

Содержание

Список использованных сокращений.....	4
Введение.....	5
Электрофорез в полиакриламидном геле.....	10
Полиакриламидные гели.....	10
Механизм полимеризации.....	10
Чистота реактивов.....	12
Акриламид.....	12
Инициаторы и катализаторы.....	14
Концентрация инициатора и катализатора.....	15
Влияние температуры.....	18
Влияние кислорода.....	19
Концентрация мономеров.....	20
Электрофоретическая подвижность в ПААГ.....	23
Разделение белков.....	25
Непрерывные буферные системы.....	27
Разделение белков в присутствии мочевины.....	28
Разделение белков в присутствии ДДС-Na.....	31
Ступенчатые буферные системы.....	35
Разделение в градиентах пористости и рН.....	42
Заливка геля.....	44
Подготовка и нанесение проб.....	49
Фиксация и окрашивание.....	52
Буферные растворы.....	56
Ступенчатые буферные системы.....	56
Денатурирующий электрофорез по методу Леммли.....	57
Нативный электрофорез по методу Орнштейна и Дэвиса.....	61
Непрерывные буферные системы.....	61
Нативный электрофорез по методу МакЛеллана.....	61
Денатурирующий электрофорез по методу Чокли.....	65
Электрофорез в смешанных гелях.....	68
Список литературы.....	69

Список использованных сокращений.

НК – нуклеиновые кислоты

п.о. – пары оснований

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

АА – акриламид

МБА – N,N'-метиленабисакриламид

ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

ПСА – персульфат аммония

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Трис - трис-(оксиметил)-аминометан (2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол)

ЛУК – ледяная уксусная кислота

ТВЕ – трис-борная кислота-ЭДТА

ТАЕ – трис-уксусная кислота-ЭДТА

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол·2HCl

ДДС-Na – додецилсульфат натрия

MES – 2-[N-морфолино]этансульфоновая кислота

HEPES – 4-[2-оксиэтил]-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

MOPS – 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота

CAPS – (N-циклогексил-3-аминопропансульфоновая кислота)

EPDS – 3-[4-(2-оксиэтил)-1-пиперазинил]пропансульфоновая кислота.

GABA – γ -аминомасляная кислота

Введение.

Электрофорез на протяжении последних десятилетий традиционно занимает важное место при исследовании белков и нуклеиновых кислот (НК). Метод позволяет разделять макромолекулы по размерам, пространственной конфигурации, вторичной структуре и заряду, что в сочетании с простотой и удобством в использовании делает его незаменимым не только для качественного, но и для количественного анализа макромолекул. Впервые, данный подход был применён шведским химиком Арне Тизелиусом в 1930-х годах для разделения белков сыворотки крови, а уже в 1948-м году, эта работа была отмечена нобелевской премией. С тех пор электрофорез успешно применяется для разделения почти всех известных органических и неорганических соединений. Наибольшие успехи метода электрофореза связаны с его способностью разделять заряженные биологические макромолекулы, что нашло широкое применение не только в биологических и биохимических исследованиях, но и в биотехнологии. На протяжении многих лет электрофорез является основным методом разделения белков и нуклеиновых кислот, оставаясь одним из самых чувствительных методов. К примеру, при секвенировании ДНК требуется разделять длинные цепочки полинуклеотидов, содержащих от 200 до 500 пар оснований (п.о.) и отличающихся на один нуклеотид. Ни один другой экспериментальный подход не обладает достаточной разрешающей способностью, чтобы справиться с этой задачей.

В основе метода электрофореза лежат следующие основные принципы. В составе всех нуклеиновых кислот и белковых молекул присутствуют химические группы, обладающие в водном растворе электрическим зарядом. Величина общего заряда такой молекулы определяется количеством заряженных групп, их природой, а также

кислотностью (рН) раствора. Так в нуклеиновых кислотах в широком диапазоне рН на каждую фосфатную группу приходится заряд -1. В белковых молекулах одновременно присутствуют как положительно, так и отрицательно заряженные группы. По этой причине суммарные заряды разных белков могут значительно отличаться друг от друга. Более того, заряд молекул одного белка чувствителен к рН и в зависимости от величины констант ионизации (рК) химических групп, входящих в состав аминокислотных остатков, может изменяться в достаточно широких пределах. При физиологических уровнях рН проявляют основные свойства (несут положительный заряд) гистидиновые (His), лизиновые (Lys) и аргининовые (Arg) аминокислотные остатки; к кислотным (заряженным положительно) в этих условиях относятся остатки аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) кислот. Кроме того, суммарный заряд макромолекулы может изменяться при её взаимодействии с низкомолекулярными ионами и другими заряженными молекулами.

Под действием внешнего электрического поля заряженные молекулы могут перемещаться к катоду или аноду, в зависимости от их суммарного заряда. Такое явление и носит название электрофореза. Скорость движения молекулы в поле единичной напряжённости называется электрофоретической подвижностью и является важной характеристикой вещества. Именно различия в электрофоретической подвижности различных биологических молекул очень часто используется для разделения их смесей в аналитических или препаративных целях.

При движении молекулы в электрическом поле её подвижность зависит от заряда, силы сопротивления среды и характера растворителя, который сам, чаще всего, является электролитом. В этих условиях вокруг макромолекулы образуется ионная атмосфера, и молекула оказывается окружена диффузным облаком противоионов. Присутствие

ионной атмосферы вокруг макромолекулы приводит к уменьшению её электрофоретической подвижности. Это обусловлено несколькими обстоятельствами. Во-первых, облако противоионов частично экранирует заряд самой молекулы и, как следствие, ослабляет действие на неё электрического поля. Во-вторых, само облако противоионов, обладая противоположным по отношению к молекуле зарядом, будет взаимодействовать с электрическим полем и смещаться в противоположную сторону, тормозя движение молекулы. Это явление называют электрофоретическим трением. В-третьих, при движении молекулы отдельные ионы вокруг неё тоже непрерывно перемещаются, то приближаясь, то удаляясь. Вследствие этого в ионной атмосфере происходит непрерывное замещение ионов. Для вновь входящих ионов требуется время, чтобы найти своё место в поле макромолекулы и прийти в равновесие с её окружением, что приводит к нарушению сферически симметричной формы ионной атмосферы. В результате, двойной электрический слой позади частицы растягивается и тормозит её движение. Это явление носит название релаксационного эффекта.

Пренебрегая релаксационными эффектами, подвижность сферической частицы может быть описана при помощи уравнения Генри:

$$U = \frac{\varepsilon}{4\pi\eta} \left(\zeta + 5a^3 \int_{\infty}^a \frac{\varphi(r)}{r^6} dr - 2a \int_{\infty}^a \frac{\varphi(r)}{r^4} dr \right)$$

где $\varphi(r)$ – потенциал в ионной атмосфере

ζ – электрокинетический потенциал

a – радиус частицы

η – коэффициент вязкости растворителя

ε – диэлектрическая проницаемость частицы

Применив теорию Дебая-Хюккеля для малых ζ уравнение Генри можно упростить:

$$U = \frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\eta} g(\kappa a),$$

$$g(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - \frac{3(\kappa a)^3}{48} - \frac{(\kappa a)^4}{96} + \frac{(\kappa a)^5}{96} - \left(\frac{(\kappa a)^4}{8} - \frac{(\kappa a)^6}{96} \right) \cdot \exp(\kappa a) \cdot \int_{\infty}^a \frac{e^{-t}}{t} dt$$

$$\kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2}{100\varepsilon kT} \mu, \quad \mu = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i$$

где e – заряд электрона

N_A – число Авогадро

μ – ионная сила раствора

z – валентность иона

c – молярная концентрация

Параметр $1/\kappa$ имеет размерность сантиметров и отражает толщину ионной атмосферы вокруг макромолекулы. Из приведённого выражения, в частности, следует, что электрофоретическая подвижность частицы в растворе электролита понижается с ростом ионной силы раствора.

На практике применяются три основных типа электрофореза: электрофорез с подвижной границей, зональный электрофорез и стационарный (вытесняющий) электрофорез. В методе подвижной границы исходная проба, содержащая исследуемую смесь макромолекул, наслаивается на буферный раствор, при движении в котором под действием электрического поля можно наблюдать набор перемещающихся границ. Основная сложность при проведении фореза без поддерживающей среды заключается в том, что нет возможности зафиксировать картину получаемого распределения, а наличие диффузии в растворе может привести к размыванию фронтов. Для

уменьшения влияния диффузии такой тип электрофореза часто проводится в капиллярах.

Наиболее распространённым видом зонального электрофореза в настоящее время является электрофорез в поддерживающей среде. При анализе биологических макромолекул в качестве такой среды чаще всего используются различные гели, наиболее распространёнными среди которых являются агарозные и полиакриламидные гели.

Примером стационарного электрофореза может служить изоэлектрическое фокусирование, основанное на том, что в составе таких молекул как белки присутствуют группы, несущие как положительный, так и отрицательный заряд. Общий заряд макромолекулы в этом случае будет зависеть от рН среды, и возможна ситуация, когда количество положительных зарядов в молекуле сравняется с количеством отрицательных зарядов в ней. Говорят, что значение рН, при котором достигается такое зарядовое равновесие, соответствует изоэлектрической точке (рI) молекулы. При этом суммарный заряд такой молекулы окажется нулевым, и она не будет двигаться во внешнем электрическом поле. На практике это позволяет разделять молекулы в смеси по величине их изоэлектрических точек. Для этого в среде создаётся градиент рН, вдоль которого прикладывается электрическое поле. Когда молекула, двигаясь в поле, попадает в зону с рН, соответствующим её изоэлектрической точке, её движение прекращается, и она остаётся на одном месте до окончания электрофореза. Таким образом, через некоторое время после начала разделения зон устанавливается равновесие, при котором ширина зон в дальнейшем уже не изменяется.

Для более подробного знакомства с существующими на сегодняшний день представлениями о теории и применении электрофореза можно обратиться к следующим монографиям и обзорам [1-13].

Электрофорез в полиакриламидном геле.

В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ, или PAGE от англ. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) является наиболее распространенным способом электрофоретического разделения белков и нуклеиновых кислот. Популярность метода, во многом, обусловлена его высокой разрешающей способностью и экспериментальной гибкостью. Он позволяет варьировать в широких пределах пористость геля, добиваясь тем самым оптимальных условий при разделении каждого конкретного образца. Путём изменения состава геля и буферных систем можно осуществлять разделение макромолекул по массе, по заряду или по соотношению между их массой и зарядом.

Полиакриламидные гели.

Ключевым аспектом при использовании метода электрофореза в ПААГ является понимание самого процесса полимеризации геля. Грамотно используя различные особенности процесса можно существенно улучшить стандартную методику и оптимизировать условия проведения конкретного эксперимента.

Механизм полимеризации.

Полиакриламидные гели образуются при сополимеризации акриламида (АА) и *бис*-акриламида (N,N'-метиленабисакриламид, МБА, или просто "*бис*"). Реакция полимеризации проходит по свободно-радикальному механизму за счёт объединения винильных групп и носит цепной характер. Полимеризация инициируется персульфатом аммония (ПСА): $\text{NH}_4\text{-SO}_4\text{-SO}_4\text{-NH}_4$, который при растворении в воде подвергается гомолитическому расщеплению по связи между атомами

кислорода. В результате образуются два достаточно долго живущих радикала с одним неспаренным электроном у атома кислорода $\text{NH}_4\text{-SO}_4\cdot$. Скорость образования свободных радикалов из ПСА можно увеличить путём добавления в раствор ТЕМЕД (N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин, $(\text{CH}_3)_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$), который, таким образом, служит катализатором реакции полимеризации. Свободные радикалы ПСА взаимодействуют с мономерами акриламида, приводя к разрыву двойной связи и превращая их в свободные радикалы. Последние, в свою очередь взаимодействуют с неактивированными мономерами с образованием нового радикала, давая, таким образом, начало цепной реакции полимеризации. Цепная реакция идёт до тех пор, пока не встретятся два радикала, которые после взаимодействия образуют обычную ковалентную связь. В растущую полимерную цепь по аналогичному механизму могут встраиваться случайным образом молекулы *бис*-акриламида. Имея в своём составе две винильные группы на разных концах молекулы, МБА может оказаться встроенным в две различные полимерные цепочки, образуя между ними сшивку (*рисунок 1*). Это приводит к образованию пористого геля, размер пор которого зависит от условий полимеризации и концентрации мономеров в растворе.

Источником свободных радикалов также может служить рибофлавин, нередко используемый вместе с ПСА и ТЕМЕД. Под действием света он присоединяет водород и восстанавливается до лейкорибофлавина, который, в свою очередь, окисляется в присутствии кислорода с образованием перекиси водорода. Разложение перекиси приводит к образованию $\text{OH}\cdot$ радикалов, которые дают начало полимеризации акриламида. Такой механизм часто называют фотохимической полимеризацией.

АКРИЛАМИД *бис*-АКРИЛАМИД

ПОЛИАКРИЛАМИД

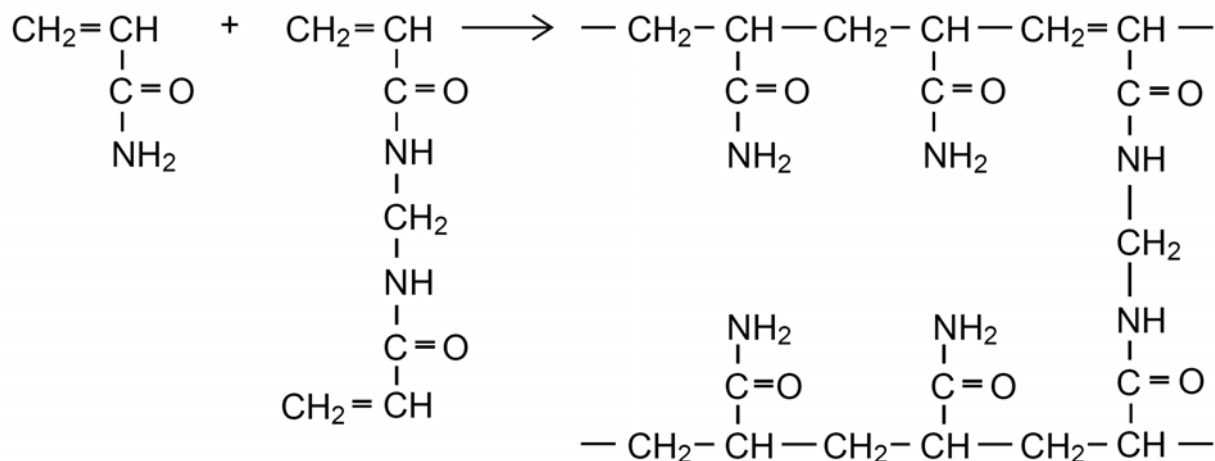


Рисунок 1. Полимеризация акриламида с *бис*-акриламидом под действием иницирующего агента [24]

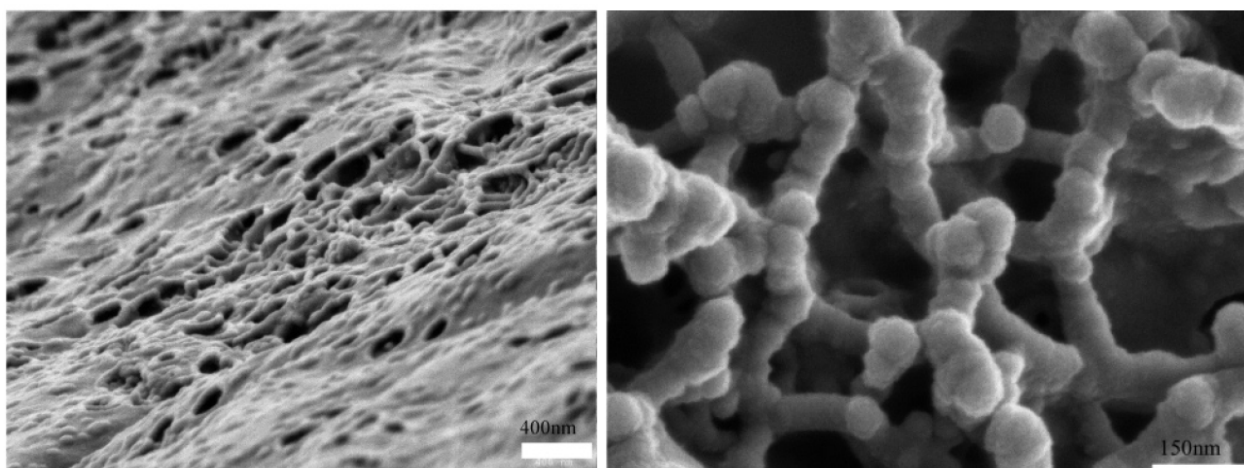


Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия 7.5% ПААГ на поверхности (слева) и изнутри (справа) [25]

Чистота реактивов.

Акриламид.

В полимеризации геля участвуют мономеры акриламида и *бис*-акриламида, инициатор реакции полимеризации, обычно ПСА, и катализатор, чаще всего ТЕМЕД. Примеси в реактивах чаще всего препятствуют полимеризации, что приводит к повышенной пористости

геля, изменению подвижности молекул, а также к плохой воспроизводимости результатов. В молярном выражении количество акриламида намного превышает содержание остальных веществ. Как следствие, акриламид низкого качества может служить основным источником мешающих примесей, среди которых можно выделить нижеперечисленные вещества.

Акриловая кислота. Акриловая кислота представляет собой продукт деамидирования акриламида. Если в растворе присутствует примесь акриловой кислоты, то она будет вступать в реакцию полимеризации как и акриламид. Однако включения остатков акриловой кислоты в гель приведёт к изменению его ионообменных свойств. В результате в геле могут возникнуть локальные изменения pH, что может привести к отклонениям в направлении движения полос в геле, нарушениям формы полос, иногда – к выпадению пробы в осадок, и плохой воспроизводимости результатов от эксперимента к эксперименту. По этим причинам содержание акриловой кислоты в акриламиде не должно превышать 0.001-0.050 % (w/w). При этом 5%-ный водный раствор акриламида должен иметь pH не ниже 5, а поглощение 1% раствора в 1 см кювете A_{290} не должно превышать 0.15 [11].

Линейный полиакриламид. Примеси с каталитическими свойствами могут вызвать процесс самопроизвольной полимеризации при производстве и хранении недостаточно чистого акриламида. В результате, в составе сухого мономера будет находиться примесь линейного полимера, который станет центром полимеризации и, тем самым, повлияет на ход реакции. Основным последствием станет потеря воспроизводимости пористости геля при его приготовлении и относительной подвижности образца в ходе электрофореза. Линейный полиакриламид может быть обнаружен как нерастворимая в воде или спирте примесь, содержание которой не должно превышать 0.005% .

Ионные примеси. Ионные примеси могут выступать как в роли ингибиторов, так и в роли катализаторов реакции полимеризации. Помимо акриловой кислоты, в роли ионных примесей чаще всего выступают ионы металлов. Например, ионы меди способны подавлять полимеризацию геля. Ионы металлов также способны повлиять на активность разделяемых ферментов, делая их непригодными для дальнейших исследований. При разделении НК примеси ионов металлов влияют на рестрикционную активность, внося ошибки в результаты эксперимента.

Следующий важный компонент ПААГ – это *бис*-акриламид. МБА присутствует в растворе мономеров в значительно меньших концентрациях, чем АА. Однако, некачественно очищенный МБА может содержать все те же примеси, что и АА, включая акриловую кислоту, продукты линейной полимеризации и ионные примеси. Таким образом, некачественный МБА может вызывать артефакты, аналогичные рассмотренным выше.

Инициаторы и катализаторы.

Инициатором химической полимеризации является персульфат аммония, а катализатором реакции служит ТЕМЕД. Поскольку полимеризация инициируется свободными радикалами, то нет ничего удивительного в том, что эти вещества реакционно способны и подвержены окислению и разрушению. По этой причине основными примесями в иницирующих растворах являются продукты их собственной деградации, а также продукты деградации прочих возможных примесей.

ТЕМЕД подвержен окислению, что приводит к частичной потере его каталитической активности. Этот процесс заметно ускоряется в присутствии окисляющих примесей. Для ТЕМЕД, содержащего

продукты окисления, характерен жёлтый цвет. На практике это приводит к постепенной потере реакционной способности ТЕМЕД, и к необходимости использования бóльшего количества реактива для достижения желаемого уровня полимеризации. ТЕМЕД также сильно гигроскопичен, и постепенно накапливает в себе воду, которая ускоряет процессы окислительной деградации. Качественный реактив представляет собой чистую прозрачную жидкость, без примесей воды, с содержанием ТЕМЕД не менее 99% (14.4 М).

ПСА также представляет собой сильно гигроскопичное вещество. Это особенно важно, так как ПСА подвергается немедленному разложению при растворении в воде. Поэтому накопление реактивом воды приводит к быстрой потере его реакционной способности. По этой причине важно, чтобы растворы ПСА были приготовлены непосредственно перед использованием. Персульфат расходуется в ходе полимеризации. Его избыток в геле может привести к окислению белков и НК. Поэтому важно не превышать рекомендованные концентрации ПСА в растворе.

Концентрация инициатора и катализатора.

Концентрация инициаторов и катализаторов в первую очередь влияет на скорость протекания реакции полимеризации. Однако, что ещё важнее, от их концентрации зависят также и свойства образующегося геля. Увеличение концентрации ТЕМЕД и ПСА приводит к укорачиванию средней длины полимерной цепи в геле, росту мутности геля и снижению эластичности геля. При их сильном избытке образуются растворы, которые вовсе не образуют геля. Это происходит, если длина полимерных цепей оказывается недостаточной для формирования геля и раствор внешне не отличается от раствора мономеров. Единственным признаком прошедшей реакции в этом

случае служит некоторое увеличение вязкости раствора. Избыток ПСА и ТЕМЕД может приводить и к другим последствиям, включая окисление исследуемого образца, увеличение рН раствора (ПСА играет роль буфера в области между рН 8 и 9), нарушение картины распределения полос в геле. Также следует иметь в виду понижение реакционной способности ТЕМЕД в кислых рН.

Уменьшение концентрации ПСА и ТЕМЕД, напротив, приводит к увеличению средней длины полимерной цепи в геле, снижению его мутности и повышению эластичности получаемого геля, т.е. позволяет достичь желаемых свойств геля. Однако снижение концентрации инициатора и катализатора также означает большее время полимеризации. Если полимеризация проходит слишком медленно, то в раствор мономеров начнёт проникать кислород и заблокирует реакцию. Это приведёт к образованию крупнопористого геля с малой механической прочностью. Особенно жидкими будут участки геля на границе с воздухом и вблизи от спейсеров и гребёнок, которые склонны сорбировать воздух на своей поверхности. Оставшийся в растворе мономер способен реагировать с α -амино, $-SH$ и фенольными $-OH$ группами белков.

Для ступенчатых буферных систем, таких как Лэммли, оптимальный промежуток времени от момента добавления ПСА до появления видимых признаков полимеризации нижнего (разделяющего) геля составляет 15-20 минут. При этом следует иметь в виду, что сам процесс полимеризации будет продолжаться гораздо дольше (до 2-х часов, *рисунок 3*). Для верхнего (концентрирующего) геля и для гелей в составе непрерывных буферных систем оптимальное время видимой полимеризации составляет 8-10 минут. В этом случае, из-за влияния атмосферного и сорбированного кислорода требуются более высокие концентрации ПСА и ТЕМЕД. В любом случае, в полимерное состояние должно перейти не менее 95% мономеров. Если видимое

гелеобразование занимает более 20 минут, то начинают проявляться эффекты ингибирования реакции атмосферным кислородом.

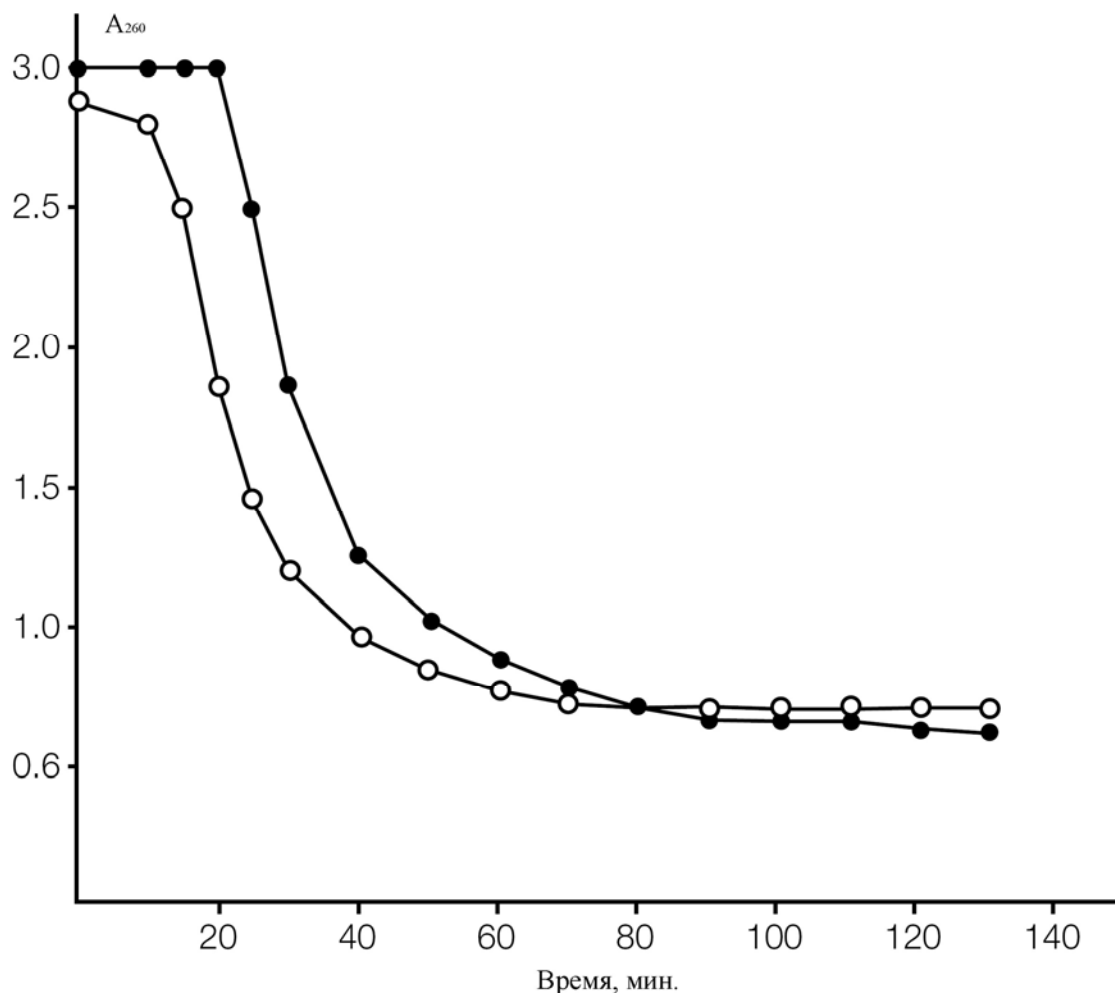


Рисунок 3. Ход полимеризации акриламида двух различных марок. Полная концентрация мономеров в опыте составила 12%. Полимеризация проводилась в буферной системе Лэммли. За ходом полимеризации наблюдали по поглощению раствора на длине волны 260 нм.

В качестве общего правила можно предложить использовать минимальные концентрации инициатора, которые позволяют достичь полимеризации за оптимальное время. Так, на пример, при использовании ПСА и ТЕМЕД их лучше всего брать в примерно эквимольных концентрациях (т.е. количество ТЕМЕД в объёмных

процентах должно быть примерно вдвое меньше, чем ПСА) в диапазоне от 1 до 10 мМ. При этом видимое гелеобразование занимает 15-20 минут, а сам процесс полимеризации в основном завершается через 90 минут (*рисунок 3*). В случае фотохимической полимеризации до появления видимых признаков гелеобразования проходит 30-60 минут, а для полимеризации требуется до 8 часов.

Влияние температуры.

Температура, является одним из критических параметров при полимеризации акриламида. Температура оказывает непосредственное влияние на скорость полимеризации, кроме того сама полимеризация представляет собой экзотермическую реакцию. Как следствие, выделяющееся тепло ускоряет протекание реакции и вскоре после начала полимеризации появляются видимые признаки гелеобразования. При приготовлении гелей с концентрациями выше 15% рекомендуется предусмотреть их охлаждение. При охлаждении геля на 1°C время его полимеризации в среднем возрастает на 2 минуты.

Температура также влияет на свойства самого геля. Так полимеризация при температуре 0-4°C приводит к формированию крупнопористого, мутного и неэластичного геля; в этих условиях трудно достичь воспроизводимости результатов. Это объясняется увеличением числа водородных связей между мономерами при пониженной температуре. Ситуацию можно улучшить, проводя полимеризацию при температуре 25°C. Однако слишком высокие температуры реакции приводят к укорачиванию образующихся полимерных цепей и хрупким гелям. Полагают, что это связано более эффективной терминацией реакции полимеризации.

Температура в 23-25°C является не только удобной, но оптимальной для протекания реакции. Важно, чтобы не только сам

раствор мономеров, но и стекла, между которыми происходит полимеризация, находились при одинаковой температуре. Более того, воспроизводимость результата сильно зависит от того, используются ли от эксперимента к эксперименту одни и те же температуры, или нет. Поскольку исходные растворы, используемые для приготовления гелей, обычно хранятся в холодильнике, важно дать готовому раствору мономеров прогреться до комнатной температуры, прежде чем дегазировать его.

Влияние кислорода.

Как уже отмечалось выше, образование полиакриламидного геля проходит по свободно-радикальному механизму. По этой причине, реакция ингибируется любым веществом, которое способно перехватывать свободные радикалы. Кислород является одним из таких ингибиторов. Атмосферный кислород, кислород, растворённый в воде или сорбированный на частях установки, вступающих в контакт с раствором, будет тормозить, а иногда и полностью останавливать, реакцию полимеризации акриламида. Поэтому важным этапом подготовки растворов является их дегазация непосредственно перед заливкой геля. Этот этап также может сильно повлиять на воспроизводимость результатов. Для этого раствор помещают в вакуумную камеру или подключают к вакуумной линии. В некоторых случаях можно пользоваться вакуумным насосом. Распространённый подход с использованием слабого водоструйного насоса не позволяет провести существенную дегазацию раствора. Поскольку растворимость газов в воде уменьшается с ростом температуры, процесс дегазации пройдёт более быстро и полно при комнатной температуре, нежели в холодных растворах (температура в холодильнике составляет примерно +4°C). Кроме того, находясь под вакуумом, холодный раствор так и

останется холодным, и его последующая полимеризация пройдет не в оптимальном режиме, что отразится на качестве геля. Для достижения воспроизводимого качества геля и последующего разделения в нём необходимо следить за соблюдением неизменности таких параметров, как температура растворов, время дегазации и характеристики вакуумной линии в каждом эксперименте.

Концентрация мономеров.

Для определения концентрации гелей используют три основных параметра, характеризующие:

- полную концентрацию всех типов мономеров в геле T (от англ. *Total*)
- концентрацию акриламида A (от англ. *Acrylamide*)
- концентрацию агента, образующего межнитевые сшивки в геле, C (от англ. *Crosslinker*), в роли которого чаще всего используется метиленбисакриламид.

На практике эти величины рассчитываются следующим образом:

$$T(\%) = \frac{m(AA) + m(МБА)}{V_{p-pa} (AA + МБА)}$$

$$A(\%) = \frac{m(AA)}{m(AA) + m(МБА)}$$

$$C(\%) = \frac{m(МБА)}{m(AA) + m(МБА)}$$

где $m(AA)$ и $m(MBA)$ – масса акриламида и метиленбисакриламида
соответственно

$V_{p-pa}(AA+MBA)$ – суммарный объем раствора мономеров.

На практике чаще всего используются гели с концентрацией от 3% T до 30% T и от 1% C до 5% C , что соответствует диапазону отношений AA/MBA от 99:1 до 19:1. В качестве исходных концентрированных растворов обычно используют растворы 40% A , 2% C и 40% T . В последнем случае, обычно используют растворы с соотношением AA/MBA 19:1, 29:1 или 37.5:1. С увеличением концентрации мономеров, процесс полимеризации протекает быстрее, поэтому при переходе от 5% T к 30% T концентрацию инициатора можно уменьшить на 25-50%. Однако более важным обстоятельством является то, что с изменением параметров T (A) и C изменяются и свойства самого геля.

Прежде всего, изменяются механические свойства геля, и при концентрации менее 5% T и 1% C гели становятся мягкими и липкими на столько, что манипулировать ими крайне сложно. Поэтому при работе с крупнопористыми гелями необходимо увеличивать количество сшивок, повышая величину C до 3-5 %, что соответствует соотношению AA/MBA в пределах 35:1 – 19:1. Мелкопористые гели с концентрацией порядка 20% T при большом количестве сшивок становятся хрупкими и мутными, поэтому для них рекомендуется использовать 1-2% C . Как правило, при повышении концентрации акриламида A концентрацию бис-акриламида C следует понижать, и наоборот.

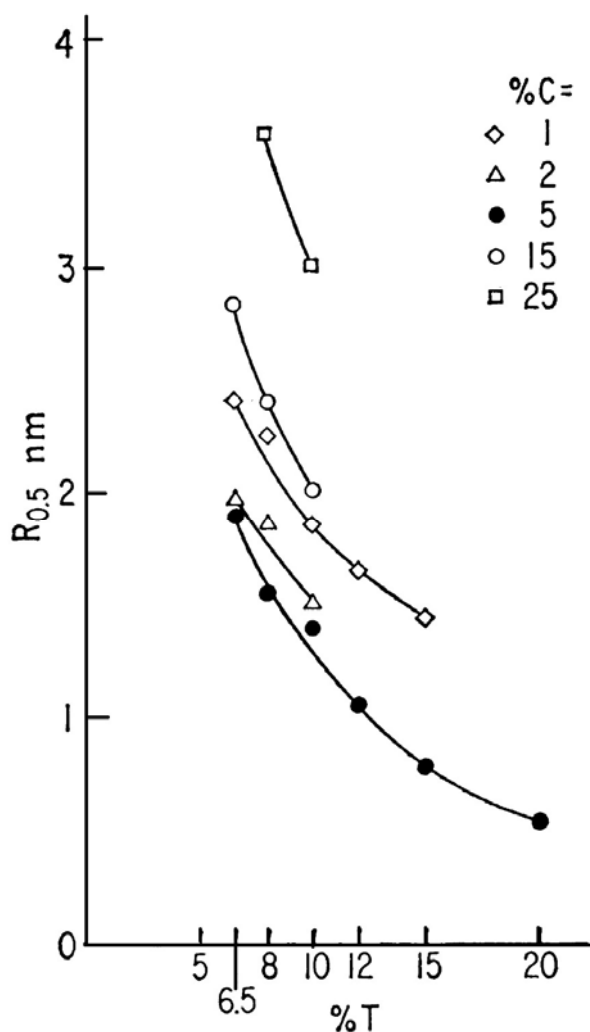


Рисунок. 4

Зависимость среднего размера пор в ПААГ от полной концентрации мономеров T при различной концентрации МБА C [24].

Вторым обстоятельством, которое необходимо учитывать при выборе T и C является размер пор геля. Как уже отмечалось выше, при полимеризации ПААГ в растущую полиакриламидную цепь случайным образом встраиваются молекулы МБА. При этом при $C < 2\%$ расстояние между соседними сшивками составляет 50-100 мономерных единиц. Поэтому, с точки зрения мигрирующей частицы, гель представляет собой достаточно густо расположенные длинные и относительно гибкие волокна (*рисунок 2*), которые частица при своём движении вынуждена раздвигать как переплетённые в джунглях лианы. Чем выше содержание акриламида (а величина T определяется в основном им), тем гуще расположены нити полимера и тем большее сопротивление испытывает движущаяся частица. С ростом C происходит уменьшение расстояния между соседними сшивками, что ведёт к увеличению жёсткости геля и

силы сопротивления. Как следствие, уменьшается подвижность мигрирующих в геле частиц. Однако при очень большом количестве сшивок ($C > 10\%$) образуется достаточно регулярная и жёсткая пространственная сетка, раздвинуть волокна которой частица уже не может. При этом размер сшивок накладывает ограничение и на минимальное расстояние между волокнами полиакриламида, что приводит к некоторому увеличению размера пор в геле. Так, к примеру, гели с концентрацией 15% C и выше ведут себя как крупнопористые даже при высоких значениях T .

Электрофоретическая подвижность в ПААГ.

Как и в случае электрофореза в агарозном геле, для вычисления электрофоретической подвижности молекул U в ПААГ удобно пользоваться формулой:

$$U = \frac{d}{Et}$$

где d – расстояние ($см$), пройденное молекулой в геле;

E – напряжённость электрического поля ($B/см$) в межэлектродном пространстве;

t – время миграции молекулы ($сек$).

Было также показано, что при миграции молекул в ПААГ остаётся справедливым и соотношение Фергюсона, которое устанавливает линейную зависимость между логарифмом электрофоретической подвижности молекул (U) и концентрацией геля (T):

$$\log U = \log U_0 - K_R T$$

где U_0 – электрофоретическая подвижность частицы в отсутствие геля;

K_R – коэффициент ретардации, зависящий от свойств геля, а также размеров и формы молекулы.

Из анализа графиков Фергюсона можно сделать вывод о природе различия электрофоретических подвижностей различных молекул в геле. В частности они позволяют различать случаи, когда молекулы имеют одинаковый заряд, но различные массы; одинаковые массы при различных зарядах; когда молекулы отличаются как по заряду, так и по массе. Анализ этих графиков помогает также выбрать оптимальную концентрацию геля T при разделении различных молекул (подробнее см. в работе [1]).

При разделении белков величина коэффициента ретардации K_R лежит обычно в пределах 0.1–0.4, увеличиваясь с ростом количества межнитевых сшивок в геле при умеренных значениях C (до 7–8%). Выбор концентрации геля T зависит от природы различия электрофоретических подвижностей белков. Если у молекул в пробе сильно различаются размеры, но соотношение заряда к массе остается примерно одинаковым, то имеет смысл выбрать T максимальным. Разделение в этом случае будет проходить только за счёт трения молекул о гель. Если же молекулы в пробе имеют различные соотношения заряда к массе, можно использовать крупнопористые гели при малых значениях T . Разделение при этом будет проходить в основном так же, как и в свободном растворе, но позволит сократить время эксперимента.

При проведении электрофореза в ПААГ бывает также удобно ввести коэффициент относительной подвижности белков, который определяется как отношение расстояния, пройденного белком, к расстоянию, пройденному ионным фронтом или лидирующим

красителем. Оптимальными являются условия, при которых коэффициент относительной подвижности лежит в интервале 0.55-0.60.

Таким образом, при подборе оптимальных условий эксперимента параметры проведения электрофореза можно изменять в достаточно широких пределах. Однако для надёжного сопоставления результатов различных экспериментов необходимо строго следовать однажды выбранным условиям.

Разделение белков.

В отличие от НК белки являются цвиттерионами, т.е. содержат химические группы, способные при ионизации приобретать заряды разного знака. Для миграции в электрическом поле имеет значение полный заряд молекулы, который, в случае белков, будет сильно зависеть от рН среды. Поскольку основной задачей в опытах по электрофорезу обычно служит разделение компонентов смеси, то оптимальными должны считаться условия, когда молекулы различных компонентов имеют максимальную разницу в зарядах. При этом заряд каждой молекулы в отдельности вовсе не должен быть максимальным. По этой причине проводить эксперименты при экстремальных значениях рН, удалённых от изоэлектрических точек белков, в большинстве случаев не целесообразно. Для кислых (отрицательно заряженных) белков оптимальные значения рН лежат в нейтральной или слабощелочной области. Для щелочных белков (несущих положительный заряд), таких как гистоны, подходят слабокислые буферные растворы при рН 4–5.

Кроме рН, при выборе буфера нужно также учитывать его электропроводность, которая определяется концентрацией, необходимой для поддержания рН, степенью диссоциации буферных веществ при этом значении рН, а также характером образующихся

ионов. Поскольку сила электрического тока одинакова по всей длине геля, электропроводность буфера будет определять величину падения напряжения на участке, заполненном данным буфером, а, следовательно, и напряжённость электрического поля на этом участке. Напряжённость поля, в свою очередь, будет определять скорость движения заданной молекулы в однородном геле. По этой причине при прочих равных условиях следует предпочесть буфер с меньшей электропроводностью, который позволит, с одной стороны, увеличить скорость миграции молекул в геле при одной и той же силе тока, а с другой стороны, позволит уменьшить силу тока, а вместе с ней и тепловыделение, при заданной напряжённости поля. Таким образом, изменяя электропроводность буфера в различных частях геля можно варьировать и напряжённость поля на этих участках, а, следовательно, и скорость миграции образца. Этим эффектом часто пользуются для концентрации белковых полос в геле, когда при переходе из одной части геля в другую пробы уменьшают скорость своего движения, что приводит к их заметному сужению.

Ещё одним обстоятельством, которое необходимо иметь в виду при разделении белков, является разница в конфигурации и жёсткости между различными белковыми молекулами. Плотные глобулярные белки, неспособные к агрегации и диссоциации на субъединицы, попадая в гель, ведут себя более или менее сходным образом. Рыхлые глобулярные белки при взаимодействии с волокнами геля способны заметно деформироваться, облегчая себе миграцию в геле. Поэтому для определения массы белков по их электрофоретической подвижности, белковые молекулы искусственно распрямляются (а, следовательно, денатурируют) и им придаётся дополнительная жесткость за счёт добавления в раствор додецилсульфата натрия. Для предотвращения агрегации и осаждения белковых молекул, а также во избежание появления димеров, тримеров и т.п. комплексов, образующихся за счёт

водородных связей между молекулами белка, в раствор часто добавляют мочевины в концентрации 4-8 М. Нередко, для предотвращения окисления и образования дисульфидных мостиков, в пробу добавляют β -меркаптоэтанол в концентрации 1-5%. Более энергичное воздействие на белок, путём нагрева до 90-100°C в присутствии не только β -меркаптоэтанола, но и ДДС-Na, приводит к разрыву нативных S-S связей и разделению белковых субъединиц.

Непрерывные буферные системы.

При проведении разделения белков одновременно по размерам и заряду очень часто в качестве электродного буфера и буфера для полимеризации геля используется один и тот же буфер. В этом случае говорят, что используется непрерывная буферная система. Оптимизация эксперимента в этих условиях ведётся подбором концентрации геля T (параметр C чаще всего выбирают равным 2.67%); выбором рабочего буфера; напряжённости электрического поля в геле и времени электрофореза; подбором количества образца в пробе, её объёмом и способом предварительной обработки.

При выборе рабочего буфера необходимо, прежде всего, выбрать его рН. Для эффективного разделения белков в электрическом поле, рН выбранного буфера должен, с одной стороны, обеспечивать ощутимый заряд белковых молекул в пробе, а с другой – ощутимую разницу в зарядах различных белков. Наилучшего разделения удаётся добиться при рН буфера, близкой к изоэлектрической точке белков, однако, при этом разделение проходит медленно, и на эксперимент требуется много времени. С другой стороны, если рН буфера не слишком близок к изоэлектрическим точкам белков в пробе, то белки мигрируют быстрее, однако их полосы хуже разделяются. Поэтому при выборе рН буфера всегда приходится искать компромисс между качеством разделения и

временем эксперимента. По этой причине, в большинстве случаев, оптимальным является значение рН, которое на 3-4 единицы отличается от среднего значения pI для белков в пробе. Для кислых белков часто используют рН 8.9, тогда как для щелочных подходит рН около 4.5.

В качестве щелочных буферов для кислых белков используют буферы на основе “Трис” – это краткое название соединения трис-(оксиметил)-аминометан (trishydroxymethylaminomethane, или 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол – $C_4H_{11}NO_3$). Оно представляет собой молекулу метана, в которой три атома водорода замещены на три остатка метанола ($-CH_2OH$), а четвёртый – на амино ($-NH_2$) группу: $NH_2C(CH_2OH)_3$. В растворе трис принимает протонированную форму и имеет $pK_a \sim 8.1$, что позволяет его использовать для приготовления слабощелочных буферов, со значениями рН близкими к физиологическим, что особенно удобно для биологических макромолекул. При разделении кислых белков наиболее распространены буферные системы на основе Трис-НСl, Трис-глицина и Трис-борная кислота (трис-боратный буфер). Для электрофореза щелочных белков подходит буфер Трис-уксусная кислота (трис-ацетатный буфер) или просто 0.9 М (5.7%) уксусная кислота. В последнем случае важно убедиться, что белок выдерживает присутствие в растворе уксусной кислоты. Миграция белков в этом случае происходит катоду, т.к. в этих условиях они несут на себе положительный заряд.

Разделение белков в присутствии мочевины.

Как уже упоминалось выше, для предотвращения агрегации белков электрофорез можно проводить в присутствии мочевины в концентрации от 2 до 8 М. Классической является методика разделения по методу Чокли (Chalkley) [26], применённая в 1969 г для разделения

гистонов. Уже в первые годы после опубликования, индекс цитирования этой работы превысил 1500, и она по сей день является одной из самых цитируемых в мире работ. Согласно первоначальной методике электрофорез проводился в ПААГ с концентрацией 15.1% *T* и 0.66% *C* с добавлением мочевины в концентрации 2.5 М, которая была оптимизированная для разделения 5-ти основных гистонов. В качестве электродного буфера использовалась 0.9 М уксусная кислота. Перед нанесением проб, гель подвергали преэлектрофорезу в течение 1 часа, для того чтобы удалить остатки ПСА, различные ионы и добиться однородности буферной системы. Проведение преэлектрофореза позволяет также избавиться от свободных радикалов, которые могли остаться после полимеризации акриламида. В качестве альтернативы, можно предложить проводить предварительный электрофорез в режиме стабилизации по напряжению при повышенном напряжении (например, 180 В) до тех пор, пока сила тока не перестанет изменяться и не установится на некотором уровне. Обычно, на это требуется 3-5 часов. Можно, напротив, проводить предварительный электрофорез при невысоком напряжении в течение ночи. При использовании мочевины в разделении других белков, её концентрация может быть иной. Мочевина должна присутствовать как в наносимой в гель пробе, так и в самом геле. Щелочные буферы с добавлением мочевины не должны храниться, и поэтому готовятся непосредственно перед использованием. Будучи незаряженной, мочевина не мигрирует в электрическом поле, а потому добавлять её в электродный буфер не нужно. Мочевина практически не влияет на электропроводность буфера, однако её присутствие в растворе может сильно изменить *pK* отдельных химических групп, а вместе с ними и заряд белка, и его конфигурацию. Как следствие, электрофоретическая подвижность молекул может сильно изменяться в присутствии мочевины.

В концентрированных растворах мочевины происходит денатурация белков, и полипептидные цепочки ведут себя как статистические клубки. При этом денатурация не всегда является полной, и очень часто бывает обратимой. Степень денатурации белка и её обратимость зависят от природы белка и концентрации мочевины.

Перед нанесением пробы в гель необходимо убедиться, что содержание солей в ней сведено к минимуму, например, путём диализа. Для улучшения разделения буфер в пробе должен иметь меньшую концентрацию, чем в окружающем геле приблизительно в 5-10 раз. Это будет способствовать концентрации пробы при входе в гель. Однако после разбавления пробы концентрация мочевины в ней должна быть такой же, как и в самом геле. Для утяжеления препарата в пробу добавляют раствор сахарозы или глицерина, что облегчает его нанесение на дно кармана. Кроме того, буфер для проб должен содержать лидирующий краситель. Если при фиксации геля краситель обесцвечивается, то необходимо сразу после окончания фореа пометить место его расположения (например, воткнув в гель тонкую проволочку). В первые 15 минут рекомендуется подавать напряжение пониженное примерно вдвое от рабочего. За это время, краситель должен успеть полностью войти в гель, после чего можно увеличить напряжение до номинального значения. Такая процедура несколько облегчает процесс концентрирования пробы. В качестве альтернативного способа можно использовать буфер для проб, вовсе не содержащий лидирующего красителя. Вместо этого можно наносить маркерный препарат на одну из свободных дорожек. В качестве такого маркера в кислом буфере можно использовать родамин.

Разделение белков в присутствии ДДС-Na.

Способ разделения белков, описанный выше, позволяет добиться неплохого разделения компонентов белковой смеси в качественном эксперименте. Однако он не даёт возможности получить количественные характеристики препарата. Это связано с тем, что электрофоретическая подвижность белков при этом зависит сразу от нескольких параметров, в частности от заряда белка, от его молекулярной массы, от конфигурации полипептидной цепи. Вклад каждого из этих факторов неизвестен, а потому для строго количественного исследования необходимо проводить эксперимент таким образом, чтобы иметь возможность исключить влияние всех факторов, кроме одного.

Такого результата удаётся добиться при использовании додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Разделение белков при этом проходит в соответствии с их молекулярными массами. Для этого белки обрабатывают избытком ДДС-Na. За счёт гидрофобных взаимодействий детергент связывается с белком, причём для большинства белков справедливо соотношение 1.4 мг ДДС-Na на 1 мг белка [11]. Поскольку молекула ДДС-Na содержит отрицательно заряженный остаток серной кислоты, то и вся молекула белка, после связывания с детергентом, приобретает избыточный отрицательный заряд, по сравнению с которым, собственный заряд белка уже, как правило, не имеет существенного значения (это справедливо даже для таких положительно заряженных белков, как гистоны). Как следствие, практически для любого белка в пробе соотношение заряда к массе оказывается постоянным. Помимо этого, электростатическое отталкивание плотно расположенных отрицательных групп ДДС-Na приводит к распрямлению полипептидной цепи, и белковая молекула приобретает форму достаточно жёсткого эллипсоида вращения. Его малая ось имеет размер порядка 1.6 нм, а длина большой линейно связана с количеством

аминокислотных остатков, т.е. с молекулярной массой белка. Конечно, это справедливо только для линейных полипептидов, лишённых дисульфидных мостиков. По этой причине при подготовке препарата необходимо добиться полной денатурации белка в нём. С этой целью пробу кипятят в присутствии ДДС-На и β -меркаптоэтанола.

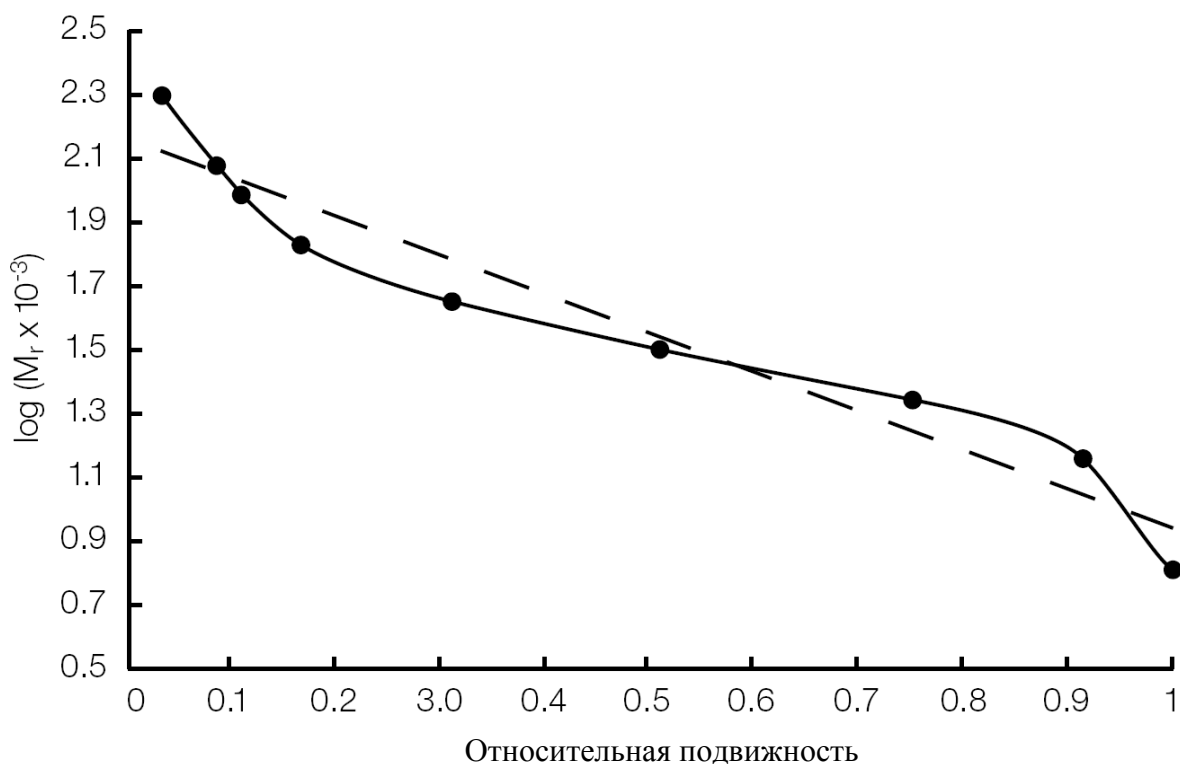


Рисунок 5. Калибровочная кривая для оценки молекулярной массы (M_r). Для построения кривой использовался маркер с набором фракций с молекулярными массами M_r 00, 116.2, 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4, и 6.5 кДа (точки слева направо). Разделение проводилось в 15% ПААГ в присутствии ДДС-На. На рисунке показан нелинейный характер зависимости. Тем не менее, в средней части зависимости можно выделить линейный участок, которому соответствует диапазон наиболее точного определения молекулярных масс. В силу логарифмичности масштаба отклонение графика от линейной зависимости не столь существенно, и в большинстве случаев может быть аппроксимировано пунктирной линией.

При выполнении перечисленных выше условий, электрофоретическая подвижность белков (U) в ПААГ в присутствии ДДС-На оказывается пропорциональной логарифму молекулярной массы белка (M_r):

$$U = A - B \lg M_r \quad (1)$$

Коэффициенты A и B зависят от условий эксперимента, в том числе, от пористости геля и температуры. В большинстве случаев оказывается удобным сравнивать относительные подвижности белков, рассчитанные относительно подвижности лидирующего красителя. Зависимость этой величины от молекулярной массы белка также оказывается приблизительно линейной. Более строгий эксперимент выявляет отклонение от линейной зависимости (*рисунок 5*), однако в большинстве случаев линейная аппроксимация даёт удовлетворительные результаты.

Вместо того, чтобы вычислять значения коэффициентов в уравнении (1) в каждом эксперименте, удобнее пользоваться маркерными пробами, подобно тому как это делается при электрофорезе НК (*рисунок 6*). В этом случае можно сравнить относительную подвижность для маркерных белков, молекулярная масса которых точно известна, построить калибровочный график и по нему оценить молекулярную массу исследуемого белка. Следует отметить, что подобные калибровочные графики необходимо строить свои для каждого геля, т.к. условия электрофореза и сами гели в каждом эксперименте разные. Кроме того, при всей своей простоте и надёжности, метод определения молекулярных масс по электрофорезу а ПААГ может дать осечку. Это связано с тем, что для некоторых белков количество связанного ДДС-На может существенно отличаться от 1.4 мг детергента на 1 мг белка. Однако, несмотря на то, что подобные

случаи описаны в литературе, они встречаются крайне редко, а потому электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-На является самым распространённым на сегодняшний день методом разделения белков в денатурирующих гелях.

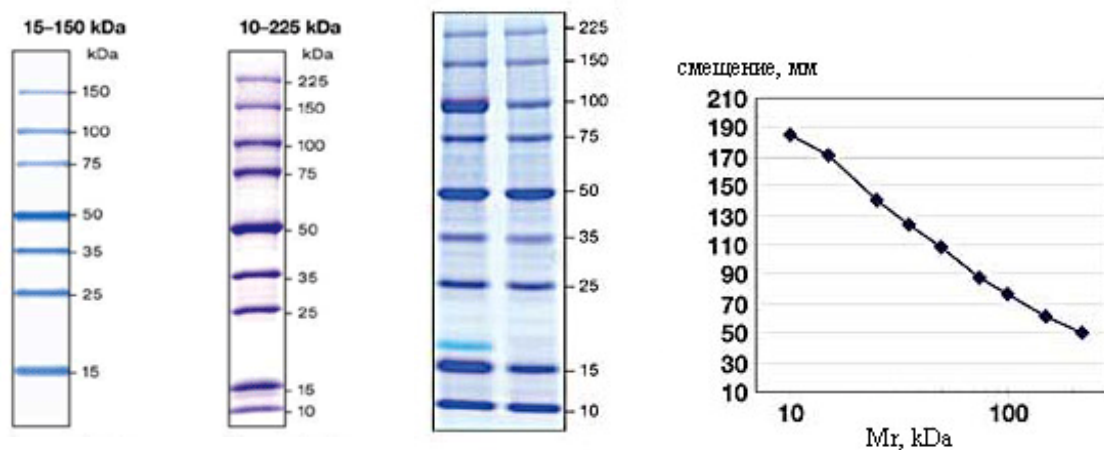


Рисунок 6. Маркерные белки при разделении в 15% ПААГ в присутствии ДДС-На (*слева*); маркерные пробы, нанесённые на одну дорожку с исследуемым образцом и тот же маркер отдельно (*в центре*); зависимость смещения пробы в геле от логарифма её молекулярной массы (*справа*).

При заданной концентрации геля линейная зависимость электрофоретической подвижности от логарифма молекулярной массы будет иметь место только в определённом интервале молекулярных масс. Для больших молекул будет наблюдаться отклонение, связанное с тем, что с увеличением размеров им будет всё труднее проходить в поры геля, пока, наконец, слишком крупные белковые молекулы не смогут войти в гель вовсе. Напротив, для небольших молекул, подвижность в геле будет определяться в основном соотношением заряда и массы молекулы, которое в присутствии ДДС-На практически одинаково для всех белков.

При проведении электрофореза в непрерывной буферной системе в присутствии ДДС-На выбор буфера не является критичным параметром, поскольку заряды белковых молекул определяются

связанным с ними ДДС-На. В настоящее время наиболее распространённой разновидностью электрофореза в присутствии ДДС-На является электрофорез по методике Лэммли, который проводится в ступенчатой системе и будет описан ниже. И в том, и в другом случае необходимо добавлять ДДС-На не только в гель и буфер для проб, но и в электродный буфер, поскольку в ходе электрофореза молекулы белка могут утратить свою отрицательно заряженную оболочку.

Электрофорез в присутствии ДДС-На не рекомендуется проводить на холоду, так как ДДС-На с понижением температуры быстро выпадает в осадок. Для определения молекулярных масс небольших белков (до 12000 Да) рекомендуется добавлять в гель мочевины и увеличивать количество шивок в геле. В противном случае определение их молекулярной массы может быть ненадёжным. Разделение также можно улучшить, если наносить небольшие количества белков (1-5 мкг) и увеличивать длину геля, так чтобы расстояния миграции проб были порядка 15 см.

Ступенчатые буферные системы.

Характерной особенностью ступенчатого электрофореза является полимеризация в одной системе сразу двух гелей: разделяющего, мелкопористого, и непосредственно над ним – концентрирующего, крупнопористого. Помимо этого, два геля сильно отличаются по рН и молярности буферов, в которых они полимеризуются. Такое резкое (ступенчатое) изменение свойств геля и дало название всей системе – ступенчатый электрофорез. По-английски его сокращенно называют «disc-electrophoresis» (от слова «discontinuous» – прерывистый).

Пористость, длина и выбор буфера для нижнего (разделяющего) геля определяются аналогично тому, как это делалось для непрерывного электрофореза. Однако здесь стоит отметить одну особенность: в составе рабочего буфера обязательно использовать быстроподвижные

ионы, мигрирующие в том же направлении, что и белки. Это могут быть, например, ионы Cl^- для щелочных буферов или ионы K^+ – для кислых, чего. обычно стараются избегать, т.к. присутствие таких ионов приводит к ограничению напряженности поля и скорости миграции белков. Однако в данном случае их использование необходимо.

Концентрирующий гель обычно делают небольшим по протяженности (1—3 см). Как следует из названия, его функция состоит в концентрации всех белков в смеси, которую представляет собой проба, в одну узкую полоску, толщина которой может составлять сотые доли миллиметра независимо от первоначального объема препарата. Это способствует значительному повышению эффективности разделения при последующей миграции этой узкой зоны в разделяющем геле. Поскольку в концентрирующем геле белки разделяться не должны, его концентрацию стараются сделать минимальной ($T = 2.5—3$). Концентрирующий гель полимеризуют обычно в таком же по составу буфере, что и разделяющий гель (следовательно, он тоже содержит быстроподвижные ионы), однако концентрации и рН этих буферов различны. Буфер концентрирующего геля обычно близок к нейтральному, тогда как буфер разделяющего геля – щелочной или кислый.

Важную роль в ступенчатом электрофорезе играет выбор электродного буфера, находящегося в контакте с белковым препаратом и концентрирующим гелем. В этом буфере подвижность иона, мигрирующего в том же направлении, что и белок, должна сильно зависеть от рН. Для этого удобно использовать цвиттерионы, например простые аминокислоты (глицин и β -аланин). Их изоэлектрические точки лежат в нейтральной области рН (для глицина $pI = 5.97$). При этом диссоциации карбоксила с потерей протона и появлением отрицательного заряда соответствует $pK_{\text{COOH}}=2.34$, а ионизации концевой аминогруппы с присоединением протона и образованием

положительного заряда – $K_{\text{NH}_2}=9.6$. При рН 5.97 все молекулы глицина ионизированы по обоим концам и их суммарный заряд равен нулю.

При сдвиге рН окружающей среды в щелочную сторону происходит нейтрализация *части* молекул глицина по аминогруппе, в то время как карбоксильные остатки всех молекул сохраняют свой отрицательный заряд. Этот процесс носит статистический характер, и для каждой отдельной молекулы можно говорить только о большей или меньшей вероятности ионизации, однако в растворе в целом, при данном рН заряд будет нести вполне определенная доля молекул. При незначительном сдвиге рН от изоэлектрической точки, например при рН 6.8, эта доля будет очень мала. При $\text{pH} = \text{p}K_{\text{NH}_2}$ (9.6), согласно определению $\text{p}K$, уже половина всех молекул должна быть нейтрализована по аминогруппе и, следовательно, заряжена отрицательно. Для фигурирующих ниже значений рН 8.3 и 8.9 количество отрицательных ионов глицина будет меньше 50%, но все-таки значительным. В ступенчатом электрофорезе для верхнего и нижнего гелей используют разные буферы, содержащие, однако, в своем составе одно и то же слабое основание или слабую кислоту. В щелочной буферной системе, где удобно фракционировать кислые белки, это может быть Трис, а в кислой системе для разделения гистонов – уксусная кислота.

Мочевину, детергенты (ДДС-Na, Тритон X-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. Поэтому ступенчатый электрофорез может применяться как при нативном разделении белков, так и в денатурирующих условиях, например, с применением мочевины или ДДС-Na. Наиболее распространённым примером последней, как уже упоминалось, является методика,

разработанная Леммли [27]. Рассмотрим подробнее процессы, происходящие в ступенчатой буферной системе [11].

В качестве электродного буфера в системе Леммли выбран Трис-глициновый буфер низкой концентрации (0.025 М Трис / 0.192 М глицин) с рН 8.3. Глицин по отношению к Трису выступает в роли слабой кислоты. При рН 8.3 значительная доля его молекул должна быть заряжена отрицательно, что обеспечивает хорошую электропроводность электродного буфера.

Концентрирующий гель в такой системе имеет концентрацию 3% *T*, разделяющий – 10% *T*. Для обоих гелей количество сшивок было выбрано как 2.6% *C*. В качестве буфера для разделяющего геля, используется 0.375 М Трис-НСl (рН 8.8), а полимеризации концентрирующего геля ведётся в 0.125 М Трис-НСl (рН 6.8). Высокая концентрация буфера в разделяющем геле, необходимая по двум причинам. Во-первых, при рН 8.9 буферная емкость Трис-НСl уже мала, а в этом буфере должны мигрировать сконцентрированные белковые полосы. Во-вторых, относительное содержание ионов Cl^- при таком значении рН невелико, и для обеспечения необходимой электропроводности концентрацию буфера приходится увеличивать.

В первый момент после включения тока напряженность поля будет примерно одинаковой во всех ступенях системы и начнется переход белков из буфера для проб в концентрирующий гель. В это же время, ионы Cl^- будут быстро уходить из верхней части концентрирующего геля в направлении разделяющего геля, а на их место из электродного буфера будут поступать ионы глицина. Но здесь они окажутся в буфере с рН 6.8. При этом большинство молекул глицина восстановит заряд своих аминогрупп, нейтрализуется и перестанет участвовать в проведении тока. Сопротивление буфера для проб, а за ним и верхней части формирующего геля резко возрастет. Вместе с ним возрастет и напряженность поля. Немногочисленные при

pH 6.8 заряженные молекулы глицина ускорят свое движение к аноду, обеспечивая непрерывность электрического тока по всему гелю. Состояние диссоциации-ассоциации аминокислот – это статистическое равновесие, захватывающее все молекулы глицина 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.

Оказавшиеся в верхней части концентрирующего геля белки под действием электрического поля повышенной напряженности начинают мигрировать относительно быстро. Так же быстро идет переход белков из буфера для проб в концентрирующий гель. Постепенно подобная ситуация складывается во всем концентрирующем геле. Ионы хлора, отступая, очищают весь объем этого геля. Вплотную за ними к границе с разделяющим гелем подходит глицин. Теперь весь концентрирующий гель находится в зоне повышенной напряженности поля, где относительно быстро мигрируют белки пробы. Никакого их концентрирования пока не происходит; оно начнется лишь тогда, когда впереди идущие молекулы белка достигнут границы нижнего геля. Тем временем линия раздела ионов хлора и глицина уйдет уже в концентрирующий 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 Трис. При этом pH большая часть нейтральных молекул глицина снова превращается в ионы. Электропроводность Трис-глицинового буфера в верхней части концентрирующего геля оказывается столь же высокой, как и Трис-HCl (этого добились подбором pH 8.9 и концентрации всех компонентов системы). Напряженность электрического поля в нижнем геле соответственно остается низкой, и это обстоятельство играет решающую роль в концентрировании белков.

Впереди идущие молекулы белков достигают границы раздела и переходят в разделяющий гель, где попадают в область низкой напряженности поля. Скорость их миграции резко падает. Между тем следующие за ними молекулы белка еще движутся в объеме концентрирующего геля, т. е. в области высокой напряженности поля, и движутся быстро. Потом и они входят в нижний гель и почти останавливаются. Эта картина напоминает ситуацию, когда вереница автомобилей, быстро движущихся по шоссе, концентрируется перед постом ДПС на въезде в город, где скорость их движения падает в несколько раз. Аналогично и находившиеся далеко сзади молекулы белка догоняют (почти догоняют) ушедшие вперед молекулы. Весь исходный препарат, каков бы ни был его начальный объем, в самом верху разделяющего 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 разделяющий гель оказывается в Трис-глициновом буфере примерно с тем же рН. То обстоятельство, что фракционирование белков начинается с узкой исходной зоны, дает колоссальный выигрыш – разрешающая способность системы в целом резко увеличивается.

Аналогичную картину ступенчатого электрофореза легко представить себе и для кислого буфера разделяющего геля. В качестве слабой кислоты можно использовать уксусную, а в качестве быстро мигрирующего иона – K^+ . В качестве цвиттериона, поставляющего медленно мигрирующие ионы, берут β -аланин. Подбор количественного соответствия концентраций и рН дает следующую пропись для построения системы [11]. Для получения буфера разделяющего геля 4.3%-ный водный раствор уксусной кислоты титруют КОН до рН 4.3. Буфер концентрирующего геля готовят аналогичным титрованием

0.35%-ного раствора уксусной кислоты до рН 5.8. Электродный буфер получают из 0.035 М водного раствора β-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 разделяющего геля во время фракционирования в нем белков оказывается несколько иным, чем первоначальный (примерно на 0.5 выше в случае использования щелочного буфера и на столько же ниже – для кислого).

Ступенчатый электрофорез по методике Лэммли можно использовать в сочетании с градиентом пористости разделяющего геля, что еще более повышает разрешающую способность метода. В случае угрозы агрегации, например при фракционировании кислых белков хроматина, в оба геля системы Лэммли можно ввести мочевины. Особенно совершенной оказалась двумерная система фракционирования белков и пептидов, в которой в первом направлении используется изоэлектрическое фокусирование, а во втором направлении также использована методика Лэммли в сочетании с градиентом пористости ПААГ.

Таблица I. Диапазон эффективного разделения белков в ДДС-Na-ПААГ в зависимости от концентрации геля.

Разделяющий Гель, %Т	примерный диапазон молекулярных масс (Да)
7.5%	45 000 – 200 000
10%	25 000 – 200 000
12%	14 400 – 120 000
15%	6 500 – 100 000
Градиент %Т	
4–15%	20 000 – 200 000
4–20%	6 500 – 200 000
10–20%	6 500 – 120 000

Разделение в градиентах пористости и рН.

Ещё одним способом эффективного сужения полос при электрофорезе является проведение разделения в геле с монотонно уменьшающимся размером пор. О такой системе говорят, что в ней создан градиент пористости, или градиент концентрации, т.к. в случае ПААГ концентрация мономеров в геле связана с его пористостью. Преимуществом такого подхода является не только возможность получения достаточно узких полос, но и стационарный характер разделения. Иными словами, по истечении некоторого времени картина распределения белковых полос в геле перестаёт изменяться и остаётся постоянной вплоть до окончания эксперимента.

Такое поведение разделяемых молекул в геле с градиентом пористости обусловлено следующими обстоятельствами. Продвигаясь в геле под действием электрического поля, молекулы постепенно попадают в области со всё меньшим размером пор. Постепенно, размер пор становится настолько мал, что дальнейшее движение молекулы оказывается невозможным, она останавливается и остаётся в таком положении, пока на неё действует электрическое поле. Таким образом, при движении пробы в геле из неё будут постепенно отфильтровываться и “застрывать” в геле сначала самые крупные молекулы, потом те, что поменьше, и так далее до самых маленьких молекул (при условии, что градиент пористости позволяет создать достаточно маленькие поры).

Такой подход позволяет также получить достаточно узкие полосы, поскольку на молекулы, идущие впереди действует сила сопротивления со стороны геля немного бóльшая, чем на молекулы, мигрирующие позади. Это означает, что, по аналогии с описанным выше механизмом, задний фронт пробы будет постоянно приближаться к переднему фронту, сужая тем самым белковую полосу. Соответственно, отпадает необходимость в предварительной

концентрации пробы и всё разделение можно проводить в непрерывной буферной системе.

Этот метод работает как при проведении разделения нативных условиях, так и в денатурирующих гелях, например, в присутствии ДДС-Na. При этом разделение белков в геле проходит по их размерам, которые можно оценить, зная профиль градиента пористости геля.

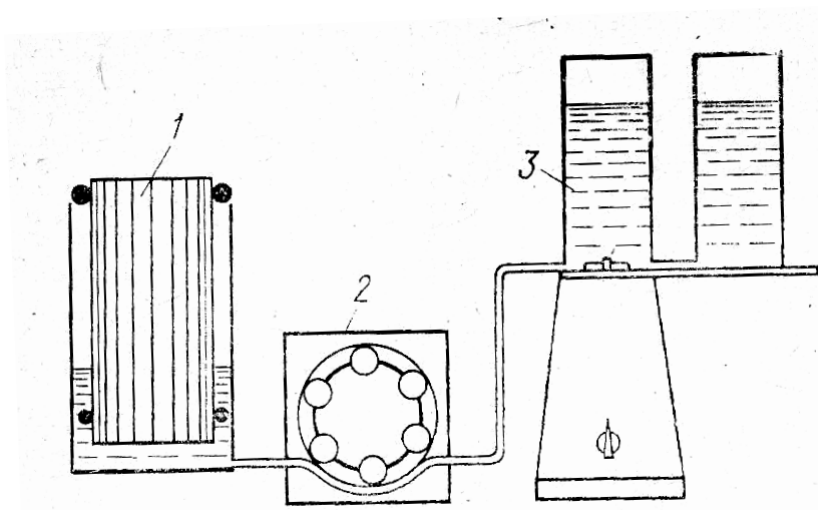


Рисунок 7. Устройство для формирования градиента концентрации.

1 – ёмкость, в которой происходит формирование градиента; 2 – перистальтический насос; 3 – система сообщающихся сосудов (левый сосуд стоит на магнитной мешалке), выполняющая роль смесителя градиентов.

Ещё одним примером эффективного стационарного разделения белков является изоэлектрическое фокусирование. В этом случае в геле создаётся градиент рН. Мигрируя в таких условиях, белки постепенно перемещаются в области с бóльшим (или меньшим) значением рН. Это приводит к тому, что постепенно меняется суммарный заряд молекул за счёт того, что часть химических групп в новых условиях способна ионизироваться или деионизироваться. Так будет происходить до тех пор, пока молекула не окажется в условиях, когда рН геля совпадёт с её изоэлектрической точкой. В этот момент количество положительных зарядов в молекуле станет равно числу отрицательных зарядов, результирующая сила, действующая со стороны электрического поля,

станет равной нулю, и молекула остановится. Таким образом, молекулы, имеющие одну изоэлектрическую точку, сконцентрируются в очень узкой зоне с соответствующим значением рН.

Простейшим устройством, позволяющим получать градиентные гели, является система двух сообщающихся сосудов (*рисунок 7*). В сосуды заливают растворы с концентрациями, соответствующими верхнему и нижнему пределам изменения концентрации в геле. Один из сосудов ставится на магнитную мешалку и к нему подключается перистальтический насос. После того, как кран, разделяющий два сосуда, открывают, раствор с большей концентрацией начинает медленно поступать в сосуд с раствором меньшей концентрации (или наоборот). В результате непрерывного интенсивного перемешивания, концентрация раствора во втором сосуде начинает постепенно возрастать от начального значения (когда содержание более концентрированного раствора в нём ещё мало) до конечного, соответствующего концентрации в первом сосуде (за счёт постепенного уменьшения объёма растворов в обоих сосудах и роста концентрации раствора во втором). При этом перистальтический насос, равномерно откачивая смесь из второго сосуда, будет переносить раствор в объём, где и будет формироваться градиент концентрации.

Заливка геля.

На *рисунке 8* представлены основные элементы установки для проведения вертикального электрофореза в ПААГ. Схематично, установку можно представить как ёмкость для электродного буфера, которая разделена гелем на два отсека (анодный и катодный). Электрически два отсека связаны лишь гелем, поэтому весь электрический ток, проходящий между катодом и анодом, протекает через пластинку геля. При необходимости сменить полярность

электродов, необходимо поменять подключение токоподводящих проводов к блоку питания.

В каждый электродный отсек заливается проводящий буфер (электродный), в котором и проводится электрофорез. При заполнении объёма внутреннего электродного отсека важно, чтобы уровень буфера был выше внутреннего стекла сэндвича и попадал в карманы геля, но при этом буфер не должен переливаться через наружное стекло во внешний электродный отсек. При этом сам гель должен быть залит предварительно, вне камеры. При заливке геля, необходимо учитывать особенности процесса полимеризации, описанные выше. Чаще всего, к ошибкам приводит несоблюдение пропорций катализатора и инициатора реакции полимеризации (ТЕМЕД и ПСА), недостаточная дегазация растворов перед полимеризацией, несоблюдение температурного режима или некачественные реактивы.

Гель для вертикального электрофореза формируется в пространстве между стёклами, разделёнными спейсерами, выбранной толщины. Гель вместе с двумя стеклянными обкладками часто называют сэндвичем. Толщина спейсеров определяет толщину получаемого геля. Чем толще гель, тем больший объём пробы можно нанести на одну дорожку заданной ширины. В более толстом слое геля также легче заметить слабо прокрашенные белковые полосы; таким гелем несколько удобнее манипулировать, т.к. он механически более прочный, чем тонкий гель. Однако, тонкие гели быстрее фиксируются и в них заметно легче происходит отмыв от избытка ДДС-Na, препятствующего связыванию красителя с белком, а после окрашивания такими красителями как Кумасси, в тонких гелях гораздо быстрее отмывается не связавшийся краситель. Кроме того, при работе с тонкими гелями расходуется заметно меньше материала. Сейчас производятся стёкла со стандартными спейсерами толщиной от долей миллиметра до нескольких миллиметров.

Объём кармана в геле также зависит от ширины самого кармана. Это определяется общим количеством карманов в геле, т.е. выбором гребёнки (толщина гребёнки должна в точности соответствовать толщине спейсеров между стёклами). При заливке геля следует избегать прямого контакта гребёнки с неразбавленным ТЕМЕД-ом, т.к. это может вызвать её повреждение. Перед началом приготовления геля, необходимо убедиться, что используемые стёкла и гребёнки хорошо вымыты и высушены. Перед тем как зафиксировать стёкла в штативе для полимеризации необходимо убедиться, что нижние края обоих стёкол установлены на одном уровне и не образуют ступеньку.

Заливка геля в ступенчатой буферной системе.

1. Вставьте гребёнку до упора в пространство между стёклами, закреплёнными в штативе для полимеризации. На расстоянии примерно 1 см от нижнего края гребёнки сделайте отметку на наружном стекле, которая будет указывать уровень заливки нижнего геля, и выньте назад гребёнку.
2. Приготовьте раствор мономеров для разделяющего геля, не добавляя в него ТЕМЕД и ПСА. Проведите дегазацию под вакуумом в течение 15 минут. Не рекомендуется пользоваться слабыми водоструйными насосами.
3. После окончания дегазации, добавьте в раствор мономеров ТЕМЕД и ПСА, аккуратно размешайте и плавно залейте его в пространство между стёклами до отметки. Старайтесь не создавать пузырьков в растворе.
4. Сразу же после заливки раствора, аккуратно нанесите поверх раствора дистиллированную воду, стараясь не перемешивать её с раствором мономера. Не используйте изобутанол!

5. Оставьте гель на 45-60 минут для полимеризации. После полимеризации гель можно оставить на ночь при комнатной температуре, предварительно залив сверху однократным рабочим буфером.
6. Приготовьте раствор мономеров для концентрирующего геля, не добавляя в него ТЕМЕД и ПСА. Проведите дегазацию под вакуумом в течение 15 минут.
7. Перед тем, как заливать гель, аккуратно осушите пространство между стёклами над разделяющим гелем при помощи фильтровальной бумаги. Делайте это, не касаясь поверхности геля.
8. После окончания дегазации, добавьте в раствор мономеров ТЕМЕД и ПСА, аккуратно размешайте и плавно залейте его в пространство между стёклами до верхнего края покровного стекла.
9. Вставьте гребёнку между спейсерами, плавно вдвигая её от верхнего края стекла. Вставить гребёнку будет проще, если делать это под небольшим наклоном: сначала вставить крайнюю дорожку, затем соседнюю и т.д. В итоге гребёнка должна быть жёстко зафиксирована у верхнего края покровного стекла.
10. Оставьте гель на 30-45 минут для полимеризации.
11. Аккуратно извлеките из геля гребёнку и хорошенько промойте карманы дистиллированной водой или электродным буфером.
12. Сполосните штатив и гребёнку дистиллированной водой.

Для заливки геля с непрерывной буферной системой проделайте операции, описанные в п.п. 6, 8–12. После сборки электродного блока, его установки в камеру и заливки электродных отсеков буфером можно приступать к нанесению проб.

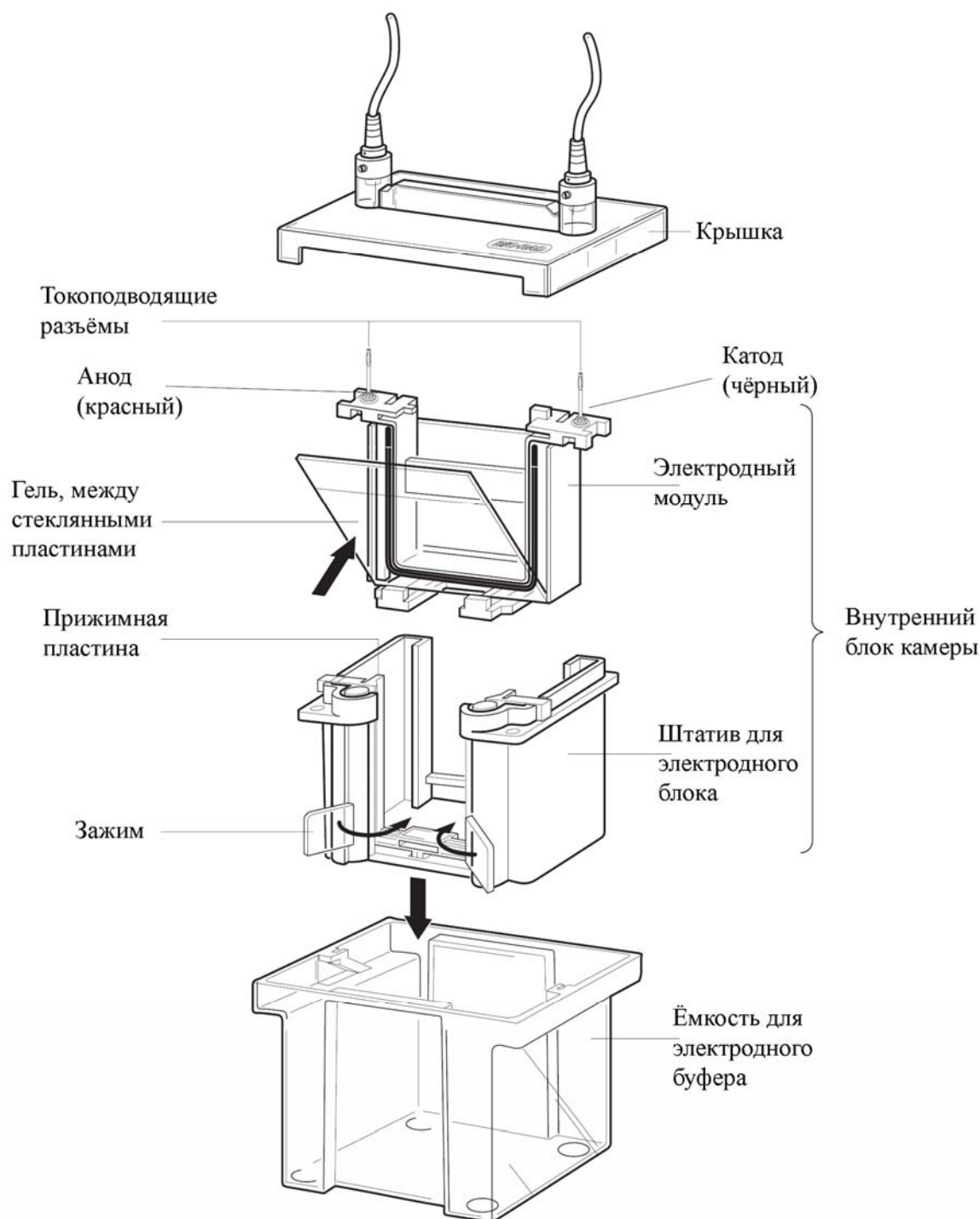


Рисунок 8. Основные элементы установки для проведения вертикального электрофореза в ПААГ. Один электродный отсек формируется внутри электродного модуля в пространстве между двумя “сэндвичами гелей”. Вторым электродным отсеком служит пространство между электродным модулем и стенками резервуара, которое также заполняется электродным буфером.

Подготовка и нанесение проб.

При подготовке белковых проб для электрофореза в ПААГ должны учитываться все те же аспекты, что и при подготовке проб для фореза в агарозном геле. Выбор рН, ионного состава и концентрации буфера для проб определяется тем, в каких условиях проводится электрофорез, иными словами связан с составом рабочего буфера. Так при использовании непрерывной буферной системы можно использовать рабочий буфер, разбавленный в несколько раз, с целью концентрации пробы на входе в гель, о чём говорилось выше. Среди прочих факторов, отметим следующие.

Во-первых, необходимо предусмотреть способ оценки скорости миграции образца в геле. Сами по себе растворы белков не поглощают видимый свет, а потому их миграция остаётся невидимой для глаза. Наиболее простой способ обойти эту сложность состоит в том, чтобы ввести в состав пробы лидирующий краситель. Такой краситель должен мигрировать в геле в том же направлении, что и проба; обладать известной (относительной) электрофоретической подвижностью в данных условиях; не взаимодействовать с исследуемыми веществами в составе пробы. При выполнении этих условий подвижность исследуемого белка можно характеризовать в относительных единицах, сравнивая с подвижностью лидирующего красителя. Чаще всего используют отношение расстояний пройденных красителем и белком. Наиболее популярным лидирующим красителем при разделении кислых белков, а также при разделении белков в присутствии ДДС-Na, является краситель бромфеноловый синий (*рисунок 9*). Иногда также используется ксиленцианол, молекула которого обладает вдвое меньшей электрофоретической подвижностью в сравнении с молекулой бромфенолового синего. В качестве лидирующего красителя при разделении в кислой среде, когда белки несут положительный заряд, могут использоваться метиловый зелёный или пиронин.

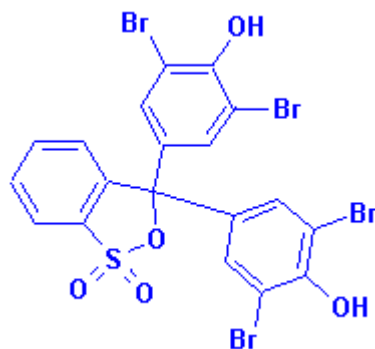


Рисунок 9. Структурная формула красителя бромфенолового синего.

Второй аспект, который нужно предусмотреть при подготовке пробы, это необходимость её нанесения в карманы геля, заполненные электродным буфером. Для того, чтобы проба компактно легла на дно кармана, её необходимо утяжелить. С этой целью в состав буфера для проб вводят глицерин или сахарозу, в концентрации достаточной для того, чтобы плотность раствора пробы была выше плотности электродного буфера.

Концентрация образца в пробе определяется в основном чувствительностью метода, используемого для окраски белковых полос по окончании разделения. Однако при прочих равных условиях рекомендуется наносить по возможности меньший объём пробы на одну дорожку, т.к. чем уже будет белковая полоса, тем лучше будет разрешение в опыте. Это замечание в меньшей степени относится к ступенчатым буферным системам, таким как в методике Лэммли, где принимаются дополнительные меры для сужения белковых зон в геле. Однако, чрезмерное повышение концентрации белка в пробе, для многих белков, чревато агрегацией. С этим связано несколько особенностей подготовки белковых проб, по сравнению с ДНК.

Для предотвращения агрегации белков в пробу можно добавить мочевины в концентрации 4–8 М. Как уже упоминалось выше, нарушая структуру водородных связей в растворе, мочевины предотвращает

агрегацию белков. Добавлять мочевины в раствор следует непосредственно перед его использованием, так как при хранении она подвержена разложению. Обстоятельством, ограничивающим применение мочевины, служит тот факт, что её присутствие может привести к денатурации белка, потерей его вторичной и третичной структуры. В качестве альтернативы, можно использовать Тритон X-100, добавление которого улучшает растворимость белковых препаратов, но не приводит к их денатурации. Этот детергент можно добавлять как в саму пробу, так и в гель (в концентрации 0.1%).

При проведении электрофореза в денатурирующих условиях в присутствии ДДС-Na, важным условием является полная денатурация белка, в противном случае электрофоретическая подвижность белка в геле не будет связана линейным соотношением с логарифмом его молекулярной массы. Основным препятствием при разворачивании белковой молекулы после связывания ДДС-Na являются дисульфидные мостики. Поэтому рекомендуется добавить в пробу β -меркаптоэтанол в концентрации 1-5%, после чего нагревают её в присутствии ДДС-Na на кипящей водяной бане в течение 1.5-2 минут.

Если исходный белковый препарат имеется в виде осадка, то его следует сначала растворить в буфере, а потом уже добавлять ДДС-Na из концентрированного раствора. В противном случае на поверхности осадка комплекс белок – ДДС-Na может образовать корку, препятствующую его полному растворению. Имеются данные о том, что результаты электрофоретического разделения по методу Лэммли чувствительны к качеству ДДС-Na.

При нанесении проб рекомендуется наносить на несколько дорожек маркерные пробы. Маркером может являться любая молекула белка или полипептида известного размера. Однако удобно выбирать его таким образом, чтобы размер (электрофоретическая подвижность) маркерной пробы была близка к размеру (подвижности) исследуемого

образца. При подготовке маркерных проб важно соблюдать в точности те же условия приготовления, что были использованы при подготовке исследуемого образца. В противном случае разница в их электрофоретической подвижности может быть обусловлена, например, различной степенью денатурации. Сейчас производятся коммерческие препараты, содержащие набор фрагментов известной молекулярной массы (*рисунок 10*). Маркеры удобно наносить на несколько дорожек, например, по краям и в центр геля. Это делается не только для того, чтобы было удобнее оценивать подвижность проб на разных дорожках, но и для контроля идентичности условий в разных частях геля. Так же для контроля целесообразно оставлять хотя бы одну дорожку в геле пустой.

Перед нанесением проб рекомендуется промыть объём кармана электронным буфером, при помощи пипетки. Для этого нужно несколько раз энергично перемешать раствор, набирая и выпуская буфер из носика пипетки. Пробы необходимо наносить в пространство между стёклами, по возможности плавно, чтобы образец лёг на дно кармана тонким ровным слоем. Для нанесения проб можно пользоваться микролитровым шприцем Гамильтон, либо обычной автоматической пипеткой, используя оттянутый наконечник. Для удобства нанесения проб, некоторые установки снабжены специальными направляющими, позволяющими попасть в карман даже в том случае, когда гель практически не виден. При нанесении проб шприцем или пипеткой с оттянутым наконечником не следует погружать их глубоко в карман, чтобы не повредить его дно.

Фиксация и окрашивание.

После окончания электрофореза, необходимо, прежде всего, предотвратить диффузию разделившихся белковых зон в геле, которая

может привести не только к размыванию картины, но и к полному вымыванию образца из геля. Для этого гель помещают в фиксирующий раствор, представляющий собой плохой растворитель для белков, чаще всего это смесь спирта и уксусной кислоты. Находясь в фиксаторе, молекулы белка осаждаются на волокна геля, где и происходит их дальнейшее окрашивание. Вторая цель, которая преследуется при фиксации гелей, содержащих ДДС-Na – это отмыв белка от избытка детергента, который препятствует эффективному связыванию молекул красителя. По этой причине рекомендуется проводить фиксацию при небольшом покачивании, для лучшего перемешивания раствора, в течение 40-60 минут для тонких гелей, а толстые рекомендуется оставлять в фиксаторе на ночь. Перед тем как поместить гель в фиксатор, рекомендуется отметить положение первой или последней дорожки, например, отщепив один из нижних уголков геля (только нужно помнить который именно). В противном случае, отличить в нём начало от конца может быть весьма затруднительно, поскольку гель совершенно прозрачен и симметричен.

Для обнаружения белковых полос в геле чаще всего используют различные методы их окраски непосредственно в геле. При этом необходимо подобрать растворитель таким образом, чтобы не произошло перерастворения белка, выпавшего в осадок в процессе фиксации. По этой причине окраску проводят в кислой среде, чаще всего это растворы уксусной кислоты в концентрации не менее 10%. В этих условиях белки оказываются заряженными положительно за счёт остатков лизина, аргинина и гистидина. Потому для окраски белков, чаще всего, используются кислые красители, содержащие остатки сульфокислоты. Наиболее распространенным, на сегодняшний день, является краситель Кумасси бриллиантовый голубой (Coomassie Brilliant Blue, *рисунок 11*). Он связывается с положительно заряженными аминокислотными остатками, преимущественно с

аргинином. При связывании с белком максимум его полосы поглощения сдвигается с 495 нм (в свободном состоянии) до 565 нм (в связанном состоянии). Этот краситель плохо растворяется не только в воде, но и в разбавленной уксусной кислоте, поэтому лучше всего его растворять в фиксирующем растворе. При этом сначала проводят растворение красителя в спирте, а затем разбавляют уксусной кислотой. Рабочая концентрация красителя обычно составляет 0.05–0.25 %.

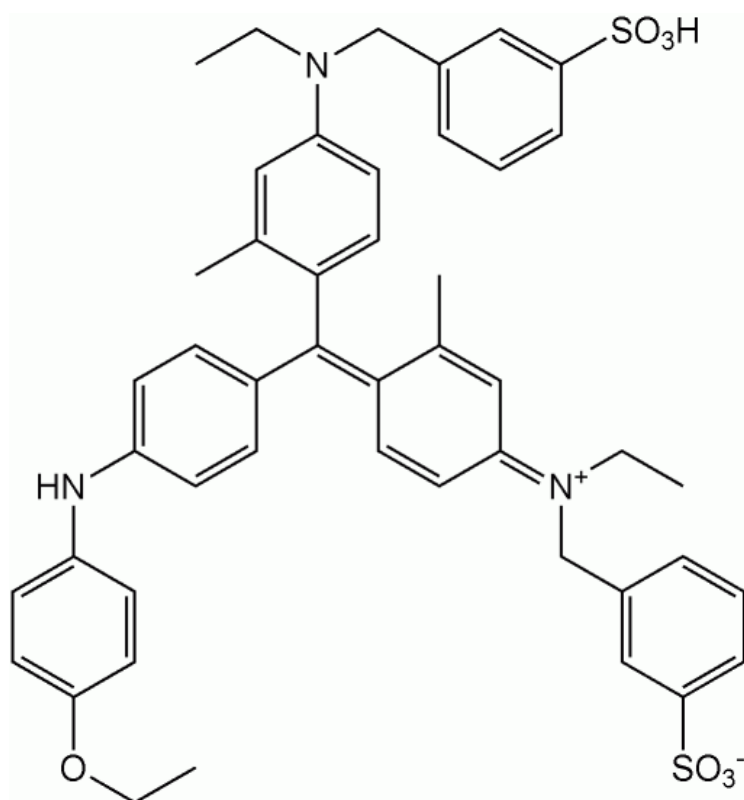


Рисунок 11. Краситель Кумасси бриллиантовый голубой G250.

Время окрашивания зависит от толщины геля. Тонкие гели прокрашиваются за 30-40 минут, в толстых плотных гелях может потребоваться несколько часов. Окрашивание проходит быстрее, если ванночку с гелем при этом слегка покачивают. После окрашивания гель помещают в раствор 0.9 Н уксусной кислоты, где в течение нескольких часов проводят отмывание красителя, сорбированного на волокнах геля. При этом, для ускорения процесса, раствор уксусной кислоты можно

периодически заменять на свежий, а ванночку с гелем слегка покачивать. Чувствительность метода составляет от долей микрограмма на полосу, до нескольких микрограмм на полосу. В качестве более чувствительного метода, можно предложить окрашивание при помощи нитрата серебра. Этот метод позволяет повысить чувствительность на 1-2 порядка [28].

Количественную оценку результатов фореа проводят при помощи денситометрии геля или его фотографии. При связывании Кумасси с белком, интенсивность прокрашивания полосы в достаточно широких пределах линейно зависит от количества белка в полосе. Однако, количество красителя, связанного с белком зависит от природы белка и его аминокислотного состава, поэтому при сравнении полос, соответствующих разным белкам, возможны ошибки. Кроме того, при фотографировании геля могут появиться дополнительные ошибки, связанные с нелинейностью чувствительности фотоплёнки. Тем не менее, результаты электрофореа нужно всегда документировать, прежде всего, фотографируя окрашенный гель.

Окрашенные гели можно хранить в растворе 0.9 Н уксусной кислоты достаточно продолжительное время. Однако более надёжными способами консервации является спиртовое высушивание геля или глицериновое замещение. Первый способ заключается в том, что гель помещают на несколько минут в спирт, где происходит его дегидратация. Гель заметно уменьшается в размерах и становится непрозрачным. По окончании сушки он напоминает небольшую пластинку белой пластмассы, на которой хорошо видны синие полосы окрашенных белков. Достоинством этого метода является обратимость процесса: сухой гель в любой момент можно снова размочить и он вернётся в исходное состояние. Кроме того, за счёт непрозрачности самого геля, повышается контрастность окрашивания, и полосы становятся более отчётливыми. К недостаткам можно отнести

хрупкость геля в сухом состоянии. Другой способ консервации состоит в замещении раствора уксусной кислоты в порах геля на глицерин. Гель при этом сохраняет эластичность и прозрачность.

Буферные растворы.

Большинство буферных растворов может храниться в холодильнике. Исключение составляют ДДС-Na, который нужно хранить при комнатной температуре во избежание выпадения в осадок, и ПСА, который необходимо использовать свежеприготовленным. Фиксирующие растворы, растворы уксусной кислоты и красителя Кумасси могут храниться при комнатной температуре. При использовании камер фирмы Bio-Rad для заливки одного разделяющего геля достаточно 5 мл раствора мономеров.

Большинство щелочных буферов готовится на основе Трис. “Трис” – это краткое название соединения трис-(оксиметил)-аминометан (trishydroxymethylaminomethane, или 2-амино-2-гидроксиметил-1,3-пропандиол – $C_4H_{11}NO_3$). Оно представляет собой молекулу метана, в которой три атома водорода замещены на три остатка метанола ($-CH_2OH$), а четвёртый – на амино ($-NH_2$) группу: $NH_2C(CH_2OH)_3$. В растворе трис принимает протонированную форму и имеет $pK_a \sim 8.1$, что позволяет его использовать для приготовления слабощелочных буферов, со значениями pH близкими к физиологическим, что особенно удобно для биологических макромолекул.

Ступенчатые буферные системы.

Ступенчатые буферные системы в большинстве случаев дают наилучшее разделение как в нативных, так и в денатурирующих условиях. Однако иногда, резкая смена буфера в геле может вызывать агрегацию белковых молекул. В этом случае можно применить нативную непрерывную буферную систему, или непрерывную буферную систему с добавлением мочевины.

Денатурирующий электрофорез по методу Леммли (Laemmli).

Ниже приведены составы и способы приготовления растворов, используемых при проведении электрофореза в присутствии ДДС-На в ступенчатой буферной системе с концентрирующим и разделяющим гелями.

Акриламид/Метиленбисакриламид (30% Т, 2.67% С).

87.6 г	акриламида	(29.2 г / 100 мл)
2.4 г	метиленбисакриламида	(0.8 г / 100 мл)

Навески мономеров растворить в 200 мл дистиллированной воды. При необходимости раствор можно подогреть. После полного растворения довести объём раствора до 300 мл. Хранить при температуре +4°C.

Додецилсульфат натрия (10% г/мл).

Растворить 10 г ДДС-На в 90 мл дистиллированной воды при *аккуратном* помешивании. Не взбалтывать, т.к. образуется плотная пена! После полного растворения довести объём раствора до 100 мл. Хранить при комнатной температуре.

1.5 М Трис-НСl буфер (рН 8.8).

27.23 г	трис-(оксиметил)-аминометан	(18.5 г / 100 мл)
80 мл	дистиллированная вода	

Растворить навеску Трис в 80 мл дистиллированной воды. Довести рН раствора до 8.8 титрованием концентрированной НСl (6-10 Н). После полного растворения довести объём раствора до 150 мл. Хранить при температуре +4°C.

0.5 М Трис-НСl буфер (рН 6.8).

6 г	трис-(оксиметил)-аминометан
60 мл	дистиллированная вода

Растворить навеску Трис в 60 мл дистиллированной воды. Довести рН раствора до 6.8 титрованием концентрированной НСl (6-10 Н). После полного растворения довести объём раствора до 100 мл. Хранить при температуре +4°C.

Буфер для проб (ДДС-Na).

Буфер для проб удобно готовить как можно более концентрированным, чтобы при нанесении пробы в гель её разбавление, а, как следствие, и увеличение в объёме, было минимальным. Помимо лидирующих красителей, буфер для проб призван утяжелять раствор, наносимый в лунку геля, за счёт увеличения его плотности. Поэтому разбавлять буфер слишком сильно не рекомендуется. Ниже приведён состав буфера для проб при денатурирующем фореze белков. Рекомендуется готовить не более 10 мл буфера для проб.

3.55 мл	дистиллированная вода
1.25 мл	0.5 М Трис-НСl, рН 6.8
2.5 мл	глицерин
2.0 мл	10% (г/мл) ДДС-Na
0.2 мл	0.5% (г/мл) бромфеноловый синий
<hr/>	
9.5 мл	Конечный объём

Хранить при комнатной температуре. Перед использованием в буфер для проб можно добавить β-меркаптоэтанола в количестве 50 μл на 950 μл буфера. Пробу необходимо разбавить как минимум в 2 раза буфером для проб и прокипятить на водяной бане в течение 4 минут. Нерастворённые примеси можно осадить при помощи центрифугирования, чтобы не засорились поры геля при входе пробы.

10x Электродный буфер (pH 8.3).

Электродный буфер удобно готовить в виде концентрированного раствора, который разбавляется до рабочей концентрации (1x) непосредственно перед использованием. Ниже приведён состав 10x электродного буфера.

30.3 г	трис-(оксиметил)-аминометан
144.0 г	глицин
10.0 г	ДДС-Na

После полного растворения в дистиллированной воде довести объём до 1 л. Не подводить pH раствора при помощи щелочей и кислот, это повлияет на проводящие свойства буфера! Измерять pH растворов, содержащих ДДС-Na не рекомендуется. Готовый раствор хранится при температуре +4°C. В случае, если в растворе образовался осадок, перед использованием его необходимо прогреть до комнатной температуры до полного перерастворения. Перед использованием разбавить дистиллированной водой в соотношении 50 мл 10x буфера к 450 мл воды и тщательно перемешать.

Персульфат аммония (10% г/мл).

Растворить 10 мг ПСА в 90 µл дистиллированной воды. Использовать свежеприготовленным! Раствор может храниться в течение 1-2 дней при температуре +4°C, с частичной потерей активности.

Приготовление геля (10 мл раствора).

Приготовить раствор, смешав необходимые количества исходных растворов, за исключением ТЕМЕД и ПСА. Поместить на 15 минут под вакуум для дегазации.

Таблица II. Приготовление растворов мономеров.

% T	H₂O_d (мл)	AA/МБА (мл)	*Буфер (мл)	10% ДДС-Na (мл)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

* Буфер разделяющего геля 1.5 М Трис-НСl буфер (pH 8.8)

* Буфер концентрирующего геля 0.5 М Трис-НСl буфер (pH 6.8)

Непосредственно перед заливкой геля добавить в раствор катализатор (ТЕМЕД) и инициатор (ПСА) реакции полимеризации из расчёта на 10 мл раствора:

Разделяющий гель

20 μл 10%ПСА

10 μл ТЕМЕД

Концентрирующий гель

30 μл 10%ПСА

20 μл ТЕМЕД

После добавления аккуратно перемешать раствор.

***Нативный электрофорез по методу
Орнштейна и Дэвиса (Ornstein-Devis).***

Эта система [29] в целом аналогична той, что описана подробно в методе Лэммли. При проведении электрофореза в нативных условиях в ступенчатой буферной системе с концентрирующим и разделяющим гелями можно использовать ту же рецептуру приготовления рабочих и концентрированных растворов, что и в денатурирующих условиях. Главным отличием является ***полное отсутствие денатурирующих факторов***, таких как ДДС-На, β-меркаптоэтанол и кипячение пробы перед нанесением в гель. Таким образом, можно использовать приведённые выше методики приготовления растворов, заменив в них ДДС-На на эквивалентный объём дистиллированной воды.

Непрерывные буферные системы.

Нативный электрофорез по методу МакЛеллана (McLellan).

Эта система [30], в целом, аналогична предыдущей, предложенной Орнштейном и Дэвисом [29], за исключением того, что в ней используется лишь один разделяющий гель. Как и в ступенчатой системе в здесь должны отсутствовать денатурирующие факторы, такие как ДДС-На, β-меркаптоэтанол и термообработка пробы. Ниже приведены составы и способы приготовления необходимых растворов.

Акриламид/Метиленбисакриламид (30% Т, 2.67% С).

87.6 г	акриламида	(29.2 г / 100 мл)
2.4 г	метиленбисакриламида	(0.8 г / 100 мл)

Навески мономеров растворить в 200 мл дистиллированной воды. При необходимости раствор можно подогреть. После полного

растворения довести объём раствора до 300 мл. Хранить при температуре +4°C.

Буфер для проб.

Буфер для проб удобно готовить как можно более концентрированным, чтобы при нанесении пробы в гель её разбавление, а, как следствие, и увеличение в объёме, было минимальным. Помимо лидирующих красителей, буфер для проб призван утяжелять раствор, наносимый в лунку геля, за счёт увеличения его плотности. Поэтому разбавлять буфер слишком сильно не рекомендуется. Ниже приведён состав буфера для проб при нативном форе́зе белков. Рекомендуется готовить не более 10 мл буфера для проб.

5.8 мл	дистиллированной воды
1.0 мл	соответствующего электродного буфера
3.0 мл	глицерина
0.2 мл	0.5% (г/мл) бромфеноловый синий
<hr/>	
10.0 мл	Конечный объём

5x Электродный буфер.

Электродный буфер удобно готовить в виде концентрированного раствора, который разбавляется до рабочей концентрации (1x) непосредственно перед использованием. Ниже приведены составы различных 5x электродных буферов с рН в интервале 3.8 – 10.2 из расчёта на 1 л раствора. Подводить рН буфера щёлочью или кислотой нельзя. В случае, если рН конечного раствора существенно отличается от расчётной необходимо приготовить раствор заново.

Таблица III. Приготовление 5x электродного буфера.

рН	Щелочная составляющая	в 5x растворе	Кислотная составляющая	в 5x растворе
3.8	β -аланин (M_r 89.09)	13.36 г/л	85% раствор молочной кислоты	7.45 мл/л
4.4	β -аланин (M_r 89.09)	35.64 г/л	17.4 М Уксусная кислота	11.5 мл/л
4.8	GABA (M_r 103.1)	41.24 г/л	17.4 М Уксусная кислота	5.75 мл/л
6.1	гистидин (M_r 155.2)	23.28 г/л	MES (M_r 195.2)	29.5 г/л
6.6	гистидин (M_r 155.2)	19.4 г/л	MOPS (M_r 209.3)	31.4 г/л
7.4	имидазол (M_r 68.08)	14.64 г/л	HEPES (M_r 238.33)	41.7 г/л
8.1	Трис (M_r 121.14)	19.38 г/л	EPPS (M_r 252.2)	37.85 г/л
8.7	Трис (M_r 121.14)	30.29 г/л	Борная кислота (M_r 61.83)	7.73 г/л
9.4	Трис (M_r 121.14)	36.34 г/л	CAPS (M_r 221.3)	44.26 г/л
10.2	Аммиак (14.8 М)	12.5 мл/л	CAPS (M_r 221.3)	22.13 г/л

Перед использованием развести 200 мл 5x буфера в 800 мл дистиллированной воды. В 1x электродном буфере концентрации компонентов составят:

pH	Щелочная составляющая	Кислотная составляющая
3.8	30 мМ β-аланин	20 мМ молочная кислота
4.4	80 мМ β-аланин	40 мМ уксусная кислота
4.8	80 мМ GABA	20 мМ уксусная кислота
6.1	30 мМ гистидин	30 мМ MES
6.6	25 мМ гистидин	30 мМ MOPS
7.4	43 мМ имидазол	35 мМ HEPES
8.1	32 мМ Трис	30 мМ EPPS
8.7	50 мМ Трис	25 мМ Борная кислота
9.4	60 мМ Трис	40 мМ CAPS
10.2	37 мМ Аммиак	20 мМ CAPS

Приготовление геля (10 мл раствора).

Приготовить раствор, смешав необходимые количества исходных растворов, за исключением ТЕМЕД и ПСА. Поместить на 15 минут под вакуум для дегазации.

Таблица IV. Приготовление растворов мономеров.

% <i>T</i>	H ₂ O _d (мл)	AA/МБА (мл)	Буфер (мл)
4%	6.7	1.3	2.0
5%	6.3	1.7	2.0
6%	6.05	2.0	2.0

Непосредственно перед заливкой геля добавить в раствор катализатор (ТЕМЕД) и инициатор (ПСА) реакции полимеризации из расчёта на 10 мл раствора:

30 μл 10%ПСА
20 μл ТЕМЕД

После добавления аккуратно перемешать раствор. При рН меньше 6.0 каталитическая активность ТЕМЕД заметно снижается, поэтому при работе в кислых рН рекомендуется пятикратное увеличение количества ТЕМЕД для полимеризации геля.

Электрофорез в присутствии мочевины по методу Чокли (Chalkley).

Как уже отмечалось выше, при разделении белков, склонных к агрегации, можно добавлять в пробу мочевины. При этом, в зависимости от белка и концентрации мочевины может происходить полная или частичная денатурация белка. Наиболее хорошо этот метод зарекомендовал себя при разделении гистонов. Ниже приведены рецептуры приготовления растворов для проведения электрофореза при концентрации мочевины 2.5 М.

Мочевина.

Для приготовления рабочих растворов удобно пользоваться концентрированным раствором мочевины. Для приготовления 10 М раствора необходимо растворить 60 г мочевины в 100 мл дистиллированной воды. Использование 10 М раствора обычно позволяет готовить гели с концентрацией мочевины до 5 М. Иногда, однако, требуется применять более высокие рабочие концентрации. В этом случае удобно растворять мочевины непосредственно в том объёме, где будет проводиться приготовление растворов мономеров. При этом для получения 1 М раствора необходимо растворить мочевины из расчёта 600 мг на 10 мл раствора. Таким образом, для приготовления 10 мл, например, 8 М раствора требуется 4.8 г мочевины.

Электродный буфер.

В качестве электродного буфера в системе Чокли используется 0.9 М уксусная кислота. Для её приготовления удобно пользоваться концентрированным обезвоженным реактивом – ледяной уксусной кислотой (~17.5 М), сокращённо ЛУК. Обезвоженная уксусная кислота представляет собой бесцветную жидкость с температурой плавления ~16.5°C. При охлаждении ниже температуры плавления образуются бесцветные кристаллы (откуда и происходит название). Плотность ЛУК составляет $\rho = 1.049 \text{ г/см}^3$, молярная масса $M = 60.05 \text{ г/моль}$. Таким образом, для приготовления 1 л раствора 0.9 М уксусной кислоты необходимо взять 51.4 мл ЛУК и довести объём до 1 л дистиллированной водой.

Буфер для проб.

В отличие от других методик, при электрофорезе по методу Чокли в буфер для проб часто не добавляют лидирующий краситель. Это связано с тем, что разделение проводится в кислой среде и обычные красители в этих условиях не применимы. Вместо этого на одну из контрольных дорожек наносят раствор родамина в 0.9 М уксусной кислоте, который мигрирует параллельно белковым пробам и является своеобразным ориентиром. Можно, однако, применять в качестве лидирующих красителей такие соединения как пиронин-У (Pyronin Y) метиленовый синий (methylene blue).

Утяжеление пробы в оригинальной методике проводилось при помощи сахарозы. Можно, однако, пользоваться глицерином, как было описано выше. Концентрацию мочевины в пробе обычно делают в пределах 8-9 М. Кроме того, для денатурации белков, выдерживающих высокие концентрации мочевины, можно добавлять в буфер для проб β -меркаптоэтанол. Ниже приведены два варианта приготовления буферного раствора из расчёта на 10 мл конечного объёма.

Мягкий буфер для проб

Мочевина	8М	4.8 г сухого вещества
Сахароза	15%	1.5 г сухого вещества
Пиронин-У	0.02%	0.5 мл 0.4% водного раствора
Уксусная кислота	0.9М	0.515 мл ЛУК

Довести объём раствора до 10 мл дистиллированной водой. В качестве альтернативы, можно проводить растворение мочевины и сахарозы непосредственно в 0.9М уксусной кислоте. Концентрацию сахарозы можно увеличить до 30% (3 г / 10 мл). Хранить при -20°C.

Денатурирующий буфер для проб.

Соляная кислота	1.0М	1 мл 10М HCl
β -меркаптоэтанол	5%	0.5 мл
Мочевина	9М	5.4 г сухого вещества
Сахароза	15%	1.5 г сухого вещества
Пиронин-У	0.02%	0.5 мл 0.4% водного раствора

Довести объём раствора до 10 мл дистиллированной водой. Денатурация белков в этом буфере является необратимой. При столь высокой концентрации мочевины пробу можно не утяжелять сахарозой вовсе. Концентрацию β -меркаптоэтанола можно несколько понизить.

Приготовление гелей.

Несмотря на то, что традиционно этот метод применяется для непрерывных буферных систем, его можно модифицировать, добавив концентрирующий гель. В этом случае концентрацию мономеров можно уменьшить до 7.5% *T*, а концентрацию уксусной кислоты – до 0.3М, что обеспечит худшую электропроводность буфера.

Согласно оригинальной методике, разделение проводили при 15% *A* и 0.66% *C*. Тем не менее, в настоящее время более популярно использование 20% ПААГ, для которого ниже и приводится рецептура.

20% ПААГ, 2.5 М мочевины (10 мл)

60% АА	3.33 мл
2% МБА	3.33 мл
10М мочевины	2.5 мл
ЛУК	0.52 мл

После дегазации раствора добавить 100 μ л ТЕМЕД и 50 μ л 10% ПСА.

Электрофорез в смешанных гелях.

При разделении крупных нуклеопротеиновых комплексов или частиц можно использовать смешанные гели, состоящие из агарозы в концентрации около 0.5% и полиакриламида в концентрации от 1.5% до 2.5%. При этом агароза выполняет лишь функцию механического каркаса, который не нарушает эффект молекулярного сита, создаваемого сеткой полиакриламидного геля. 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 в удвоенной, по сравнению с конечной, концентрации растворяют в буфере, прогревают, как описано выше, и выдерживают в течение часа при 50°. При этой же температуре добавляют равный объем раствора мономеров акриламида, также в удвоенной концентрации, быстро деаэрируют смесь, вносят инициатор (ПСА) и катализатор (ТЕМЕД) и немедленно заливают между подогретыми до 37° стеклами. Сначала застывает агароза; полимеризация акриламида обнаруживает себя появлением границы, лежащей на 2–5 мм ниже верхнего края геля агарозы. Для того, чтобы дно кармана было ровным, рекомендуется после окончания полимеризации ПААГ снять одну стеклянную пластину и обрезать гель ниже границы полимеризации акриламида. Затем можно снова наложить пластину, зажать гель и залить поверх него 0,3%-ную чистую агарозу, в которой и формировать «карманы» для внесения препаратов.

Список литературы.

1. Bustamante C., Gurrieri S. Smith S.B. (1993) *Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis*. Trends biotechnol., 11(1), 23-30
2. Slater G.W., Kist T.B., Ren H., Drouin G.. (1998) *Recent developments in DNA electrophoretic separations*. Electrophoresis. 19(10), 1525-1541.
3. Slater G.W., Desruisseaux C., Hubert S.J., Mercier J.F., Labrie J., Boileau J., Tessier F., Pépin M.P. (2000) *Theory of DNA electrophoresis: a look at some current challenges*. Electrophoresis. 21(18), 3873-3887.
4. Molinari M., Helenius A. (2002) *Analyzing cotranslational protein folding and disulfide formation by diagonal sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Methods Enzymol., 348, 35-42
5. Slater G.W., Guillouzic S., Gauthier M.G., Mercier J.F., Kenward M., McCormick L.C., Tessier F. (2002) *Theory of DNA electrophoresis*. Electrophoresis. 23(22-23), 3791-816.
6. Zeman S.M., Crothers D.M. (2001) *Simultaneous measurement of binding constants and unwinding angles by gel electrophoresis*. Methods Enzymol., 340, 51-68
7. Slater GW, Kenward M, McCormick LC, Gauthier MG. (2003) *The theory of DNA separation by capillary electrophoresis*. Curr Opin Biotechnol. 14(1), 58-64.
8. Rodbard D., Chrambach A. (1970) *Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration*. Proc Natl Acad Sci USA. 65(4), 970-977.
9. Галь Э., Медьши Г., Верецкеи Л. (1982) *Электрофорез в разделении биологических макромолекул*. Москва, Мир, 446 с.
10. Ackers G.K., Steere R.L. (1962) *Restricted diffusion of macromolecules through agar-gel membranes*. Biochim. Biophys. Acta, 59(1), 137-149

11. Остерман Л.А. (1981) *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование*. Москва, Наука, 286 с.
12. Щукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. (2006) *Коллоидная химия*. Москва, ВШ, с. 162-194.
13. Фридрихсберг Д.А. (1974) *Курс коллоидной химии*. Ленинград, Химия, с. 192-236.
14. Johnson P.H., Miller M.J., Grossman L.I. (1980) *Electrophoresis of DNA in agarose gels. II. Effects of loading mass and electroendosmosis on electrophoretic mobilities*. *Anal. Biochem.*, 102(1), 159-162.
15. Schwartz D.C., Koval M. (1989) *Conformational Dynamics of Individual DNA Molecules During Gel Electrophoresis*. *Nature*, 338(6215), 520-522.
16. Gurrieri S., Smith S. B., Bustamante C. (1999) *Trapping of megabase DNA molecules during agarose gel electrophoresis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96(2), 453-458.
17. Gurrieri S., Bustamante C. (1997) *Purification and staining of intact yeast DNA chromosomes and real-time observation of their migration during gel electrophoresis*. *Biochem. J.*, 326(1), 131-138.
18. Маниатис Т., Э. Фрич, Дж. Сэмбрук (1984) *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. М.: Мир, 1984. (Sambrook J., Russell D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition), CSHL Press, 2001, 2344 pp.)
19. Overbeek, J. T. G., Wiersema, P. H. (1967) *The interpretation of electrophoretic mobilities*. in *Electrophoresis*, Vol. 2, Edit. Bier, M., Academic, New York, p. 1–41.
20. Peacock A.C., Dingman C.W. (1968) *Molecular Weight Estimation and Separation of Ribonucleic Acid by Electrophoresis in Agarose-Acrylamide Composite Gels*. *Biochemistry*, 7(2), 668-674.

21. Dahlberg A.E., Dingman C.W., Peacock A.C. (1969) *Electrophoretic Characterization of Bacterial Polyribosomes in Agarose-Acrylamide Composite Gels*. J. Mol. Biol. 41(1), 139-147.
22. Dahlberg A.E., Lund E., Kjeldgaard N.O. (1973) *Some Effects of Antibiotics on Bacterial Polyribosomes as Studied by Gel Electrophoresis*. J. Mol. Biol. 78(4), 627-636.
23. Overbeek, J. T. G., and Lijklema, J. (1959) in *Electrophoresis*, Vol. 1, Edit. Bier, M., Academic, New York, p. 1-33.
24. Chrambach A, Rodbard D. (1971) *Polyacrylamide gel electrophoresis*. Science. 172(982):440-451
25. Yuan C., Rhoades E., Heuer D.M., Saha S., Lou X.W., Archer L.A. (2006) *Comprehensive Interpretation of Gel Electrophoresis Data*. Analytical Chemistry, 78(17), 6179-6186.
26. Panyim S., Chalkley R. (1969) *High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones*. Arch Biochem Biophys. 130(1), 337-346.
27. Laemmli U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227(5259), 680-685.
28. Gromova I., Celis J.E. (2006) *Protein Detection in Gels by Silver Staining: A Procedure Compatible with Mass-Spectrometry* in Cell Biology: A Laboratory Handbook. 3rd Edition. v.4 Eds: Celis, J.E., Carter N., Hunter T., Simons K., Small J.V. and Shotton D. Elsevier. Academic Press, 2006.
29. Ornstein, L., Davis, B. J. (1964) Anal. NY Acad. Sci., 121, 321.
30. McLellan T. (1982) *Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH*. Anal Biochem. 126(1), 94-99.