полосу, содержащую 10 мкг белка. На

порядок более высокую чувствительность окраски можно получить с помощью красителя СВВ G-250. Для этого используют относительно плохую его растворимость в хлорной кислоте. Готовят 0,04%-ный коллоидный раствор красителя в 3,5%-ном водном растворе НС104, фильтрованием освобождаются от крупных, не растворившихся частиц. В полученном коричневом растворе вымачивают гель в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Сорбция на белке сдвигает равновесие в сторону диссоциации коллоидных частиц; краситель связывается с белком и окрашивает его в синий цвет (коричневая окраска была обусловлена наличием коллоидных частиц). На геле при этом краситель не сорбируется. Синеватые полосы белка проступают на бледно-коричневом фоне геля уже через 30 мин. По истечении 1,5 ч гель переносят в 5%-ный раствор уксусной кислоты. Интенсивность окраски полос при этом увеличивается, а фон становится прозрачным и светло-голубым — часто его можно не отмывать [Hoibrook, Leaver, 1976]. Описан и другой вариант использования СВВ G-250: его растворяют сначала в 1 н. H_2SO_4 , а затем в 12%-ной ТХУ [Blakesley, Boezi, 1977].

Для окрашивания гистонов после электрофореза иногда используют краситель «Fast green FCF» [McMaster-Kaye, Kaye, 1974]. Его можно использовать и для других белков. Он менее чувствителен, чем СВВ, но более надежен для количественных оценок содержания белка в полосах путем денситометрирования, так как при отмывке геля СВВ в большей степени, чем «Fast green», вымывается из белковых полос, причем иной раз неодинаково для различных белков [Bertolini et al., 1976].

Следует отметить, что в случае плотных белковых полос при недостаточной продолжительности окрашивания можно столкнуться с артефактом — возникновением «двойной полосы». На самом же деле это одна полоса, интенсивно окрашенная с двух своих торцевых поверхностей.

Во всех описанных способах белки перед окрашиванием или в его процессе фиксируют осаждением кислотой и спиртом. Однако некоторые основные белки (например, рибонуклеаза и протамин), а также низкомолекулярные пептиды и гормоны при такой обработке не осаждаются, а, наоборот, растворяются и вымываются из геля. Недавно был предложен принципиально иной подход к фиксации белков и пептидов в геле после электрофореза. Гель в течение 1 ч вымачивают в 5%-ном растворе формальдегида в 25%-ном этаноле с добавлением СВВ R-250 до 0,11%. В этих условиях формальдегид ковалентно сшивает пептиды с матрицей геля за счет образования метиленовых мостиков между аминогруппами аминокислот и первичными аминами ПААГ. На приведенных в работе фотографиях можно видеть заметный эффект обнаружения щелочных и низкомолекулярных белков: гели, кажущиеся пустыми при обычном окрашивании, на самом деле содержат множество белковых полос. Гели с ДДС-Na красят более продолжительное время (до 3 ч) в 3,5%-ном рас-

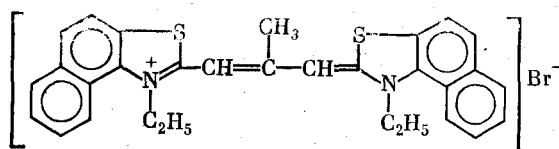
творе формальдегида, что обеспечивает вытеснение ДДС-Na красителем. Отмывку гелей ведут в течение ночи в 3,5%-ном растворе формальдегида в 25%-ном этаноле [Steck et al., 1980].

Другие красители и методы окрашивания

Определенные затруднения возникают при окраске кислых фосфопротеидов, например фосфитина. Наличие отрицательно заряженных остатков фосфорной кислоты мешает окрашиванию анионными красителями. Конечно, можно использовать такие положительно заряженные (катионные) красители, как толуидиновый синий или акридиновый оранжевый (см. ниже), но они дают высокий уровень фона, так как матрица ПААГ всегда несет на себе некоторое количество отрицательно заряженных остатков акриловой кислоты.

Есть возможность пойти другим путем. Известна высокая степень сродства фосфопротеидов к трехвалентным металлам, поэтому можно использовать ионы Al^{3+} для блокирования зарядов фосфатов. Это позволит успешно вести окрашивание белков кислым красителем. Так, для фосфопротеидов была рекомендована следующая смесь: 0,05% СВВ R-250+0,1 М $Al(NO_3)_3$ +10% уксусной кислоты + 25% изопропанола + 1% Тритона X-100. Отмывают гель, как обычно, в 7%-ной уксусной кислоте [Hegepauer et al., 1977].

Гликопротеиды, белки, липиды и даже нуклеиновые кислоты можно окрасить одновременно красителем с выразительным фирменным названием «Stains-all», формула которого представлена ниже.



0,1%-ный маточный раствор этого красителя в формамиде можно хранить при 4° в темной бутылке в течение месяца. Его рабочая концентрация—0,0012% в 0,01 М Трис-НСI (рН 8,5) с 5% формамида и 25% изопропанола. Окрашивать гель следует в темноте, в течение ночи. Можно затем отмывать гель в воде, но делать это не обязательно, так как на свету находящийся в геле свободный краситель быстро выцветает, в то время как связанный с белком оказывается значительно более стойким. Замечательно, что разные по своей природе биополимеры окрашиваются при этом в различные цвета: гликопротеиды—в синий, белки — в красный, липиды — в желто-оранжевый, ДНК — в синий, а РНК — в голубовато-пурпурный. Однако по чувствительности этот универсальный краситель заметно уступает специализированным. Кроме того, он обесцвечивается при контакте с ДДС-Na,

который из-за этого приходится отмывать после электрофореза, вымачивая гель в течение 18—36 ч в 25%-ном растворе изопропанола [King, Morrison, 1976].

Если примириться с некоторой диффузией полос во время окрашивания и не осаждать белки, то их можно красить в водных буферах кислыми или щелочными красителями (в зависимости от заряда белка). Связь между красителем и белком в этих случаях осуществляется в основном за счет сил кулоновского взаимодействия. В области нейтральных pH такие кислые красители, как СВВ, бромфеноловый синий и «Fast green», заряжены отрицательно. Их изоэлектрическая точка лежит ниже pH 3,5. Щелочные красители (метиленовый синий, толуидиновый синий и пиронин) в нейтральных буферах несут положительный заряд ($pI > 9,5$). Таким образом, кислые белки в мягких условиях можно красить щелочными красителями, а щелочные—кислыми. Красители растворяют в воде до концентрации 0,02% и нейтрализуют раствор добавлением 0,2 М фосфатного буфера (pH 7) до концентрации 5 мМ. Гель после электрофореза для удаления избытка рабочего буфера вымачивают в воде в течение 5 мин, затем окрашивают 10 мин при комнатной температуре. Отмыть фон можно в течение часа в деионизованной воде или смеси метанол—вода (1 : 2), что стабилизирует окраску. Окрашенные гели хранят в разбавленных водных растворах красителей во избежание их десорбции. В воду добавляют в качестве антисептика азид натрия до концентрации 0,01% [Ruchel et al., 1978].

Недавно был предложен принципиально новый способ окраски белков после электрофореза в ПААГ, обеспечивающий, по утверждению авторов, на два порядка более высокую чувствительность, чем СВВ R-250 [Merril et al., 1979]. Белки окрашивают ионами серебра в присутствии небольшой добавки ионов меди. Эти ионы вносят в составе нитратов серебра и меди, растворенных в воде с добавлением пиридина и этанола. Гель предварительно обрабатывают формальдегидом. После первой обработки этими ионами гель еще раз споласкивают довольно концентрированным (11%) щелочным раствором нитрата серебра и, наконец, восстанавливают серебро обработкой смесью формальдегида и лимонной кислоты в 10%-ном этаноле. Механизм окрашивания неясен. По-видимому, он сходен с восстановлением серебра в фотографическом процессе, так как «передержанный» гель можно ослабить обычным ослабителем для фотографии.

Несмотря на свою огромную чувствительность, предложенный способ достаточно сложен и связан с расходом дорогостоящего нитрата серебра, поэтому в середине 1980 г. другая группа авторов опубликовала упрощенную методику высокочувствительной окраски белков серебром, дающую, по-видимому, такие же результаты [Oakley et al., 1980]. Ввиду перспективности этого метода цитируем его подробно.

Все растворы готовят на бидистилляте, а работу ведут в перчатках. Приведенный ниже режим обработки соответствует пластинам размером 140x140x0,8 мм; для более толстых гелей продолжительность обработки на каждом этапе надо увеличить. При всех процедурах, кроме одной, используют осторожное перемешивание растворов на ротационной мешалке («New Brunswick gyrotory shaker», модель 2) со скоростью 40 об/мин. Ниже описаны соответствующие процедуры.

Гель вымачивают в течение 30 мин в 10%-ном водном растворе глутарового альдегида, споласкивают в течение 10 мин в 0,5—1 л воды с двумя сменами и оставляют для набухания в воде не менее чем на 2 ч. Затем воду сливают и заливают гель свежеприготовленным раствором аммиачного серебра. Для получения 100 мл этого раствора добавляют 1,4 мл свежего концентрированного раствора аммиака к 21 мл 0,36%-ного раствора NaOH, а затем с энергичным перемешиванием медленно прибавляют 4 мл 19,4%-ного раствора азотнокислого серебра (20 г AgNO_3 +100 мл воды). При этом может временно образоваться коричневый осадок. После его растворения добавляют воду до объема 100 мл. Для создания хорошей, ровной окраски и во избежание прилипания геля ко дну надо, чтобы он свободно плавал в ванночке размером 20X20 см со 150 мл раствора аммиачного серебра. Скорость перемешивания в это время следует увеличить до 75 об/мин. Окрашивание должно длиться не более 15 мин, чтобы серебро не успело осесть на поверхности геля. Так как раствор аммиачного серебра при высыхании может взрываться, после его использования серебро осаждают в виде AgCl подкислением HCl. Гель вынимают из раствора и промывают водой в течение 2 мин. Чтобы он не прилип к кювете, здесь и на следующем этапе следует не сливать жидкость, а переносить его из кюветы в кювету. Затем гель переносят в свежеприготовленный раствор, содержащий 0,005% лимонной кислоты и 0,019% формальдегида. (разбавлен из продажного 3'8%-ного формальдегида в 10%-ном метаноле); при этом и проступают полосы белков. Гель вынимают, когда фон только начинает темнеть, и промывают водой в течение часа с тремя сменами при перемешивании. Если концентрация ПААГ превышает 10%, то фон может оказаться темным. Он уменьшается в случае предварительной фиксации белков в 10%-ной уксусной кислоте с 50% метанола в течение 30 мин и последующей промывки геля в 7%-ной уксусной кислоте с 5% метанола в течение ночи.

Минимальная концентрация белка в полосе, которую можно обнаружить, составляет примерно 10^{-4} мкг/мм². По приведенным в работе фотографиям создается впечатление, что чувствительность метода столь же высока, как и первоначальной методики Меррилла и соавторов, но четкость линий немного хуже. В этом случае также возможно ослабление с помощью фотоослабителей.

Хотя в рассмотренной работе об этом и не говорится, Меррилл и соавторы указывают, что после окрашивания серебром гели становятся хрупкими. Для высушивания их рекомендуется предварительно подвергнуть следующей обработке: вымочить в течение 15 мин в 30%-ном водном растворе тиосульфата натрия, промыть 4 раза по 15 мин в воде и, наконец, вымочить в смеси метанол — вода — глицерин (70 : 27 : 3) в течение 5 мин.

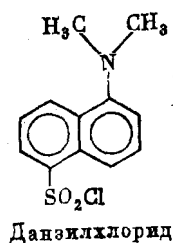
В начале 1981 г. Меррил и соавторы предложили еще одну методику окрашивания белков в геле серебром. В отличие от их первого метода, где был использован гистологический подход, в данном случае восстановление серебра происходит фотохимическим путем.

После двумерного разделения белков в ПААГ по О'Фарреллу их фиксируют и одновременно вымывают ДДС-На сначала раствором, содержащим 12% CH_3COOH и 50% метанола (10 мин), потом дважды по 5 мин—5%-ной CH_3COOH с 10% этанола. Далее для улучшения равномерности окраски гель вымачивают 5 мин в 0,5%-ном растворе железосинеродистого калия (красной кровяной соли). После трехкратного ополаскивания в воде гель заливают раствором, содержащим 0,2 г нитрата серебра, 0,2 г нитрата аммония, 0,5 мл 37%-ного формальдегида и 0,06 мг бензотриазола (антиуалирующего средства для фотографии) в 100 мл воды. Гель в растворе освещают вольфрамовой лампой накаливания мощностью 1500 Вт в течение 20 мин. Затем раствор сливают и гель, не споласкивая, заливают 200 мл 3%-ного раствора Na_2CO_3 , содержащего 0,1 мл формальдегида и 0,12 мг бензотриазола. Окраска появляется уже через 1 мин. Не прекращая освещения, раствор сменяют 2—3 раза до достижения желаемой интенсивности окраски белков. Процесс окрашивания прерывают погружением геля на 5 мин в 1%-ный раствор CH_3COOH , а затем промывают его водой.

Чувствительность метода столь же высока, как и у ранее описанных методов окраски серебром, но процедура существенно проще, дешевле и занимает всего 1 ч [Merril et al., 1981].

Флюоресцентные красители

Данзилхлорид выпускается в виде двух кристаллических форм: кристаллы красного цвета плавятся при 70° , желтые—при 73° . Они хорошо растворяются в ацетоне. Максимум их поглощения в растворе лежит в области 330—360 нм, флюоресценции — 510 нм. Молярная экстинкция $E=4,3 \cdot 10^6$.



В щелочной среде, отщепляя ион хлора, данзильный остаток присоединяется к аминокислотам, пептидам и белкам, главным образом, по их концевой аминогруппе. При этом его способность флюоресцировать сохраняется.

Данзилирование белков и пептидов позволяет следить за ходом их миграции при электрофорезе путем освещения гелей длинноволновым ультрафиолетовым светом, достаточно хорошо проникающим через пирексовое стекло. Скорость миграции белков при данзилировании практически не изменяется, поэтому небольшие примеси данзилированных препаратов можно использовать в качестве маркеров при разделении неокрашенных белковых смесей.

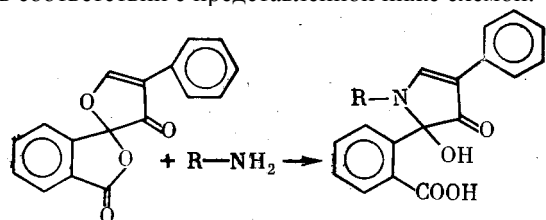
Данзилирование не мешает протеолизу белка, что позволяет проводить пептидный анализ данзилированных белков после их разделения электрофорезом в ПААГ и элюции из геля. При этом удается обнаруживать по флюоресценции не только концевые, но и внутренние пептиды. Дело в том, что Данзилирование, хотя и намного менее эффективно, чем по концевым аминокетильным группам, происходит (в порядке ослабления) по SH- и OH-группам цистеина и тирозина, $\epsilon\text{-NH}_3$ -группам лизина и по гистидину. Ценным является то обстоятельство, что автолиз неданзилированных протеаз не создает никаких помех при картировании пептидов.

Недавно описано Данзилирование белков для последующего разделения ступенчатым электрофорезом в комплексе с ДДС-Na (в системе Лэммли) [Tijssen, Kurstak, 1979]. Белки растворяют до концентрации 2 мг/мл в 0,1 М Трис-ацетатном буфере (pH 8,2) с 10% ДДС-Na, добавляют 1/15 объема 10%-ного раствора данзилхлорида в ацетоне и, закрыв пробирку парафильмом, инкубируют в течение 15 мин на водяной бане при 50°. Свободный данзилхлорид нерастворим в водном ацетоне и образует мутно-желтую суспензию, тем не менее Данзилирование в ней происходит. Раствор просветляется после добавления 1/15 объема (Меркаптоэтанола и дополнительной инкубации в течение 15 мин. Меркаптоэтанол связывает и растворяет избыток данзилхлорида.

Инкубационную смесь можно без дальнейшей очистки подвергать электрофорезу. Ярко люминесцирующие побочные продукты данзилирования быстро отделяются от белков и уходят вперед. В работе описан и препаративный вариант разделения белков под контролем данзилированных аликвот. При этом используется электрофоретическая элюция белковых полос из геля. Описан также пептидный анализ разделенных белков электрофорезом в системе Лэммли с градиентом пористости рабочего геля. Несколько ранее препаративный электрофорез белков под контролем данзилированных аликвот был описан Стефенсом [Stephens, 1975].

Флюоресцамин (иногда поставляется под фирменным наименованием «Fluoram») — желтовато-белый порошок, хорошо растворимый в ацетоне, диметилсульфоксиде и ацетонитриле. Хранить раствор следует не более двух недель: он неустойчив, особенно при $\text{pH} < 4$ и $\text{pH} > 10$. При взаимодействии с первичными аминами (концевыми аминокетильными группами, $\epsilon\text{-NH}_2$ -группами лизина)

в водной среде флюоресцамин дает сильно флюоресцирующие продукты в соответствии с представленной ниже схемой.



Флюоресцамин Амин Флюоресцирующий продукт

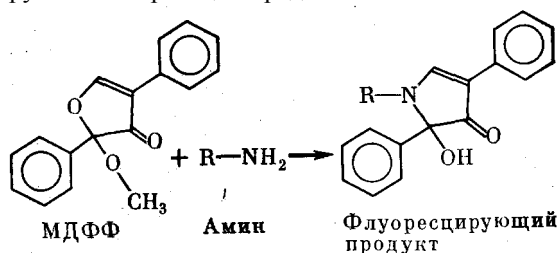
Реакция идет успешнее в щелочной среде. Продукт реакции имеет два максимума поглощения (при 300 и 390 нм) и максимум флюоресценции при 480 нм. Замечательно, что ни сам флюоресцамин, ни продукты его распада в растворе не флюоресцируют. При окрашивании белков и пептидов флюоресцамином не создается флюоресцирующего фона и окрашенный продукт можно не отделять от красителя, что чрезвычайно удобно. При использовании флюоресцамина для окраски белков или пептидов перед электрофорезом следует иметь в виду, что он вносит дополнительный отрицательный заряд (за счет образующегося карбоксила) и этим изменяет электрофоретическую подвижность окрашенного белка. В случае разделения белков, обработанных ДДС-На, этот единичный заряд практической роли не играет.

В недавней работе [Jackowski, Liew, 1980] флюоресцамин использовали для окраски белков после их двумерного фракционирования в электрофокусировкой и электрофорезом по методу О'Фаррела. Белки фиксировали в пластине геля, вымачивая ее в течение ночи в 10%-ной уксусной кислоте с 50% метанола (одновременно вымывались амфолиты, которые окрашиваются флюоресцамином). Гель споласкивали в 7%-ной уксусной кислоте, помещали на 1 ч в диметилсульфоксид (ДМСО) и на 2 ч — в 0,04 М раствор борной кислоты в ДМСО, титрованный NaOH до pH 10. Затем добавляли равный объем раствора флюоресцамина (0,5 мг/мл) в ДМСО и встряхивали смесь в течение 8 ч. Белковые пятна проявлялись уже через 2 ч. Их фотографировали при освещении длинноволновым ультрафиолетовым светом.

Хранить гель в ДМСО следует в темноте: на свету способность к флюоресценции за 24 ч падает до нуля. Чувствительность и разрешающая способность окраски флюоресцамином примерно такие же, как и СВВ R-250, но линейный участок зависимости интенсивности окраски (флюоресценции) от количества белка больше — вплоть до 7 мкг белка на 1 см² в пятне или полосе. Для окраски СВВ R-250 линейность сохраняется не далее, чем для 3 мг/см².

Окрашивание белка флюоресцамином перед электрофорезом было использовано значительно раньше [Eng, Parkers, 1974]. Белок, обработанный ДДС-На, растворяли до концентрации

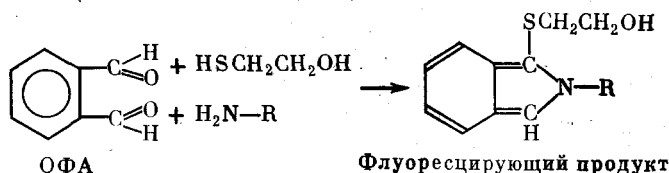
0,5—1 мг/мл в 0,017 М Na-фосфатном буфере (рН 8,5) с 5% ДДС-На. К 100 мкл этого раствора добавляли 5 мкл раствора флюоресцамина в ацетоне и встряхивали. Затем без дальнейшей очистки 10 мкл этой смеси вносили в трубку для электрофореза. Замечено, что ДДС-На уменьшает эффективность окраски флюоресцамином. По-видимому, он создает препятствия для контакта красителя с аминогруппами белка. Аналогично использовали флюоресцамин и для окраски пептидов перед электрофорезом [Roseblatt et al., 1975]. В 1976 г. было описано использование для окрашивания белков перед электрофорезом родственного флюоресцамину препарата МДФФ (2-метокси-2,2-дифенил-3-фуранона) [Barger et al., 1976]. Как и флюоресцамин, этот препарат реагирует с первичными аминами, давая сильно флюоресцирующие продукты, в то время как сам он в растворе не флюоресцирует. Схема реакции представлена ниже.



В отличие от флюоресцамина МДФФ не привносит с собой дополнительного заряда. Он хорошо растворим в ацетоне и абсолютном метаноле. Максимум возбуждения флюоресцирующего продукта — при 390 нм, флюоресценции — при 745 нм. Реакция идет лучше в щелочной среде (рН 9,5). Продукт устойчив в интервале рН 2—10. Интенсивность флюоресценции — в 2,5 раза выше, чем при окраске флюоресцамином. Она лишь незначительно уменьшается в случае предварительной обработки белка ДДС-На и β-меркаптоэтанолом при 100°. Чувствительность метода очень высока: по утверждению авторов, им удавалось обнаруживать до 0,001 мкг белка в полосе. В отличие от флюоресцамина окраска не ослабевает в течение нескольких месяцев. Однако есть данные, что с длинными полипептидными цепями МДФФ реагирует слабее, чем флюоресцамин. Окрашивание ведут в 0,01 М боратном буфере (рН 9,5), энергично перемешивая раствор белка с избытком раствора МДФФ в ДМСО.

Недавно [Chen, Thomas, 1980] МДФФ был использован для окраски бромциановых пептидов альдолазы перед их разделением электрофорезом в 15%-ном ПААГ с ДДС-На. Пептиды, обработанные ДДС-На и р-меркаптоэтанолом, окрашивали в 0,1 М Li-боратном буфере (рН 9,5), добавляя к ним в пятикратном избытке МДФФ, растворенный в абсолютном метаноле.

Ортофталевый альдегид (ОФА) в присутствии β-меркапто-этанола реагирует с первичными аминами белков и пептидов, давая сильно флюоресцирующий продукт в соответствии с приведенной ниже схемой.



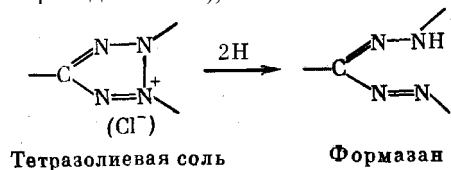
ОФА растворим в воде, но лучше—в метаноле, этаноле, ацетоне и диоксане. Реакция присоединения хорошо идет при pH 8—9. При использовании ОФА его сначала растворяют в одном из перечисленных органических растворителей, а потом смешивают с избытком водного буфера нужной концентрации и значения pH. Максимум возбуждения флюоресцирующего продукта — при 340 нм, флюоресценции — при 445 нм. Раствор самого ОФА не флюоресцирует. Чувствительность метода — выше, чем в случае флюоресцамина, но и фон флюоресценции побочных продуктов выражен сильнее.

Использование ОФА для окрашивания комплексов белок—ДДС-На перед их электрофорезом описано еще в 1973 г. [Weidekamm et al., 1973]. Реакцию проводили в 0,025 М Na-фосфатном буфере (pH 8,5) в присутствии 5% ДДС-На и 2% β-меркаптоэтанола. Сначала белок растворяли в этой смеси и прогревали при 100° для полной денатурации и восстановления, затем туда добавляли 1/5 объема 1%-ного раствора ОФА в метаноле и выдерживали в темноте 2—3 ч.

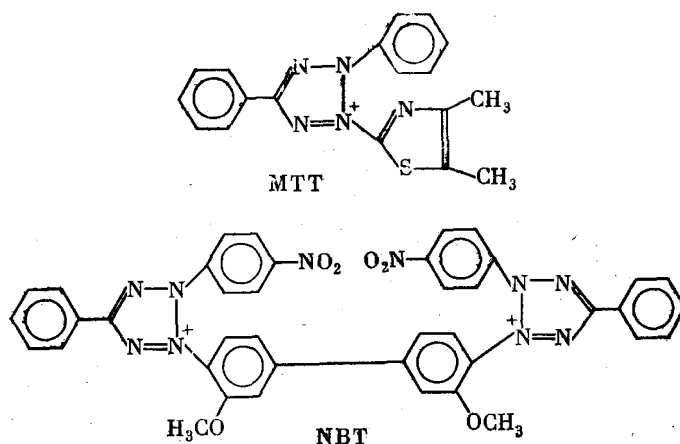
Локализация ферментов после электрофореза

В ряде случаев электрофорез ферментов в мягких условиях (без ДДС-На или мочевины) не сказывается на их активности. Положение полос ферментов в геле можно идентифицировать с помощью специфических реакций, дающих окрашенные продукты. Для этого гель вымачивают в растворе субстратов и кофакторов, необходимых для протекания определенной ферментативной реакции, иногда с добавлением реагентов, сообщающих окраску продукту этой реакции. Эту операцию следует проводить быстро во избежание диффузии нефиксированных белков из их полос. Если субстрат реакции полимерен и плохо диффундирует, его можно заполимеризовать прямо в гель и следить за продвижением фронта ферментативной реакции вместе с миграцией фермента. Разумеется, при этом необходимо ясно представлять, каково будет поведение субстрата в электрическом поле во время электрофореза.

Можно заполимеризовать субстрат и кофакторы в другом («индикаторном») геле на основе агарозы или импрегнировать ими фильтровальную бумагу. После окончания электрофореза белков в пластине рабочего ПААГ на его поверхность накладывают индикаторный гель или бумагу. Ферменты диффундируют в них из рабочего геля и обнаруживают себя соответствующей цветной реакцией. Габриель привел длинный список индикаторных цветных реакций для ферментов [Gabriel, 1971]. Во многих случаях в этих реакциях фигурирует восстановление НАД с дальнейшей передачей электрона на краситель. Удобно в качестве заключительного этапа реакции воспользоваться неферментативным восстановлением тетразолиевой соли до ее формазана, что дает сильно окрашенные и зачастую нерастворимые продукты (схема реакции приведена ниже),



В качестве примера можно назвать часто употребляющийся препарат «Methyl thiazolyl blue» (МТТ) или еще более сложное соединение «Nitro blue tetrazolium» (NBT). В окисленном виде



обе эти соли бесцветны. При восстановлении первая дает синепурпурную, а вторая—иссиня-черную окраску. Реакция восстановления красителей ускоряется в присутствии промежуточного переносчика электронов «Phenazine methosulfate» (PMS) или нового, более стойкого реагента, выпускаемого для этой цели фирмой «Boehringer» под названием «Meldolablue» [Turner, Hopkinson, 1979].

Для обнаружения в геле *протеолитических* ферментов предложен ряд нетривиальных методов. Например, после электрофореза гель вымачивают в течение 2 ч при 37° в 8%-ном растворе цитохрома *c* в буфере с pH 8,5, содержащем 8 М мочевины и 1,7 мМ CaCl₂. Затем белок фиксируют в 12,5%-ной ТХУ. Диффундируя в гель, цитохром *c* окрашивает его в коричневый цвет по всему объему. Полосы протеаз, разрушающих цитохром *c*, остаются прозрачными и хорошо видны на коричневом фоне [Ward, 1976]. Суть другого подхода заключается в том, что на гель накладывают обработанную закрепителем в темноте (для удаления серебра) и вымоченную в буфере фотопленку. После трехчасовой выдержки при 35° во влажной камере на фотопленке можно обнаружить следы диффузии в нее протеаз, разрушающих слой желатины [Burger, Schroeder, 1976].

Для обнаружения *нуклеаз* при полимеризации геля в него вносят ДНК (10 мкг/мл) или РНК (25 мкг/мл). Если нуклеазы для своего действия нуждаются в ионах Mg²⁺, Ca²⁺ или Zn²⁺, то в их растворе ПААГ вымачивают после окончания электрофореза. Далее следует окрашивание геля красителем для нуклеиновых кислот—бромистым этидием (см. главу 4). Окрашивается весь гель, за исключением полос, содержащих нуклеазы, где нуклеиновая кислота разрушена. Можно вести разделение нуклеаз и в присутствии ДДС-На, блокирующего их действие во время электрофореза. Перед обработкой бромистым этидием ДДС-На из геля вымывают.

Заполимеризовав в ПААГ денатурированную ДНК, можно выявить нуклеазы, специфичные для одонитевых ДНК. Можно также исследовать оптимизацию условий, необходимых для активности нуклеаз, варьируя состав буфера геля, или опробовать различные ингибиторы нуклеазной активности. С помощью кольцевых ДНК удастся отличить эндонуклеазы от экзонуклеаз. Электрофорезу можно подвергнуть лизаты бактерий для выяснения содержания в них нуклеаз [Rosenthal, Lacks, 1977]. Окрашивание бромистым этидием в описанных опытах можно заменить автордиографией (см. ниже), если в гель запполимеризовать меченную ³²P нуклеиновую кислоту или синтетический полинуклеотид [Booga et al., 1979].

Выше указывалось, что для локализации ферментов по их активности электрофорез желателен проводить в условиях, исключающих возможность денатурации. Однако в недавней работе [Lacks, Springhorn, 1980] было показано, что очистку целого ряда ферментов (ДНКазы I, некоторых протеаз, амилазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) можно производить электрофорезом в ПААГ с ДДС-На после соответствующей обработки их детергентом при повышенной температуре. Денатурация оказывается обратимой. По окончании электрофореза ДДС-На отмывают и одновременно снимают с белка встряхиванием геля в течение 1—2 ч в 0,04 М Трис-буфере, pH 7,6. Ферментативная активность в ряде случаев восстанавливается.

По данным Хагера и Буржесс, при снятии ДДС-На с фермента имеет смысл денатурировать его кратковременной обработкой 6 М гуанидинхлоридом с последующей ренатурацией при разбавлении. Возможно, что при этом восстанавливается нативная конфигурация белка, нарушенная при первоначальной обработке ДДС-На [Hager, Burgess, 1980]. Для ферментов, содержащих несколько полипептидных цепей (химотрипсин), предварительную обработку (β меркаптоэтанолом, разумеется, следует исключить. Впрочем, то же самое относится и к одноцепочечному трипсину. По-видимому, разрыв внутрицепочечных S—S-связей в нем приводит к необратимой денатурации. Ферменты, состоящие более чем из двух субъединиц, не ренатурируют.

В заключение отметим, что гликопротеиды после электрофореза в ПААГ можно локализовать, вымачивая гель в растворе конканавалина А, конъюгированного с флюоресцентной меткой, например с флюоресцеинизотиоцианатом [Furlan et al., 1979], или радиоактивно меченного введением ^{125}I [Horst et al., 1980].

Локализация белковых полос осаждением ДДС-На

Не очень чувствительные, но быстрые и простые методы позволяют обнаружить полосы белка после электрофореза в присутствии ДДС-На по осаждению этого детергента. Наиболее простой способ состоит в охлаждении геля до температуры 0—4°. При боковом освещении на фоне черного бархата непрозрачные белковые полосы и пятна хорошо видны среди почти прозрачного геля. По-видимому, комплексы белок—ДДС-На служат ядрами конденсации большого количества мицелл ДДС-На, растворимость которого очень сильно зависит от температуры. При отгревании геля полосы и пятна исчезают. Нижний порог чувствительности этого метода — 0,2 мкг белка на 1 мм² площади пятна [Wallace et al., 1974]. Попутно отметим недавно описанный, аналогичный способ обнаружения белков в ПААГ, содержащем 8 М мочевины. Гель выдерживают 5—10 мин при —70°. В местах расположения белковых зон за счет связывания части свободной воды белками мочевины кристаллизуется, давая непрозрачные полосы. Остальной гель при этом остается прозрачным [Bachrach, 1981].

Недавно [Higgins, Dahmus, 1979] было предложено после окончания электрофореза вымачивать гель в течение 1 ч при 25° в 10—12 объемах 4 М раствора ацетата натрия. Свободный ДДС-На, который в концентрации 0,1% присутствует в геле, выпадает в осадок — гель становится белым и непрозрачным. Белки, связанные с ДДС-На, при этом не осаждаются. Их прозрачные полосы хорошо видны на темном фоне при освещении геля сбоку и снизу. Чувствительность метода — 0,1 мкг белка на 1 мм² площади пятна или полосы.

ЭЛЮЦИЯ БЕЛКОВ ИЗ ГЕЛЯ

Простейший прием элюции состоит в извлечении белка из полоски или кусочка геля за счет диффузии в течение длительного времени при 37—40°. Этот прием пригоден как для свободных белков, так и для их комплексов с ДДС-Na. С целью облегчения диффузии белков из геля последний измельчают, например растирают в маленьком стеклянном гомогенизаторе. Во время элюции суспензию измельченного геля встряхивают. В элюирующий буфер, как правило, вводят ДДС-Na даже в тех случаях, когда электрофорез белка проводили без него. Это делают для облегчения растворения белков. После окончания экстракции гель удаляют центрифугированием. От ДДС-Na и красителя белок можно освободить осаждением и промывкой сначала смесью ацетона с 0,1 М HCl (6: 1), а затем чистым ацетоном. Осажденный ацетоном белок высушивают или лиофилизируют. Брэй и Браунли [Bray, Brownlee, 1973] элюировали таким образом белок в 0,05 М Na-фосфатный буфер <pH 7,5) с 0,1% ДДС-Na и 1 мМ ФМСФ¹ при 37° в течение ночи при встряхивании. Белок в комплексе с ДДС-Na осаждали (за счет ДДС-Na) добавлением KCl до 0,2 М и выдерживанием при 0°. Дрешер и Ли гомогенизировали кусочки геля в малом объеме 1%-ного раствора ДДС-Na и элюировали белки в течение ночи при 40°. Такая концентрация ДДС-Na оказалась необходимой для растворения белков, осажденных в геле в ходе их фиксации кислотой и окрашивания [Drescher, Lee, 1978]. В другой работе [Sreekrishna et al., 1980] белки, предназначенные для последующего аминокислотного анализа, элюировали из ПААГ гомогенизацией в 0,05 М растворе бикарбоната аммония с 0,05% ДДС-Na и инкубацией в течение 10 ч при 37°. Бикарбонат аммония удаляли повторной лиофилизацией. От ДДС-Na избавлялись, осаждая белок добавлением 9 объемов подкисленного ацетона после растворения лиофилизированного препарата в воде до концентрации 1 % по ДДС-Na.

Иногда для улучшения растворения осажденного в геле белка экстракцию ведут в 1%-ном ДДС-Na с 6 М мочевиной [Buisson et al., 1976]. Щелочные негистоновые белки хроматина можно экстрагировать 66%-ной уксусной кислотой на холоду [Rabani et al., 1980]. Белки рибосом после двумерного электрофореза и окраски СВВ R-250 можно также элюировать 66%-ной уксусной кислотой. Краситель легко затем удалить на микроколонке ДЭАЭ-целлюлозы прямо в той же кислоте. Анионный по своей природе краситель десорбируется с белка и полностью задерживается на анионообменнике, а щелочные рибосомальные белки с ним не связываются [Bernabeu et al., 1980].

Описан способ экстракции белков в комплексе с ДДС-Na 60%-ной муравьиной кислотой [Gibson, Cracy, 1979], которую

¹ Фенилметилсульфонилфторид — ингибитор протеаз.

затем упаривают, а сухой остаток суспендируют в 6 н. HCl. Белок при этом растворяется, а ДДС-Na остается в осадке. Его удаляют центрифугированием, а краситель из раствора белка в кислоте извлекают троекратной экстракцией октанолом. Соляную кислоту удаляют высушиванием в струе азота, разбавив предварительно препарат водой.

Возможен и другой подход. Сначала ДДС-Na и краситель экстрагируют из ПААГ без растворения осажденного в полосах белка. Этого добиваются пятикратной гомогенизацией геля в растворе, содержащем 10% ТХУ и 30% этанола. Гель каждый раз осаждают центрифугированием. Из очищенного таким образом геля белки экстрагируют 0,1 М NaOH в течение 2 ч при 37° при встряхивании [Djondjurov, Holtzer, 1979]. Для малых концентраций белков в полосах этот метод не подходит, так как часть белков вымывается при обработке геля ТХУ.

Нефиксированные белки удобно извлекать из геля возобновлением электрофореза до выхода белка из геля. Содержащую нужный белок полосу (или пятно) в геле локализируют сопоставлением с окрашенными белками в параллельном контрольном треке на пластине, который предварительно отрезают, или в контрольной трубке. Можно фиксировать положение полос и с помощью данзилированных маркеров (см. выше). Вырезанный из геля участок помещают в трубку на небольшую «пробку» из крупнопористого ПААГ или агарозы и заливают буфером, а на нижний конец трубки надевают заполненный буфером диализный мешочек. Затем возобновляют электрофорез и ведут его до тех пор, пока белок не выйдет из трубки в мешочек [Weliky et al., 1975]. Особенно удобно следить за выходом белка при наличии данзилированных маркеров. Если находящийся в диализном мешочке буфер содержит в избытке неионный детергент (2% NP-40) и 8 М мочевины, то ДДС-Na практически полностью вытесняется из связи с белком и уходит через мембрану к аноду [Tuszynski et al., 1977].

Описан вариант, при котором белок электрофоретически элюируют в трубку большего диаметра, где на пробке из ПААГ лежит слой оксиапатита, уравновешенного 0,1 М Na-фосфатным буфером (рН 7,2) с 0,1% ДДС-Na. Несмотря на действие электрического поля, белок собирается на оксиапатите, откуда его затем, разобрав всю систему, можно элюировать 0,5 М фосфатным буфером [Ziola, Seraba, 1976].

Нитроцеллюлозные мембранные фильтры обладают способностью сорбировать щелочные белки. Этим можно воспользоваться для получения «реплики». Фильтр накладывают на поверхность геля, и выходящие из него за счет диффузии белки тут же сорбируются и располагаются на нитроцеллюлозе точно такими же полосами, как и в геле. Далее уже на фильтре можно проводить идентификацию белков, например гибридизацией их с меченой ³²P ДНК [Bowen et al., 1980]. Простейшее устройство для этой цели, предложенное авторами цитируемой работы,

показано схематически на рис. 29. К пластине геля с двух сторон металлическими сетками через пропитанные буфером поролоновые прокладки прижимают нитроцеллюлозные фильтры (18 x 18 см) рабочей поверхностью к гелю. Фильтры предварительно смачивают буфером, чтобы в них не оставалось окклюдированного воздуха. Для этого следует дать им некоторое время поплавать на поверхности буфера, а потом уже погрузить в него. Если электрофорез шел в присутствии ДДС-На, белки пред-

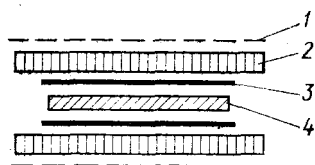


Рис. 29. Устройство для диффузии белков из геля на нитроцеллюлозный фильтр [Vowen et al., 1980]

1 — сетка из нержавеющей стали;
2 — поролон; 3 — нитроцеллюлозный фильтр; 4 — ПААГ

варительно освобождают от него, вымачивая гель в 0,01 М растворе Трис-НСl (рН 7), содержащем 0,05 М NaCl, 2 мМ ЭДТА и 4 М мочевины, в течение 3 ч с перемешиванием. Для более полного освобождения от ДДС-На в этот раствор можно сначала ввести 1% Тритона X-100, а потом отмывать тем же буфером без детергента. Собранную, как описано выше, многослойную систему погружают в 2 л того же буфера, но без мочевины. Диффузия идет при комнатной температуре в течение 36—48 ч с одной сменной буфера.

Белки на фильтре можно окрасить, а радиоактивные — обнаружить флюорографией (см. ниже). Для этого высушенный фильтр ненадолго замачивают в 10%-ном растворе ППО в эфире и накладывают на него рентгеновскую пленку. Флюорография или автордиография с фильтра идет значительно лучше, чем с геля, так как белки сорбируются на поверхности мембранного фильтра.

Выход белков из геля на фильтр можно значительно ускорить, используя электрофоретическую элюцию белков из пластины геля в поперечном направлении, подобно тому, как это было описано для электрофоретической отмывки красителя [Towbin et al., 1979]. Для этого собирают такую же систему, как в предыдущем варианте, с тем лишь отличием, что нитроцеллюлозный фильтр («Millipore NA») накладывают на гель только с одной стороны — той, куда будут мигрировать белки под действием электрического поля. Весь «сэндвич» помещают в прибор для электрофоретической отмывки геля и подбирают напряжение так, чтобы напряженность поля в геле составляла около 6 В/см. Если электрофорез белков вели в отсутствие ДДС-На (например, с мочевиной), то предварительное вымачивание геля и всех компонентов системы, а также саму элюцию можно вести в 0,7%-ной уксусной кислоте. За 1 ч белки полностью выходят из геля в направлении катода и прочно сорбируются на нитроцел-

люлозе. Однако не следует допускать перегрузки фильтра: его сорбционная емкость составляет примерно 0,15 мкг белка на 1 мм² поверхности. Для проверки можно вслед за первым положить второй листок нитроцеллюлозы — на нем не должно быть белка.

Если разделение белков вели в комплексе с ДДС-Na, то и элюировать их можно в этом комплексе. В таком случае следует использовать буфер того же типа, какой используют для верхнего электродного резервуара ступенчатой системы электрофореза по Лэммли (0,192 М глицин, 25 мМ Трис, 20%-ный метанол; рН 8,3). Направление миграции белков—к аноду. Выход белка при этом получается неполным.

Перешедшие на фильтр белки Таубин и соавторы идентифицировали иммунологически. Подробное рассмотрение метода выходит за рамки этой книги, поэтому ниже он описан лишь вкратце. Фильтр вымачивали в 3%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина для насыщения оставшихся свободными центров сорбции, затем инкубировали с антисывороткой к интересующему белку, промывали и инкубировали с «индикаторными» антителами к иммуноглобулинам первой сыворотки, конъюгированными с флюоресцентным красителем или мечеными радиоактивно. Перенос белков из геля на нитроцеллюлозный фильтр существенно облегчает их иммунологическую идентификацию, так как крупные молекулы γглобулинов плохо диффундируют в гель, тогда как фильтр сорбирует белки на своей поверхности и они легко доступны для антител.

Описанный прием идентификации можно использовать во всех случаях, когда белок способен образовывать специфические комплексы (гормон—рецептор, рецептор—цАМФ, белок—нуклеиновая кислота и др.), — конечно, при условии, что его активные группы остаются открытыми при сорбции на нитроцеллюлозу. Впрочем, последнее требование может относиться лишь к небольшой доле молекул белка данного типа, достаточной для идентификации всей полосы.

Нитроцеллюлоза сорбирует только щелочные белки. Распространение этого метода на любые белки связано с использованием так называемой «диазобумаги», на которой предварительно закреплены афинные сорбенты, например: антитела или антигены [Eriich et al., 1979]. Диазобумага была разработана и нашла себе применение главным образом для гибридизации нуклеиновых кислот [Alwine et al., 1977], поэтому здесь нет места для описания ее особенностей. Отметим только способ переноса белков из ПААГ на диазобумагу. После электрофореза белков в системе Лэммли ДДС-Na вымывают из геля 0,15 М Na-фосфатным буфером (рН 7,4) с 0,15 М NaCl и 0,5% Тритона X-100 при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем гель кладут на стопку фильтровальной бумаги в кювету, заполненную тем же буфером, накрывают диазобумагой, а ее — несколькими слоями сухой фильтровальной бумаги. Всю пачку прижимают через стеклян-

ную пластинку грузом. Буфер, поднимающийся из кюветы через гель к сухой фильтровальной бумаге, за 1—2 ч при комнатной температуре вымывает основную массу белка из геля. Нужный белок задерживается на афинном сорбенте, остальные же уходят дальше, в фильтровальную бумагу.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ БЕЛКОВ ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПААГ

Аппаратура, сцинтилляторы, различные методы счета радиоактивности белков, а также способы оценки эффективности этих методов требуют отдельного подробного рассмотрения. Ниже в очень сжатом виде будут описаны только некоторые приемы оценки радиоактивности белков после их электрофореза в ПААГ.

Счет радиоактивности в элюатах белка

Все перечисленные в предыдущем разделе способы элюции белков из геля позволяют оценивать их радиоактивность с помощью приемов счета радиоактивности в растворах. Следует помнить, что элюция белка из геля никогда не бывает полной, поэтому количественная оценка содержания белка в полосе геля при таком подходе носит более или менее приближенный характер. Кроме того, элюция связана со значительным разбавлением белкового раствора.

Один из специфических вариантов счета радиоактивности элюата из геля после электрофореза белков в комплексе с ДДС-На отработан именно для концентрирования белкового препарата. В нем используется способность комплекса белок—ДДС-На при пониженной температуре и обработке 10%-ным раствором ТХУ образовывать мицеллы, которые сорбируются на нитроцеллюлозных фильтрах типа «Millipore NA». К элюату белка в 1%-ном растворе ДДС-На с 6 М мочевиной добавляют в качестве носителя бычий сывороточный альбумин до концентрации 0,25 мг/мл, а затем 2 объема 15%-ного раствора ТХУ. Смесь хорошо встряхивают и оставляют на 15 мин во льду. После этого ее можно фильтровать и промывать на фильтре 5%-ным раствором ТХУ. Счет радиоактивности ведут на фильтрах. Использование фильтра типа «Millipore» здесь обязательно, так как в присутствии ДДС-На ТХУ не дает обычного осадка белка, а на бумажных или стекловолоконистых фильтрах мицеллы комплексов белок—ДДС-На не задерживаются [Buisson et al., 1976].

Для качественного определения радиоактивности ^{14}C и ^{125}I белковые полосы и пятна (при толщине геля не более 1,5 мм) можно вырезать и просто высушить на поверхности любого из стекловолоконистых фильтров типа «Whatman GF» или даже на бумажном фильтре «Whatman N 1». Сушить достаточно 30 мин при 50° или 2 ч при комнатной температуре. Счет радиоактивности ведут в толуоловом сцинтилляторе [Leinen, Wittliff, 1978].

Другой вариант с использованием фильтров типа GF/C включает диффузию нефиксированных комплексов белок—ДДС-Na из кусочков геля толщиной 0,7 мм в фильтры, смоченные 10%-ным раствором NH_4OH . Диффузия идет в течение суток при комнатной температуре в атмосфере аммиака. Затем фильтры сушат и просчитывают в толуоловом сцинтиляторе. Как и всегда при диффузии, полнота выхода белков зависит от их молекулярной массы и пористости геля [Helliner, Wunner, 1971].

Растворение ПААГ

Полноту счета радиоактивности белка можно обеспечить растворением геля. Обычный ПААГ можно растворить при повышенной температуре в 30%-ном растворе перекиси водорода. Если белки мечены ^{14}C , то к раствору H_2O_2 следует добавить NH_4OH до концентрации 1%, чтобы улавливать радиоактивный $^{14}\text{CO}_2$. Проще всего кусочек геля с белком растворять именно в такой смеси при 65° в течение 4—6 ч и далее просчитывать радиоактивность в сцинтиляторе на основе диоксана. Однако эффективность счета в диоксановом сцинтиляторе ниже, а возможность артефактов — тушения и хемолюминесценции — выше, чем в толуоловом сцинтиляторе, поэтому после описанного растворения геля в H_2O_2 с NH_4OH иногда предпочитают использовать один из фирменных «солубилизаторов» и считать радиоактивность в сцинтиляторе на основе толуола [Goodman, Matzura, 1971]. Хорошие результаты дает растворение ПААГ в 30%-ной H_2O_2 с 5% NH_4OH (37° , 6 ч) в комбинации со сцинтилятором на основе ксилола, выпускаемым фирмой NEN под названием «Aquasol». Для подавления хемолюминесценции щелочного раствора в сцинтилятор добавляют около 0,01 объема ледяной уксусной кислоты.

Растворять ПААГ или хотя бы белок внутри него можно и без перекиси водорода, с помощью некоторых фирменных солубилизаторов. Так, «Solucene» фирмы «Packard» растворяет ПААГ в результате энергичного встряхивания в течение суток при 60 — 65° . В солубилизаторе NCS фирмы «Nuclear Chicago» при аналогичной обработке гель сильно набухает, белок растворяется и выходит в сцинтилятор [Paus, 1971]. Фирма NEN («New England Nuclear») рекомендует для обработки ПААГ использовать 3%-ный раствор солубилизатора «Protosol» в сцинтилляционной смеси под названием «Econofluor». За ночь при 37° гель набухает, и около 80% белка переходит в сцинтилятор. Наконец, недавно был предложен специальный «коктейль», содержащий 6 г ППО, 10 мг NCS и 10 мл «Hyamine 10X hydroxide» в 1 л толуола. По утверждению автора, за 24 ч при комнатной температуре в эту смесь из ПААГ выходит до 95% белка [Aloyo, 1979].

Тщательное сопоставление всех перечисленных выше методов для счета тритиевых препаратов после электрофореза в ПААГ было недавно проведено Муром [Moore, 1980]. Наилуч-

шие результаты, по данным автора, дает обработка' предварительно растертого геля в течение ночи при комнатной температуре 1%-ным раствором солиобилизатора «Solucene 350» в толуоле, содержащим 0,5% ППО и 0,05% вторичного сцинтиллятора MSB фирмы «Packard». Для ускорения процесса можно предварительно солиобилизовать кусочек геля в 0,5 мл «Solucene 350» при 50° в течение 3 ч, а затем добавить 10 мл того же толуолового сцинтиллятора. Эффективность счета трития составляет около 60%, а выход достигает 90—95%.

Полное растворение геля легко осуществить в том случае, когда при полимеризации вместо метиленбисакриламида гель сшивают более лабильным бифункциональным агентом. В главе 1 уже был назван в этом качестве NN'-диаллилтартардиамид (ДАТД) и указаны условия растворения сшитого им геля в йодной кислоте [Anderson, McClure, 1973]. В другом варианте растворимого геля используют NN'-(1,2-диоксиэтилен)-бисакриламид (ДОЭБА), который легко синтезировать из акриламида и глиоксаля. Гель, сшитый ДОЭБА, растворяется в 0,025 М НЮ4 при 50° в течение 48 ч. Авторы работы [O'Connell, Brady, 1976] утверждают, что гели, сшитые ДОЭБА, отличаются более воспроизводимыми характеристиками, чем при использовании ДАТД. Описан также растворимый ПААГ, сшитый бисакрилилцистамином, который готовят из цистамина и акрилилхлорида [Hansen, 1976]. Этот гель растворяется в β-меркаптоэтаноле за 2—3 мин. В приготовлении таких гелей имеется целый ряд тонкостей, которые необходимо учитывать во избежание образования дополнительных, устойчивых к воздействию (3-меркаптоэтанола сшивков [Hansen et al., 1980]. NN'-Бисакрилилцистамина в настоящее время выпускается фирмой, так же как ДАТД и ДОЭБА.

Несмотря на свою кажущуюся привлекательность растворимые ПААГ не получили широкого распространения — скорее всего; ввиду худшей воспроизводимости их характеристик. Очень легко — простым нагреванием — расплавляются гели агарозы, но их применяют в основном для электрофореза нуклеиновых кислот, поэтому рассмотрение этого вопроса имеет смысл отложить до следующей главы.

Импрегнирование сцинтиллятора в гель

Возможен и обратный подход к решению проблемы счета радиоактивности белка после электрофореза — вместо элюции белка можно попытаться импрегнировать сцинтиллятор в кусочек геля, заменив им водное окружение радиоактивного белка и сохранив при этом прозрачность геля. Такая попытка реальна. В одном из описанных вариантов ПААГ дегидратируют в абсолютном этаноле, потом этанол заменяют на толуол, а его — на толуол-тритоновый сцинтиллятор [Gezelins, 1977]. По-видимому, лучше начинать с замены воды в геле на диметилсульфоксид.

При этом гель не будет съезжаться и терять прозрачности как это происходит при вымачивании его в этаноле.

Во всех случаях, когда обработке геля предшествует его разрезание, следует стремиться к тому, чтобы в одном кусочке геля была вырезана целая полоса или все белковое пятно. Широко распространенная практика разрезания цилиндрика геля на одинаковые диски толщиной 1—1,5 мм неудачна, так как разрез «вслепую» может попасть на середину полосы. В результате этого радиоактивность, содержащаяся в полосе, будет просчитана в двойном объеме геля, что даст ложную картину вдвое более широкого и низкого пика радиоактивности на электрофореграмме.

Разумеется, для того чтобы правильно вырезать белковую полосу, ее надо окрасить, а это трудно сделать при малой концентрации белка в полосе, что нередко имеет место при фракционировании радиоактивно меченных белков. Однако разработка новых высокочувствительных методов окрашивания белков, например серебром, поможет решить эту проблему.

Авторадиография

Регистрацию полос радиоактивных белков в пластине геля можно осуществить методом авторадиографии. На гель накладывают рентгеновскую пленку и экспонируют ее в течение длительного времени в темноте, обычно при комнатной температуре. Экспозицию ведут в кассете, где пленка прижимается к гелю пружинами через резиновую прокладку. В зависимости от уровня радиоактивности белков экспозиция может длиться от нескольких часов до многих дней. Затем пленку проявляют обычными проявителями, предназначенными для получения максимально контрастного изображения. Под действием β излучения участки пленки, лежащие над белковыми полосами и пятнами, чернеют. Авторадиографию имеет смысл проводить только в тех случаях, когда белки мечены радиоактивным углеродом или йодом. Энергия излучения трития слишком мала, чтобы испускаемые им β частицы смогли преодолеть воздушный промежуток между гелем и пленкой, да и просто вылететь из пластины, ввиду их сильного поглощения в геле.

Потеря энергии β частиц в геле достаточно велика и в случае использования радиоактивного углерода, поэтому перед авторадиографией гель высушивают. Кстати, толщина высушенного геля будет тем меньше, чем меньше содержание в нем метилденбисакриламида. Для высушивания гель переносят на фильтровальную бумагу («Whatman 3ММ»), под нее подкладывают пористую прокладку и перфорированную металлическую пластинку. Все это помещают в полиэтиленовый мешок и присоединяют к вакуумному насосу. При подогревании в горячей воде или под лампой гель высыхает за 1—2 ч, образуя тонкую прочную пленку на поверхности фильтровальной бумаги. Есть множество фирменных устройств для сушки гелей. В них пласти-

ну геля обычно кладут на подключенную к вакуум-насосу пористую основу и накрывают листом тонкой резины, которую присасывает вакуумом. Во избежание прилипания резины к гелю под нее можно положить тонкую пленку. Несмотря на высушивание, регистрация р-частиц углерода из глубинных слоев невозможна для гелей с исходной толщиной более 0,4 мм.

Для автордиографии следует использовать незранированную рентгеновскую пленку типа «Kodak No Screen X-Ray Film», например: NS-5T (США) или РТ-1 и РТ-2 (СССР). Фирма LKB (Швеция) рекламирует пленку, пригодную для автордиографии препаратов, меченных тритием, под названием «LKB-Ultrafilm». Суть дела здесь не в повышении чувствительности, а в отсутствии защитного слоя над фотографической эмульсией. Это облегчает проникновение в нее «слабых» β -электронов трития, но затрудняет последующую обработку пленки. Чувствительность метода автордиографии для регистрации ^{14}C можно оценить из следующих ориентировочных данных. Радиоактивность порядка 25000 распадов в минуту, равномерно распределенная по площади 1 см², надежно регистрируется за 24 ч экспозиции.

Для регистрации γ -излучения ^{125}I удобно применять способ «непрямой» автордиографии. γ -Излучение регистрируется рентгеновской пленкой, но большая его часть пронизывает ее и теряется, поэтому позади пленки устанавливают так называемый «интенсифицирующий экран», покрытый твердым сцинтиллятором (CaVO_4). Под действием γ -излучения экран флюоресцирует, а свет этой флюоресценции регистрируется пленкой. Разрешение и резкость полос при этом несколько ухудшаются, поскольку экран удален от геля на толщину пленки, а не все γ -частицы вылетают из геля перпендикулярно его поверхности, зато выигрыш в чувствительности получается значительный.

Для непрямой автордиографии следует использовать экранированные рентгеновские пленки, например: «Kodak X-Omat R» и «Kodak RP-50» (США) или РМ-1 (СССР). Интенсифицирующие экраны выпускают, в частности, фирма «Du Font» (США) под названием «Lightning Plus Intensifying Screen» и химфармзавод им. Семашко под маркой ЭУ-ВЗ.

Для повышения чувствительности пленки ее иногда предварительно засвечивают до плотности потемнения (после проявления), соответствующей $A_{540}=0,2—0,3$. Объяснение этого странного на первый взгляд феномена можно найти в работе [Laskey, Mills, 1975].

Флюорография

Для регистрации положения в геле белков, меченных тритием, применяют метод флюорографии. Смысл его в том, чтобы ввести сцинтиллятор внутрь геля таким образом, чтобы он находился в непосредственном контакте с радиоактивными белками в полосах. Свечение сцинтиллятора внутри геля легко выходит

из него наружу и регистрируется наложенной на гель рентгеновской пленкой того же типа, который используют при непрямой автордиографии. По существу говоря, такой подход уже был рассмотрен выше, но тогда не стояла задача сохранения геометрических размеров целой пластины геля, чего трудно добиться при импрегнировании в гель жидкого сцинтиллятора.

Повсеместное распространение для флюорографии гелей получила процедура, предложенная в 1974 г. Боннером и Ласки. Сначала воду в геле замещают на диметилсульфоксид (ДМСО), вымачивая пластину после фиксации в ней белков в течение 1 ч в двух сменах по 20 объемов ДМСО (по отношению к объему геля). Надо помнить, что ДМСО ядовит и легко проникает через кожу, поэтому работать следует в перчатках. Затем гель переносят на 3 ч в 4 объема 22%-ного (масса/объем) раствора ППО в ДМСО; за это время ППО входит в гель. ДМСО не является сцинтилляционным растворителем, поэтому его необходимо убрать, но так, чтобы ППО остался в геле. Высушить ДМСО не удастся, и приходится прибегать к следующему приему. Гель переносят в воду и вымачивают в ней около 1 ч. ППО в воде не растворим и немедленно выпадает в осадок. Гель становится белым, непрозрачным и заметно твердеет, зато ДМСО снова замещается на воду, которую затем нетрудно высушить, как было описано выше. На фильтровальной бумаге после высушивания остается жесткая белая пленка. Хотя она на вид и непрозрачна, но вспышки сцинтилляций внутри нее (в местах контакта ППО с радиоактивными белками) дают достаточно света, чтобы быть зарегистрированными рентгеновской пленкой. В результате достаточно продолжительного экспонирования на пленке появляется картина расположения радиоактивных полос или пятен в геле [Bonner, Laskey, 1974]. Засвечивание пленки для повышения ее чувствительности производят и в этом случае. Экспонирование пленки следует вести при температуре сухого льда, поскольку при более высокой, пусть даже и отрицательной температуре резко снижается чувствительность метода.

Гели с низким содержанием акриламида, например смешанные гели из 2%-ного ПААГ и агарозы, могут растворяться в ДМСО. Для них в аналогичной процедуре следует заменить ДМСО на метанол (10%-ный раствор ППО в метаноле). Для более концентрированных гелей метанол непригоден — гели в нем сжимаются.

Концентрированные и сильно сшитые гели часто трескаются при сушке обычным способом. Вакуум к гелю обычно подается только с одной стороны через сетку и фильтровальную бумагу. К противоположной стороне геля во время сушки плотно прилегает полиэтиленовая пленка или тонкая резина. Это приводит к тому, что со стороны бумаги гель затвердевает раньше («стекленеет»), а на противоположной его поверхности остается влага, которая может быть отсосана только через трещинки в геле. Во избежание этого дефекта было предложено между свободной по-

верхностью геля и пленкой или резиной прокладывать слой пористого полиэтилена, через который вакуум подается и к этой поверхности геля [Joshi, Haenni, 1980].

Недавно было указано на возможность замены ППО в качестве сцинтиллятора на салицилат натрия [Chamberlain, 1979]. Для него максимум флюоресценции лежит вблизи 410 нм, что вполне приемлемо для экранированной рентгеновской пленки. Главное же преимущество этого реагента — в его водорастворимости. Автор работы предлагает просто вымачивать гель в 10 объемах 1 М водного раствора салицилата натрия в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем сушить и флюорографировать, как обычно. Нагревать гель во время высушивания следует не выше, чем до 80°, во избежание возгонки салициловой кислоты. Раствор салицилата можно хранить в течение 1—2 недель. Потом он коричневеет (по-видимому, окисляется).

После флюорографии для количественных определений радиоактивности полосы из высушенного геля можно вырезать, дать им снова набухнуть в минимальном количестве воды и далее растворять с помощью солиubilизаторов. При оценке эффективности счета в жидком сцинтилляторе можно пользоваться только методом внутренней стандартизации.

Для правильного совмещения изображения на рентгеновской пленке с гелем, без чего из него нельзя вырезать нужные для счета участки, как и при автордиографии, пользуются реперными отметками по углам пластины геля. Эти отметки делают радиоактивными чернилами. С этой целью можно использовать любые не диффундирующие в геле чернила с примесью плохо растворимого, достаточно активного меченого препарата. Впрочем, забота об отсутствии диффузии чернил относится к случаю автордиографии влажных гелей, например при регистрации радиоактивного фосфора. Для высушенных гелей это не так существенно.

Комбинацией автордиографии и флюорографии можно регистрировать в геле двойную метку ^3H и ^{14}C (например, сопоставлять составы двух белковых смесей). В белки одной смеси вводят радиоактивную метку по ^3H , в белки второй — по ^{14}C . Обе смеси объединяют и разделяют двумерным электрофорезом. Пластины геля импрегнируют сцинтиллятором, высушивают и регистрируют флюорографией на пленку «Kodak IR-5» сцинтилляцию от обеих белковых смесей ($^3\text{H}+^{14}\text{C}$). С негатива делают контактный отпечаток, так что все пятна радиоактивности оказываются белыми. Затем с того же геля на незэкранированную пленку «Kodak NS-5T» при комнатной температуре регистрируют автордиографией только ^{14}C . К свету сцинтилляции эта пленка нечувствительна. Накладывают вторую пленку на позитив с первой. Не закрытые черным белые пятна указывают местонахождение белков, меченных только тритием, т. е. входящих в состав только одной из двух смесей. Затем изотопные метки двух белковых смесей можно поменять местами [McConkey, 1979].

Авторадиографией и флюорографией можно пользоваться не только для пластин, но и для цилиндрических гелей. Для этой цели из цилиндрика геля надо в продольном направлении вырезать плоский слой толщиной 0,5—1,5 мм. Описано простое приспособление, облегчающее эту операцию [Watts et al., 1977].

Флюорографию нитроцеллюлозных фильтров с перенесенными на их «репликами» белков из геля осуществляют очень просто. Фильтр погружают в 10%-ный раствор ППО в эфире, высушивают и регистрируют сцинтилляцию на рентгеновскую пленку, как это было описано для высушенного геля. Флюорография и авторадиография нитроцеллюлозных фильтров осуществляется лучше, чем в случае гелей, так как белки концентрируются на поверхности фильтров.

ПРЕПАРАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Электрофорез в ПААГ не получил широкого распространения в качестве препаративного метода фракционирования и очистки белков. Одна из причин этого, по-видимому, состоит в трудности осуществления равномерного теплоотвода из большой массы геля любой конфигурации (цилиндрической, кольцевой или плоской). Неравномерность теплоотвода и возникающие в геле градиенты температуры приводят, как уже отмечалось, к резкому ухудшению качества разделения белков.

Вторая трудность связана с необходимостью создания удобной и надежной камеры элюции для сбора белков по мере их последовательного выхода из геля. В многочисленных конструкциях, предлагавшихся в начале 70-х годов, такую камеру создавали под вертикально расположенным гелем, отделяя ее от нижнего электродного буфера диализной пленкой. Для сохранения качества разделения белков камера элюции очень малого объема должна быстро и полно, без застойных зон, промываться элюирующим буфером, а выходящие из геля белки не должны сорбироваться на ее поверхностях, в частности на диализной пленке. Удачного решения этих проблем найдено не было. Столб геля, деформируясь под собственной тяжестью, сползал в камеру, застойные зоны при элюции приводили к смешиванию белков из разных полос, сорбция на пленке оставалась значительной.

Недавно появилось сообщение об еще одной попытке преодолеть указанные трудности. Препаративное фракционирование белков вели в кольцевом 2,3%-ном ПААГ с ДДС-Na. Диализную мембрану, отделяющую камеру элюции от нижнего электродного резервуара, заменили слоем 10%-ного ПААГ. Во избежание сползания рабочего геля в камеру элюирующий буфер в нее подавался под гидростатическим давлением, уравнивающим вес геля, а скорость элюции задавалась перистальтическим насосом, стоящим на выходе из камеры. Сама камера имела форму незамкнутого кольца. Элюирующий буфер подавался с одного ее конца и выходил с другого. Сообщается о хорошем разделе-

нии ряда белков молекулярными массами 100—500 тыс. при загрузке в гель 4 мг белка [Hardman, Kane, 1980].

Из-за его оригинальности стоит упомянуть об одном решении проблемы камеры элюции [Marceau et al., 1975]. ПААГ полимеризуют в цилиндре из плексигласа, закрытом внизу диализной мембраной, лежащей на пористой подложке. Над самой мембраной в цилиндр открываются отверстия двух трубочек. Одна из них используется для подкачки, вторая — для слива элюирующего буфера. ПААГ не прилипает к плексигласу, и весь столб геля может перемещаться вверх внутри цилиндра. Такое перемещение на очень малое расстояние вызывается кратковременной подкачкой буфера под гель при закрытом сливе. Так создается камера элюции: она существует только то время, которое необходимо для выхода в нее очередной полосы белка. Затем открывают кран трубочки для слива буфера. Гель под действием собственного веса оседает, и камера полностью опорожняется. Процесс повторяют либо регулярно, по заданной программе, либо при подходе к нижнему концу геля очередной окрашенной маркером белковой полосы. Перед опорожнением камеры полярность напряжения на несколько секунд сменяют на обратную, что помогает десорбции белков с мембраны.

Проще и надежнее вести элюцию заранее окрашенных белковых полос последовательно, одну за другой, в сменные диализные мешочки [Sun, Hall, 1974]. В цитируемой работе ПААГ полимеризовали тоже в цилиндре из плексигласа диаметром 3 см, по оси которого проходила трубка для дополнительного охлаждения геля циркулирующей водой. Гель высотой 21 см поддерживался снизу нейлоновой сеткой. Сменные диализные мешочки легко одевались на нижний конец цилиндра с помощью полиэтиленовых переходников. Перед снятием очередного мешочка полярность напряжения на короткое время реверсировали. Таким образом авторам удалось выделить из 6 мг исходного белкового препарата три компонента, относительно мало различающиеся между собой по молекулярной массе (43, 47 и 53 тыс. яальтон).

Возможно построить препаративную систему электрофореза с последовательной элюцией белковых полос с нижнего края пластины ПААГ. Фирма «Bio-Rad» предлагает для этой цели специальные прокладки, используемые при полимеризации геля. Конструкция прокладок позволяет подвести к нижнему краю рабочего геля толщиной до 6 мм по обеим его сторонам две трубочки, через которые потом и осуществляют элюцию белков. Сначала между стеклянными пластинками формы полимеризуют пробку из плотного ПААГ, затем, как раз на уровне трубочек и на высоту их диаметра, заливают слой раствора сахарозы, а над этим слоем уже полимеризуют рабочий гель. Сахарозу потом замещает элюирующий буфер.

Для препаративного фракционирования белков нередко используют систему ступенчатого электрофореза, хотя иной раз и

из несколько других соображений, чем создание узкой начальной полосы. Наличие дополнительного формирующего геля при большой загрузке предохраняет от преципитации белка на границе рабочего геля, позволяет увеличить объем препарата, обеспечивает удаление из него остатков соли до начала процесса рабочего разделения и, наконец, снимает необходимость преэлектрофореза, так как основная часть персульфата успевает уйти из рабочего геля к аноду до того, как в этот гель вступают белки. Максимальная загрузка ПААГ при препаративном фракционировании белков может достигать 5 мг на 1 см² сечения геля.

Общим недостатком любых устройств с последовательной элюцией белков в конце пути их миграции через весь гель является продолжительность этого процесса и, в силу этого, диффузия белковых зон (особенно для белков, выходящих последними), поэтому сейчас на практике отдают предпочтение обычному (хотя и с увеличенной загрузкой) фракционированию белков в трубках диаметром до 1,7 см или в толстых пластинах. Фракционирование ведут с примесью окрашенных «свидетелей», как было описано выше. Аликвоту разделяемой смеси белков окрашивают ремазолом [Sun, Hall, 1974] или посредством данзилирования [Tijssen, Kurstak, 1979; Schettters, McLeod, 1979]; окрашенные полосы вырезают и белки элюируют из геля за счет диффузии или электрофореза (см. выше).

Следует иметь в виду, что при элюции белков из геля может выходить большое количество линейного полиакриламида, не вошедшего в состав матрицы геля. Он не обнаруживается при оценке чистоты белка аналитическим электрофорезом. Между тем аналитическое ультрацентрифугирование показывает, что количество элюированного полиакриламида может быть таким же, как и самого белка. Дополнительную очистку белка в этом случае можно провести его сорбцией на ионообменную смолу [Brooks, Sander, 1980].

Недавно был предложен оригинальный способ электрофоретической элюции белков одновременно из нескольких полос геля, вырезанных из пластины после препаративного электрофореза [Judd, 1979]. На прямоугольный поднос наносят ровный слой пропитанного буфером сефадекса Г-25 «суперфайн» толщиной 2—3 мм. С интервалом в 1—1,5 см перпендикулярно длинной стороне подноса в сефадексе выскребают канавки, куда укладывают полоски геля (рис. 30). По концам подноса на сефадексе через смоченную буфером фильтровальную бумагу кладут угольные электроды и подают напряжение. Под действием электрического поля белки из каждой полоски геля мигрируют в прилежащий слой сефадекса. Эти слои затем снимают, переносят в микролонки и белки из них элюируют.

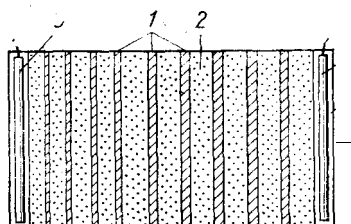
Кстати, можно просто заполнить сефадексом вертикальную колонку и использовать его в качестве антиконвекционной среды для препаративного электрофореза белков. Это, конечно, уже не электрофорез в геле, и качество фракционирования будет заве-

домо хуже, но для грубого разделения смеси белков оно может быть вполне приемлемым.

Отметим также успешное фракционирование до 1 г белковой смеси электрофорезом в градиенте концентрации раствора сахарозы (10—45%) в буфере с pH 8,5. Электрофорез вели в цилиндре диаметром 12 см и высотой 17 см [Walters, Bont, 1979]. Тонкость метода — в наслаивании препарата на раствор сахарозы с помощью металлического сита, которое поднимается по мере увеличения объема препарата, оставаясь сцепленным с мениском жидкости силами поверхностного натяжения. Это позволяет на-

Рис. 30. Схема электрофоретической элюции белков из геля в сефадексе [Judd, 1979]

1—полоски, вырезанные из геля; 2—сефадекс Г-25 «суперфайн»; 3—угольные электроды; 4—смоченная буфером фильтровальная бумага



нести 30 мл исходного белкового препарата совершенно ровным слоем толщиной 3 мм. Электрофорез во избежание разогрева жидкости ведут при малой плотности тока ($0,2 \text{ мА/см}^2$) в течение 15 ч. Фракции собирают, сливая содержимое колонки через воронку, расположенную в ее нижней части. Препаративный электрофорез в 5—25%-ном градиенте сахарозы в 0,1 М Трис-боратном буфере (pH 8) с 6 М мочевиной был недавно использован для очистки фотохимически сшитого комплекса тРНК и тРНК-синтетазы [Renaud et al., 1979].

К электрофорезу в геле эти методы, разумеется, прямого отношения не имеют, так как являются примерами электрофореза в свободной жидкости. Именно с этого начиналось применение электрофореза для фракционирования биополимеров. Однако за последнее десятилетие, во всяком случае для аналитических целей, электрофорез в свободной жидкости был полностью вытеснен электрофорезом в гелях или на твердых носителях (бумаге, различных производных целлюлозы, полиамидных пленках и т. д.), который широко применялся при фракционировании пептидов, аминокислот и других сравнительно низкомолекулярных биологически важных молекул, в том числе и в высоковольтных вариантах. В свое время, например, очень важную роль сыграл метод фракционирования олигонуклеотидов гидролизата РНК двумерным электрофорезом. В первом направлении разделение вели на полосках ацетатцеллюлозы в пиридин-ацетатном буфере (pH 3,5) с добавлением 7 М мочевины, во втором — на ДЭАЭ-бумаге в 7%-ной HCOOH [Brownlee, 1972]. Ввиду малой емкости ацетатцеллюлозы общая загрузка не превышала 0,1 мг гидролизата РНК, поэтому использовали препараты, меченные радиоактивным фосфором.

Сейчас методы фракционирования низкомолекулярных биологических объектов электрофорезом на твердых носителях настолько энергично и успешно вытесняет жидкостная хроматография под высоким давлением (ЖХВД), что рассматривать их уже не имеет смысла. Впрочем, изредка электрофорез на твердом носителе еще используют и для фракционирования белков. Так, сравнительно недавно было описано очень хорошее разделение девяти модификаций казеина молока электрофорезом на полосках ацетатцеллюлозы. Эти модификации различались уровнем фосфорилирования белка, и разделение шло по величине электрического заряда [West, Towers, 1976].

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть первая ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Введение	3
Глава 1	
Гели для электрофореза	7
Полиакриламидный гель (ПААГ)	7
Исходные материалы	7
Процесс полимеризации ПААГ	10
Выбор концентраций мономеров	13
Агароза	16
Смешанный гель (агароза+ПААГ)	20
Ацетатцеллюлозная пленка, импрегнированная ПААГ	21
Глава 2	
Техника приготовления гелей и аппаратура	21
Вертикально расположенные трубки	21
Вертикально расположенные пластины	26
Горизонтально расположенные пластины	32
Глава 3	
Электрофорез белков	37
Замечания общего характера	37
Миграция белков в геле	37
Напряженность электрического поля (H)	38
Выбор буфера рабочего геля	40
Выделение тепла при электрофорезе	42
Загрузка геля. Ширина белковых зон	44
Введение мочевины и (3-меркаптоэтанол). Некоторые артефакты .	46
Лидирующие красители	47
Разделение белков по размерам и заряду	48
Выбор рабочего буфера	48
Использование мочевины	50
Загрузка геля и подготовка препарата	52
Некоторые примеры	53
Разделение белков по размеру с использованием ДДС-На	56
Существо метода	56
Выбор пористости геля	59

Присутствие мочевины и нейонных детергентов	60
Выбор рабочего буфера геля	61
Подготовка белкового препарата	6в
Проведение электрофореза	63
Окрашивание и элюция белков	64
Ступенчатый электрофорез (disc-electrophoresis)	66
Градиент пористости ПААГ	73
Двумерный электрофорез в ПААГ	76
Электрофорез с использованием Тритона X-100 в цетавлоне	83
Тритон X-100	S3
Цетавлон	85
Окрашивание белков в ПААГ	88
Кислые красители	90
Другие красители и методы окрашивания	94
Флюоресцентные красители	97
Локализация ферментов после электрофореза	101
Локализация белковых полос осаждением ДДС-Na	104
Элюция белков из геля	105
Определение радиоактивности белков после электрофореза в ПААГ .	109
Счет радиоактивности в элюатах белка	109
Растворение ПААГ	110
Импрегнирование сцинтиллятора в гель	111
Авторадиография	112
Флюорография	113
Препаративный электрофорез белков	116
Глава 4	
Электрофорез нуклеиновых кислот	
120	
Замечания общего характера	120
Выбор буфера геля и напряженности электрического поля	120
Выбор характера геля и его пористости	121
Влияние вторичной структуры	123
Маркерные молекулы	125
Лидирующие красители	126
Электрофорез в мягких условиях	126
Фракционирование плазмид и фрагментов ДНК	126
Фракционирование РНК	128
Электрофорез в денатурирующих гелях	128
Щелочные гели	129
Гели, содержащие мочевины. Секвенирование ДНК и РНК	131
Денатурирующие гели с формамидом	135
Денатурирующие гели с формальдегидом	138
Гели, содержащие гидроокись метилртути	140
Денатурация нуклеиновых кислот глиоксалем	142
Использование градиентов пористости ПААГ	142
Двумерный электрофорез нуклеиновых кислот и их фрагментов	144
Некоторые особые случаи электрофореза нуклеиновых кислот	147
Электрофорез в геле агарозы тройного комплекса ДНК—РНК-поли- мераза—РНК	147

Выявление мРНК при электрофорезе суммарной РНК в геле агарозы	148
Использование жидкого (не сшитого) ПААГ	149
Окрашивание нуклеиновых кислот после электрофореза	150
Элюция нуклеиновых кислот из гелей	153
Элюция из ПААГ за счет диффузии	153
Элюция из гелей агарозы	154
Электрофоретическая элюция	158
Перенос нуклеиновых кислот из геля на нитроцеллюлозные фильтры и диазобумагу	162
Определение радиоактивности	165
Препаративный электрофорез нуклеиновых кислот	166
Литература	168

Часть вторая

УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

Введение	174
Глава 1	
Основные понятия теории седиментации	175
Глава 2	
Ультрацентрифуга	177
Принцип действия и расположение важнейших узлов	177
Проверка готовности основных систем к пуску	179
Пуск центрифуги	180
Глава 3	
Роторы и пробирки	182
Угловые роторы	182
Пробирки для угловых роторов	184
Уход за роторами и пробирками	187
Роторы со свободно подвешенными пробирками (бакет-роторы)	189
Роторы с вертикальными пробирками	191
Максимально допустимая частота вращения ротора	191
Зональные роторы	193
Особенности эксплуатации и ухода	197
Глава 4	
Раздельное осаждение частиц (дифференциальное центрифугирование)	199
Глава 5	
Зонально-скоростное центрифугирование	201
Константа седиментации	203
Изокинетический градиент плотности	204
Выбор среды	206
Характеристики растворов сахарозы	210
Профиль градиента сахарозы	213
Создание градиента плотности сахарозы	214
Наслоение препарата на градиент	219