

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ).

Принцип метода:

Разделение белков происходит в зависимости от их заряда в градиенте рН создаваемом с помощью синтетических смесей полиаминополикарбоновых кислот (амфолитов) под действием электрического поля.

Изоэлектрофокусирование на иммобилизованном градиенте (IPG-стрипы, 17 см), рН 3-10 (фирмы “Bio-Rad”, США).

Методика:

Первое направление 2D-электрофореза – изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ).

Изоэлектрофокусировка проводится на приборе для изоэлектрофокусировки белков Protean IEF Cell (фирмы “Bio-Rad”, США).

В ячейку для изоэлектрофокусировки наливают с помощью пипетки белковый раствор (белковый раствор + соллюбилизирующий буфер(7 М мочевины; 2 М тиомочевина; 30% ХАПС (3-[(3-Холамидопропил)диметиламмоний-]-1-пропансульфонат), 0.4 % Nonidet P-40; 5% амфолины рН 3-10; 65 мМ дитиотреитол), чтобы общий объем был равен 350 мкл в каждой лунке.). Затем сверху наслаивают пипеткой минеральное масло около 2 мл (масло капают по 1-му мл с каждого края на середину лунки). Закрывают крышкой так, чтобы электроды совпали и ставят в прибор Protean IEF Cell.

Стрипы активно регидратируют (50 В, 12 часов). Изоэлектрофокусировку проводят при 250 В в течение 15 мин, затем в течение 5 часов при 10000 В и затем 5 часов при 10000 В.

Затем стрипы вынимают и дают стечь маслу. После ИЭФ IPG полоски инкубируют в буфере, содержащем 6М мочевины, 30% глицерол, 2% додецилсульфат натрия, 0,5М трис-HCl, 0,5% бромфенол голубой в течение 10 мин.

На верхний край концентрирующего геля наливают электродный буфер помещают стрипы (гелем вниз), затем буфер сливают и фиксируют 1% агарозой.

Изоэлектрофокусировка на трубках.

Приготовить трубочки 17см диаметром 1,5мм, одну сторону замотать парафильмом.

Приготовить раствор для полимеризации и шприц для заливки раствора в трубочки:

На 4мл – 8 трубочек

Мочевина - 2г

Вода деонизованная – до 4 мл

Акриламид для IEF – 500мкл

Амфолиты 5-8 – 70 мкл

Амфолиты 3-10 – 30 мкл

ДЕГАЗИРОВАТЬ!!!

TEMED – 4мкл

Chaps – 240мкл

PSA (10%) – 8мкл

Залить трубочки (от верхнего края отмерить 4 см и до этой метки заливать). Ждать не менее 2 часов. После полимеризации снять парафильм, проверить, нет ли пузырьков. Установить в штатив трубочки (с помощью резиновых пробок) и внести сверху белковый раствор с помощью специального шприца, в оставшееся место (сверху) долить (неспеша) верхнего буфера.

Приготовление буферов:

Верхний – 50мМ NaOH (на 400 мл – 2 мл 10М раствора NaOH)

Нижний – 20мМ ортофосфорная кислота (на 2 л – 2,76 мл ортофосфорная кислота)

Втянуть трубочки в пробки так, чтобы наверху осталось не более 0,5 см. Смазать уплотнители на рамке и установить штатив с трубочками. В камеру вниз залить нижнего буфера, поместить рамку в камеру и залить верхнего буфера (чтобы трубочки и электроды были закрыты).

Изоэлектрофокусировку проводят от 100-600V – по 45 мин., затем при 700 V – 10 часов и при 900V – 10 часрв (фактически получится около 1,5-2 часов).

Затем трубочки вынимают, готовят шприц 2 мл (с пластиковым наконечником), набирают в него электродный буфер и осторожно выдавливают в ячейку для изоэлектрофокусировки (в ячейку перед этим наливают 3мл тяжелого буфера) содержащего 6М мочевины, 30% глицерол, 2% додецилсульфат натрия , 0,5М трис-HCl, 0,5% бромфенол голубой в течение 10 мин.

На верхний край концентрирующего геля наливают электродный буфер помещают полоски гелей, затем буфер сливают и фиксируют 1% агарозой.

Электрофоретическое разделение белков во втором направлении.

Принцип метода:

Разделение макромолекул происходит на основании различия их размеров (молекулярных масс) и пространственных конфигураций.

Методика:

Разделение во втором направлении 2D-электрофореза проводят с использованием 9-16% вертикальных градиентных полиакриламидных гелей, на которые переносятся IPG стрипы. Заливку градиентных ПААГ осуществляют с помощью установки PROTEAN II xi Multi-Gel (фирмы "Bio-Rad", США) по стандартному протоколу (см. таблицу 1). Размер каждого геля составляет 0,15x20x20 см.

После установки рамок в камеру подсоединить систему охлаждения, включить холодильник на 10⁰С.

В приборе Protean IEF Cell (Bio-Rad, США) разделение белков по массам проходит при постоянной силе тока, равной 30 mA на гель при температуре +10⁰С около 5-6 часов.

После окончания электрофореза сначала выключить холодильник, пережать шланги, отсоединить систему охлаждения. Затем вынуть стеклянные пластины из прибора, и освободившийся гель поместить в герметичную коробку для окрашивания.

Таблица 4.2**Приготовление 9-16% градиентных полиакриламидных гелей.**

| Компонент | Объем компонента в 9% ПААГ | Объем компонента в 16% ПААГ |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Акриламид(30%)+бис(0,8%) (р-р), мл | 75 | 133 |
| 1,5М Трис-НСl (рН=8,8) с 4%SDS, мл | 62,5 | 62,5 |
| Глицерин, гр. | - | 25 |
| Деионизованная вода, мл | 112,5 | 29,5 |
| Персульфат аммония (10%), мкл | | |
| ТЕМЕД конц, мкл | 103 | 103 |
| Конечный объем, мл | 250 | 250 |

Визуализация белковых пятен.

Окрашивание гелей нитратом серебра с тиосульфатом натрия.

Принцип метода:

При покраске гелей наиболее важным фактором является подбор условий окрашивания, позволяющий визуализировать наиболее широкий спектр разделенных белков.

Все растворы готовятся в таком количестве, чтобы на 1 гель приходилось не менее 150-200 мл данного раствора.

Методика:

Визуализацию белковых пятен в гелях после завершения 2-го направления электрофореза осуществляют методом окрашивания серебра с тиосульфатом натрия. Для этого гели фиксируют в растворе, содержащем 25% изопропанола и 10% уксусной кислоты в течение 2-х часов. Затем гели отмывают в деионизованной воде 3 раза по 20 мин., после чего на 2 мин их помещают в раствор тиосульфата натрия концентрацией 0,3 г/л. После этого гели отмывают в деионизованной воде 3 раза по 30 сек. Далее их инкубируют в растворе, содержащем 0,1% нитрата серебра и 0,1% формалина в течение

15 мин. Затем гели отмывают в деионизованной воде 3 раза по 30 сек. Проявляют гели в растворе, содержащем 4%-ного безводного карбоната натрия, 0,002%-го раствора тиосульфата натрия (30%-го), 0,1% формальдегида в течение 3-4 мин. Данную реакцию останавливают добавлением 10%-го раствора уксусной кислоты. Держать гели в растворе 10%-ной уксусной кислоты не менее 1 часа.