

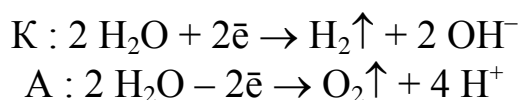
Лекция 4 ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

- 1 Принцип метода электрофореза
- 2 Факторы, влияющие на подвижность молекул, веществ
- 3 Специальные электрофоретические методы

1 Принцип метода электрофореза

Электрофоретические методы основаны на разделении ионов при движении их в растворе под действием электрического поля. Разделение биологического материала с помощью электрофореза происходит по двум причинам. Во-первых, многие важные в биологическом отношении молекулы (аминокислоты, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты) содержат ионизирующиеся группы, поэтому в растворе они могут существовать в либо в виде катионов, либо анионов. Во-вторых, если макромолекулы по величине заряда близки, то они, вероятно, будут различаться молекулярными массами, то есть разделение этих веществ будет осуществляться за счет разного отношения заряда молекулы к массе.

Подлежащий электрофоретическому разделению материал растворяют или суспендируют в буферном растворе; чтобы обеспечить проведение электрического тока, этим же буфером насыщают и носитель. Ток в цепи поддерживается за счет электролиза, происходящего на электродах, каждый из которых погружен в большую буферную камеру. В процессе электролиза на катоде образуются гидроксид-ионы и молекулярный водород, а на аноде – молекулярный кислород и ионы водорода:



Образование на катоде гидроксильных ионов приводит к увеличению диссоциации компонента буферной смеси, представляющего собой слабую кислоту (НА). Вследствие этого возрастает количество ионов A^- , проводящих ток к аноду. На аноде ионы A^- соединяются с протонами, при этом снова образуется НА, а электроны поступают в электрическую цепь.

Оборудование. Прибор для электрофореза, состоит в основном из двух частей: *источника питания* и собственно *электрофоретического блока*. Описываемое оборудование применяется для работы с низким напряжением до 500 В и силой тока до 150 мА, а высоковольтный электрофорез – более специальный метод, который рассмотрен ниже.

В электрофоретический блок входят *электроды, буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка* (рис. 1; 2). Можно пользоваться электродами из нержавеющей стали, но поскольку некоторые буферы вызывают коррозию, предпочтительнее платиновые электроды. Обе буферные камеры обычно разделены на два отсека: электродное отделение и отделение для фитиля-

мостика. Электрический контакт между буферными растворами в обоих отделениях осуществляется за счет маленьких отверстий (щелей) в перегородке между отделениями или с помощью фитилей. Разделение камеры на отсеки нужно для того, чтобы изменение рН буферного раствора, происходящее у электрода, не сказывалось на буферном растворе, которым насыщен носитель.

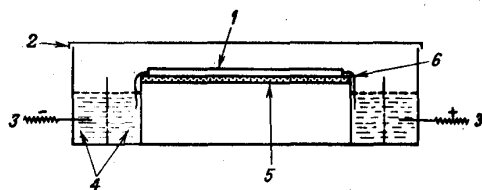


Рис. 1 Прибор для горизонтального электрофореза

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

Контакт между носителем (заранее насыщенным буфером) и буферным раствором, находящимся в камерах, обычно поддерживается с помощью фитилей-мостиков из нескольких слоев фильтровальной бумаги или марли. При низковольтном электрофорезе на бумаге можно обойтись без мостиков – контакт создается за счет непосредственного погружения бумаги в буферный раствор.

Насыщенный буфером носитель, на который нанесен образец, обычно располагают горизонтально (*горизонтальный электрофорез*) на плоской поверхности изолирующего материала (рис. 1). Для работы с низким напряжением имеется простое оборудование для *вертикального электрофореза* (рис. 3.2). В этом случае в качестве носителя используют пластины крахмального геля, помещая их вертикально в специальные камеры.

Во время работы электрофоретический блок нужно закрывать крышкой, чтобы свести до минимума испарение буферного раствора и обеспечить электрическую изоляцию.

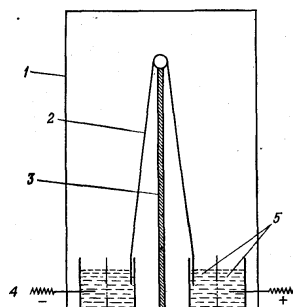


Рис. 2 Прибор для вертикального электрофореза: 1 – крышка; 2 – носитель (бумага); 3 – опора; 4 – электрод; 5 – отсеки буферной камеры

Приготовление носителей и их свойства:

- **Бумага.** Специальной электрофоретической бумаги не существует, для электрофореза подходит обычная хроматографическая бумага. Бумагу очень удобно использовать в качестве носителя, так как она не требует никакой

подготовки, ее просто нужно разрезать на полоски требуемого размера. Бумажный электрофорез самый простой и наиболее широко применяемый из электрофоретических методов. Он подходит для разделения целого ряда заряженных веществ, однако в настоящее время его в ряде случаев заменяют электрофорезом на ацетате целлюлозы и в гелях, обладающий более высоким разрешением.

- **Ацетат целлюлозы.** Высокоочищенный ацетат целлюлозы имеется в продаже в виде тонких полос стандартного размера. Вследствие его очень незначительной адсорбирующей способности можно получить высокое разрешение с небольшим количеством вещества. Ацетат целлюлозы менее гидрофилен, чем бумага, поэтому он удерживает меньшее количество буферного раствора. Следовательно, большая часть тока обусловлена ионами образца, что обеспечивает очень быстрое их разделение. Но это сопровождается выделением большого количества тепла, и поэтому при работе с высоким напряжением нужно принимать меры предосторожности, чтобы полосы не высохли вследствие испарения.

Отсутствие адсорбции на ацетате целлюлозы и обусловленная этим высокая разрешающая способность позволяет при использовании радиоизотопов получать четко разграниченные радиоактивные области.

- **Тонкие слои.** Тонкие слои кремния оксида, алюминия оксида или целлюлозы наносят на стеклянные пластинки. Такие пластины при выполнении анализа помещают горизонтально в аппарат для электрофореза, и дают возможность тонкому слою насытиться буфером за счет диффузии раствора из буферной камеры через соединяющие фитили. Тонкослойный электрофорез (ТСФ) проходит быстро и дает хорошее разрешение.

- **Гели.** Агаровые, крахмальные, полиакриламидные и другие гели следует готовить непосредственно перед использованием, а это процесс, требующий времени. Свойства гелей таковы, что и адсорбция, и электроосмос, и расширение зон в результате диффузии очень незначительны. Гель-электрофорез особенно ценен для разделения смесей веществ, имеющих одинаковые заряды, но слегка различающиеся массы.

Крахмальные гели. Крахмальные гели готовят путем нагревания и охлаждения смеси частично гидролизованного крахмала с соответствующим буферным раствором. Это приводит к переплетению разветвленных цепей молекул и образованию полужесткой структуры. Буфер для крахмальных гелей, как правило, подбирают эмпирически, и для этой цели с успехом применяют целый ряд разных буферов. «Слабые», высокопористые гели можно приготовить, добавляя к буферному раствору менее 2 % масс. крахмала, а «сильные», низкопористые – от 8 до 15 %. Точный размер пор образующихся при этом крахмальных гелей определить, однако, не удастся. Наибольшее применение крахмальные гели для электрофореза нашли при разделении сложных смесей структурных и физиологически активных белков.

Агаровые гели. Агар – это смесь двух галактозных полимеров, агарозы и агаропектина. Их концентрация в геле равна всего 1 %, т. е. агар содержит большое количество воды, вследствие чего ионы в процессе электрофореза движутся очень быстро. Благодаря этому свойству агар очень удобен для разделения и обнаружения антигенов методом иммуноэлектрофореза.

Полиакриламидный гель. Полиакриламидные гели получают при сополимеризации акриламида $[\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CO})\text{NH}_2]$ и N,N'-метиленакриламида $[\text{CH}_2(\text{NHCOCH}=\text{CH}_2)_2]$ в присутствии соответствующего свободнорадикального катализатора. На рис. 3 показана сетчатая структура геля. Мономеры и катализатор сначала смешивают в буфере, а затем заливают в цилиндрические трубки из стекла или плексигласа диаметром 5 - 6 мм и длиной 6 - 7 см. Трубки закрывают снизу резиновыми колпачками и ставят вертикально в штатив. Процесс полимеризации ингибируется кислородом и, чтобы избежать этого, на поверхность геля осторожно наслаивают дистиллированную воду на высоту нескольких миллиметров. Это наслаивание обеспечивает также образование плоской поверхности у верхнего конца столбика геля. Наслаивание осуществляют либо с помощью шприца для подкожных инъекций, либо через капилляр с продетым в него хлопчатобумажным волокном. Вода стекает из капилляра по волокну и равномерно растекается по поверхности плотного полиакриламидного раствора.

Можно приготовить гели с общим содержанием акриламида от 3 до 30 % масс., что соответствует размерам пор от 0,2 до 0,5 нм. Чем меньше процентное содержание акриламида, тем крупнее поры.

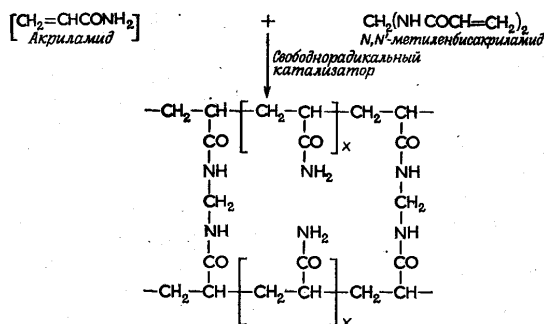


Рис. 3. Образование полиакриламидного геля

Полиакриламидные гели обладают рядом свойств, благодаря которым они особенно успешно применяются для разделения макромолекул:

- а) размером пор геля можно варьировать в широких пределах;
- б) гель можно формировать в калиброванных трубках и, следовательно, получать воспроизводимые результаты;
- в) гель можно применять с самыми разными буферными растворами;
- г) разделение с использованием полиакриламидного геля проходит очень быстро;
- д) адсорбция и электроосмос полиакриламидного геля низки;

е) после разделения макромолекулы можно окрашивать и определять количественно;

ж) полиакриламидный гель не поглощает ультрафиолетовый свет при $\lambda = 270$ нм; т.е., местоположение белков после разделения можно определить по поглощению при этой длине волны.

Зональный и фронтальный электрофорез. Электрофорез проводится не только на носителе, но и в свободном растворе.

Общая для всех носителей особенность состоит в том, что разделяемые вещества движутся в виде отчетливых зон, которые затем легко обнаружить соответствующим аналитическим методом. Этот метод, который получил название *зональный электрофорез*, широко применяется как в препаративных, так и в аналитических целях.

В свободном растворе сопротивление движению ионов за счет трения между ними и раствором минимально, что обуславливает быстрое продвижение ионов. Поскольку близкие по структуре молекулы обладают близкими зарядами, в электрическом поле они передвигаются совместно в виде полосы с границами раздела, образованными веществами с несколько различающимися электрофоретическими подвижностями. Метод электрофореза, называемый в соответствии с этим методом подвижной границы или *фронтального электрофореза* (электрофокусирование, изотахофорез), требует слишком сложной и дорогостоящей аппаратуры.

Порядок выполнения анализа:

1. Насыщение носителя. Если носитель не является гелем, для обеспечения электропроводности его необходимо насытить буфером до начала электрофореза. Насыщение лучше производить до нанесения образца, иначе это с самого начала приведет к его размыванию.

2. Нанесение образца. Раствор с образцом обычно наносят микропипеткой в виде маленького пятна или узкой полосы. Если отдельные компоненты смеси имеют противоположные заряды, они в ходе разделения будут двигаться к разным электродам, и образец в этом случае нужно наносить примерно посередине. Если же все компоненты будут двигаться в одном направлении, т. е. если все они заряжены либо положительно, либо отрицательно, образец нужно наносить как можно дальше от соответствующего электрода, у противоположного конца носителя, чтобы разделяемые компоненты проходили большее расстояние.

При горизонтальном электрофорезе пропитанные образцом полоски фильтровальной бумаги вводят в щель или ямку, вырезанные на поверхности геля. При вертикальном электрофорезе образец в 10 %-ном растворе сахарозы наслаивают на поверхность вертикального столбика геля.

3. Разделение. После нанесения образца включают источник питания, поддерживая соответствующее, напряжение в течение всего процесса разделения. Даже при наличии стабилизированных источников питания необходимо

постоянно следить за работой прибора, так как если носитель подготовлен недостаточно тщательно, возможен перегрев, а в случае применения бумаги – даже ее обугливание. Низковольтный электрофорез обычно завершается в течение 1-2 ч, хотя для разделения белков на бумаге требуется немного больше времени. По окончании электрофореза сначала выключают источник питания, а затем извлекают носитель.

4. Извлечение носителя. Бумагу, полоски ацетата целлюлозы и тонкослойные пластины извлекают и сушат прямо на воздухе, обычно в печи при 110°C. Для извлечения цилиндрических полиакриламидных гелей столбик геля обводят струёй воды под давлением, применяя для этого шприц для подкожных инъекций. Благодаря этому гель отстает от стенок трубки, и его выталкивают. Для уменьшения диффузии веществ, подвергшихся разделению, гели при необходимости помещают в фиксирующий раствор, например 7 %-ный раствор уксусной кислоты.

5. Окрашивание и извлечение веществ. Большинство биологических соединений не окрашено, и для определения их местоположения по завершении разделения необходимо каким-то образом сделать их «видимыми». Наиболее широко практикуемый метод – это обработка среды красителем, который избирательно окрашивает компоненты образца. Если краситель количественно взаимодействует с компонентами смеси, то можно определить количество окрашенного вещества одним из двух способов.

Во-первых, можно вырезать соответствующий участок носителя и экстрагировать из него соединение подходящим растворителем, а затем каким-либо методом, например спектрофотометрическим, определить его количество.

Во-вторых, носитель можно сканировать с помощью денситометра. Этот прибор измеряет количество света, проходящего через узкую полоску носителя при перемещении его перпендикулярно световому лучу. Количество света, прошедшего через среду и попавшего на детектор денситометра, связано обратной зависимостью с количеством окрашенного вещества. На приборе записывается серия пиков, соответствующих положению окрашенных зон. Калибровку прибора проводят, снимая показания денситометра для известных количеств данного компонента, нанесенного на носитель и обработанного красителем. Нужно стремиться к минимальному фоновому окрашиванию носителя. В этом отношении полосы из ацетата целлюлозы имеют преимущество перед бумажными: ацетат целлюлозы становится прозрачным, если погрузить его в жидкий парафин. Окрашенные зоны при этом становятся более отчетливыми. Избыток красителя с полос ацетата целлюлозы и из гелей удаляют многократным погружением их в какой-либо растворитель, например разведенную уксусную кислоту.

Локализацию белков, обладающих ферментативной активностью, можно определить косвенным путем. Для этого гель помещают в раствор субстрата

данного фермента, и, если продукт реакции окрашен, сразу выявляется его местоположение, а, следовательно, и местоположение фермента.

Местоположение радиоактивных веществ можно обнаружить методом автордиографии или с помощью прибора для сканирования радиохроматограмм.

2 Факторы, влияющие на подвижность молекул, веществ

Если снять электрическое поле до того, как ионы исследуемой смеси достигнут электродов, компоненты смеси распределятся в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Таким образом, электрофорез представляет собой незавершенную форму электролиза.

Скорость движения катионов к катоду и анионов к аноду зависит от соотношения между движущей силой электрического поля, действующей на заряженные ионы, и замедляющими движение силами взаимодействия между молекулами и окружающей средой, в основном силами трения и электростатическими силами.

На электрофоретическую подвижность вещества влияет состав образца, буферного раствора, носителя и характеристики воздействующего электрического поля:

• Образец

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

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

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

• Электрическое поле

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

Сила тока. Длина пути, пройденного ионами, будет пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза не должна меняться, ток должен быть постоянным.

Напряжение. Скорость миграции пропорциональна градиенту напряжения в поддерживающей среде.

Сопротивление. Скорость миграции обратно пропорциональна сопротивлению. Сопротивление возрастает с увеличением длины слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов.

В ходе электрофореза выделяется тепло. Следовательно, такое нагревание приведет к усиленному испарению растворителя. Для обеспечения максимальной воспроизводимости результатов применяют стабилизированные источники питания, которые автоматически поддерживают на постоянном уровне либо напряжение, либо силу тока, несмотря на неизбежные при температурных флуктуациях изменения сопротивления. Испарение сводят до минимума, помещая аппарат под воздухо непроницаемую крышку. Для дополнительного охлаждения при работе с высоким напряжением в аппарат встраивается охлаждающая система.

- **Буферный раствор**

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

Состав буферного раствора. Поскольку буферные растворы служат для образца растворителями, то некоторая диффузия нанесенного образца неизбежна. Это особенно заметно для малых молекул, таких, как аминокислоты и сахара. Диффузию можно свести до минимума, если наносить образцы в виде узких полос и в умеренных количествах, использовать высокое напряжение и как можно быстрее проводить разделение, а по его завершении быстро вынимать и высушивать образцы.

Концентрация буферного раствора. По мере увеличения ионной силы буфера, скорость миграции образца уменьшится. При высокой ионной силе буфера суммарный ток увеличивается, а, следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла. При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. Таким образом, миграция образца ускоряется. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая способность хуже, чем при высокой ионной силе. Таким образом, при выборе ионной силы буфера приходится идти на компромисс. Применяющиеся обычно буферные растворы имеют концентрацию от 0,05 до 0,10 М.

рН буферного раствора. Для полностью диссоциирующих веществ, таких, как неорганические соли, рН практически не играет роли, но для органических соединений рН определяет степень ионизации. С ростом рН ионизация органических кислот возрастает, а оснований, наоборот, уменьшается, и, следовательно, меняется их электрофоретическая подвижность. На такие соединения, как аминокислоты, обладающие как кислотными, так и основными свойствами (амфолиты), рН оказывает двойное действие (лекция 1). Таким образом, скорость и направление движения амфолитов зависят от рН, и для их разделения можно использовать буферы с диапазоном рН от 1 до 11.

- **Носитель**

В качестве носителей используют относительно инертные вещества, однако их состав оказывает влияние на подвижность разных веществ. Выбор носителя очень важен, при этом необходимо учесть следующие процессы:

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

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

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

2 Специальные электрофоретические методы

Высоковольтный электрофорез. При разделении низкомолекулярных веществ с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге наблюдается значительная диффузия. Это нежелательное явление можно исключить, если

применять значительно более высокие напряжения; при этом улучшается разрешение, а разделение происходит очень быстро, за 10-60 мин. Для этой цели используют источники питания, обеспечивающие напряжение до 10 000 В, силу тока до 500 мА.

При высоковольтном электрофорезе выделяется такое большое количество тепла, что требуется эффективная система охлаждения. Охлаждение можно осуществлять двумя способами – «полным погружением» или с помощью охлаждающих пластин.

При «полном погружении» (рис. 4) насыщенную буфером бумагу с нанесенным образцом погружают в большой объем охлаждающей жидкости, которая действует как жидкий теплообменник, отводя от бумаги тепло.

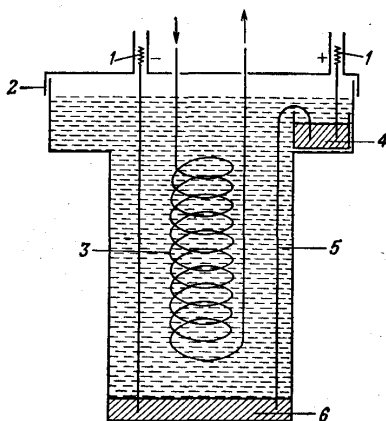


Рис. 4. Система полного погружения при высоковольтном электрофорезе: 1 – электрод; 2 – изолированная крышка; 3 – змеевик; 4 – буфер; 5 – лист бумаги, 6 – буфер

Охлаждающая жидкость должна быть электрически инертной и не смешиваться ни с буфером, ни с образцами. Для этих целей широко применяются органические растворители, например толуол или варсол (уайт-спирт). Обычно в охлаждающую жидкость погружают змеевик, по которому циркулирует вода, что обеспечивает дополнительное охлаждение. Метод «полного погружения» достаточно эффективен и технически легко осуществим, однако охлаждающие жидкости, как правило, токсичны и легковоспламеняемы.

Система охлаждающих пластин безопаснее и более эффективна (рис. 5). Две пластины (как правило, алюминиевые) плотно, под давлением прижимаются надувной прокладкой к изолированному от них полимерным материалом носителю. Размеры пластин доходят до 50x50 см, поэтому разделение можно проводить на листах бумаги большого формата. В охлаждающих пластинах имеются каналы для циркуляции воды. При использовании больших пластин расход воды должен составлять от 10 до 15 л/мин.

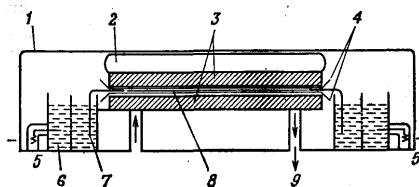


Рис. 5. Система с охлаждающими пластинами при высоковольтном электрофорезе: 1 – изолированная крышка; 2 – прижимающая прокладка; 3 – охлаждающие пластины; 4 – политен; 5 – электрод; 6 – буфер; 7 – фитиль-мостик; 8 – лист бумаги; 9 – охлаждающая жидкость (вода).

Нужно следить за тем, чтобы на пластинах не возникало температурных градиентов, так как различие в 1°C вызывает изменение скорости миграции на 3%, а это сказывается на воспроизводимости результатов. Исключительно важно, чтобы все оборудование было полностью электрически изолировано, поскольку применяемые напряжения смертельны.

Непрерывный (проточный) электрофорез. Проточный электрофорез – это разновидность низковольтного электрофореза на бумаге. Образец, растворенный в буфере, непрерывно наносят в верхней части вертикально расположенного листа бумаги. Образец увлекается вниз буфером, стекающим под действием силы тяжести, одновременно с этим заряженные компоненты образца под влиянием электрического поля перемещаются в горизонтальном направлении (рис. 6). Аппарат помещают в камеру из плексигласа. Стационарность потока буфера обеспечивается тем, что буферный раствор в сосуде поддерживается на постоянном уровне. Разделившиеся вещества собирают в пробирки, расположенные под нижним зубчатым краем листа бумаги. Разделение продолжается до 2 сут. Оптимального разделения в каждом частном случае добиваются путем эмпирического подбора места нанесения образца, скорости движения буфера и образца, а также применяемого напряжения.

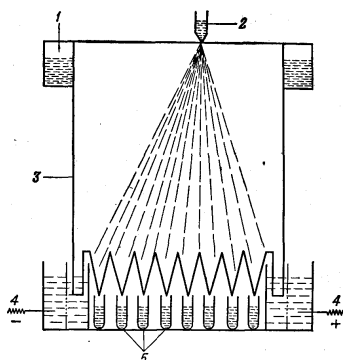


Рис. 6. Прибор для непрерывного (проточного) электрофореза: 1 – сосуд с буферным раствором; 2 – устройство для нанесения образца; 3 – лист бумаги; 4 – электрод; 5 – пробирки коллектора

Для получения данным методом хороших результатов требуется значительный навык и экспериментальное искусство, и поэтому он применяется в основном для

специальных исследований. Его можно использовать не только для разделения заряженных молекул, но и для фракционирования клеток различных типов, клеточных органелл и фрагментов мембран.

Диск-электрофорез. Прибор для диск-электрофореза показан на рис. 7. Он состоит из двух сосудов с буфером – верхнего и нижнего, соединенных между собой рядом вертикальных цилиндрических стеклянных трубок (рабочие трубки), содержащих гель (рабочий гель и гель-прокладку). В нижнем сосуде находится анод, а в верхнем – катод. Образцы наносят на поверхность столбиков геля при заполненном буфером нижнем сосуде, затем буфером заполняют и верхний сосуд, ставят на место крышку и включают ток. Буферные растворы подбирают таким образом, чтобы разделяемые вещества были в них заряжены отрицательно. По мере их движения через гель вниз, к аноду, происходит разделение, обусловленное различиями отношений заряда к массе. Диск-электрофорез называют еще *«прерывистым»* электрофорезом (в отличие от непрерывного, проточного). Это название отражает особенность метода, заключающуюся в использовании *неоднородной* («прерывистой») среды (гелей) и буферов разного состава и с разными значениями рН. Верхняя треть столбика геля состоит из крупнопористого геля-прокладки, или *концентрирующего* геля, а нижняя – из *рабочего*, или *разделяющего*, геля с более мелкими порами. Роль концентрирующего геля заключается в концентрировании образца по мере его прохождения через этот гель; в результате образец подходит к рабочему гелю в виде чрезвычайно узкой полосы. Рабочий гель действует по принципу молекулярного сита. рН буферного раствора в верхнем сосуде меньше, чем буферного раствора, насыщающего гель, и благодаря этому различию образец по мере прохождения через гель-прокладку концентрируется.

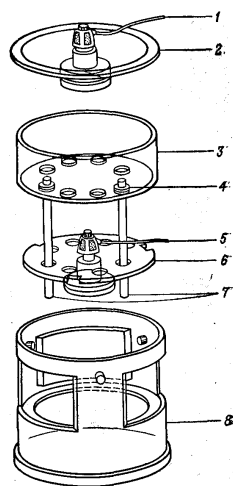
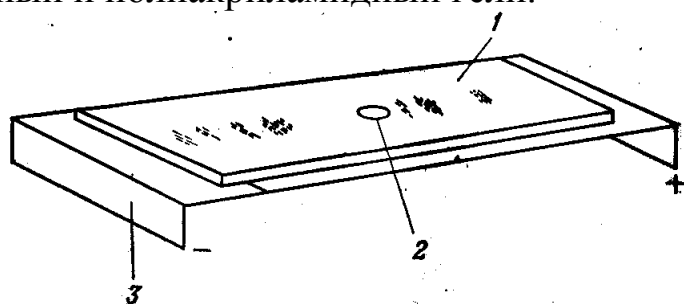


Рис. 7. Прибор для диск-электрофореза: 1 – электрический провод (к катоду); 2 – крышка с электродом в сборе; 3 – верхний сосуд для буферным раствором; 4 – резиновые вкладыши; 5 – электрический провод (к аноду); 6 – блок с нижним электродом; 7 – рабочие трубки; 8 – нижний сосуд с буферным раствором.

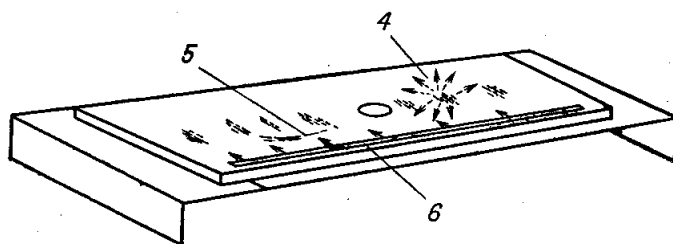
Верхний гель имеет высокую пористость, и в связи с этим крупные молекулы проходят через него практически свободно. Следовательно, в этой части геля подвижность белков приближается к таковой для свободного раствора.

Иммуноэлектрофорез. Этот метод, сочетающий электрофорез с иммунодиффузией, дает возможность различить сходные по электрофоретической подвижности вещества с помощью специфической реакции преципитации между антигеном и соответствующим антителом. Метод особенно ценен для обнаружения антигенов в сложных физиологических смесях, например антигенов иммуноглобулинов (рис. 8).

Первоначально смесь антигенов разделяют с помощью электрофореза на тонкой агаровой пластинке. Затем в желобок, вырезанный в агаре, вносят смесь антител. Смесь диффундирует через пластинку латерально, и в то же самое время происходит радиальная диффузия антигенных компонентов от мест их локализации в агаре. При встрече антигена с соответствующим антителом происходит преципитация в форме дуги. Количество образовавшихся дуг соответствует числу антигенов. Предпочтительнее проводить иммуноэлектрофорез на агаре, однако можно использовать также ацетат целлюлозы, крахмальный и полиакриламидный гели.



I. Разделение антигенов с помощью электрофореза в течение 90 мин при 10 В·см⁻¹



II. Диффузия и преципитация в течение 16-24 ч

Рис. 8. Разделение с помощью иммуноэлектрофореза

1 – агаровый гель на стеклянной пластинке; 2 – смесь антигенов; 3 – мостик-фильтр из фильтровальной бумаги, погружаемый в электродную камеру 4 – антиген; диффундирующий радиально от места нанесения; 5 – дуга преципитации вдоль линии максимальной концентрации; 6 – желобок, в который помещают смесь антител, диффундирующих перпендикулярно направлению, в котором производился электрофорез.

Изоэлектрическое фокусирование. В основе этого метода лежит фронтальный, а не зональный электрофорез. Амфотерные вещества, такие, как аминокислоты и пептиды, разделяют на специально предназначенной для этого вертикальной колонке одновременно в градиенте как рН, так и напряжения. Каждое вещество движется к той части колонки, где значение рН соответствует его изоэлектрической точке, и там останавливается (фокусируется).

Выполнение анализа следующее. Вертикальную стеклянную колонку заполняют смесью синтетических низкомолекулярных амфолитов-носителей, индивидуальные изоэлектрические точки которых имеют значения, перекрывающие предварительно выбранную область рН. Амфолиты обычно суспендируют в растворе сахарозы, чтобы среда была плотной и в ней отсутствовали конвекционные потоки. Верхний конец колонки (анод) соединен с сосудом, содержащим сильноокислый раствор (например, фосфорную кислоту), а нижний (катод) – с сосудом, содержащим сильнощелочной раствор (например, этаноламин). При открытии клапанов в сосудах эти растворы начинают диффундировать в колонку каждый со своего конца, и через некоторое время в колонке устанавливается градиент рН с крайними значениями, соответствующими рН кислого и щелочного растворов. После этого клапаны закрывают и включают ток.

Амфолиты в растворе мигрируют до тех пор, пока не достигнут области рН, при которой их суммарный заряд равен нулю. Здесь они прекращают движение, стабилизируя тем самым исходный градиент рН. Затем, открыв кран, вводят в верхнюю часть колонки образец.

Разделение продолжается от 1 до 3 сут; за это время компоненты смеси распределяются по зонам со значениями рН, соответствующими их изоэлектрическим точкам. По завершении разделения выключают ток и фракции, поступающие через кран в нижней части колонки, собирают в пробирки коллектора для последующего анализа.

Изоэлектрическое фокусирование оказалось весьма полезным методом для разделения, очистки и идентификации белков за один прием. Очень высокая разрешающая способность метода делает его особенно ценным для идентификации изоферментов: для разделения достаточно различий в изоэлектрических точках всего в 0,02 единицы рН.

Изотахофорез. Этот метод также основывается на принципе фронтального электрофореза (метод подвижной границы). Раствор, в котором происходит разделение, обычно представляет собой водную среду, содержащую сахарозу для обеспечения более высокой плотности. К образцу добавляют по одному виду ионов с высокой и низкой электрофоретической подвижностью (например, ионы хлора и глицината соответственно); оба иона имеют тот же заряд, что и разделяемые ионы образца. После нанесения образца включают ток, ионы с самой высокой подвижностью движутся к соответствующему электроду первыми. На некотором расстоянии от них следуют самые малоподвижные ионы, а ионы

образца, обладающие промежуточной подвижностью, располагаются между ними соответственно их относительным подвижностям. Если подвижности ионов образца очень близки, разрешение можно улучшить путем внесения в исходный образец синтетических амфолитов, называемых ионами-прокладками. Изотахорофрез обладает очень высокой разрешающей способностью и применяется как для аналитического, так и для препаративного разделения самых разнообразных веществ.