

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Т.А.Преображенская

Оглавление

1. Посттрансляционная модификация белков, секретируемых поджелудочной железой.....	2
1.1. Образование дисульфидных связей.....	3
1.2. Активация зимогенов.....	4
2. Метод электрофореза.....	6
2.1. Движение ионов в растворе.....	6
2.2. Зональный электрофорез.....	7
2.3. Изоэлектрофорез.....	7
2.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.....	9
2.4.1. Диск-электрофорез.....	10
2.4.2. Электрофорез в гелях с градиентом концентрации полиакриламида	11
3. Практическое задание: выявление межцепочечных дисульфидных связей в α -химотрипсине.....	12
3.1. Сборка камеры для электрофореза и приготовление геля.....	13
3.2. Приготовление проб белков.....	14
3.2.1. Маркерные белки.....	14
3.2.2. Приготовление проб α -химотрипсина.....	15
3.3. Проведение электрофореза.....	16
3.4. Окрашивание геля и обработка результатов.....	16
4. Литература.....	17
5. Приложение: управляющая функция Кольрауша.....	18

Задача посвящена изучению особенностей строения секретируемых белков на примере α -химотрипсина. Для анализа полипептидов используется один из методов разделения макромолекул в электрическом поле – электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

При подготовке следует повторить разделы спецкурсов, в которых рассматривались строение аминокислот, первичная и вторичная структура белков, зависимость зарядов слабых кислот, оснований и амфолитов от концентрации ионов гидроксония (величины рН), расчёт кислотно-основного равновесия. Часть этого материала изложена в описании задачи «Потенциометрическое титрование».

1. Посттрансляционная модификация белков, секретируемых поджелудочной железой.

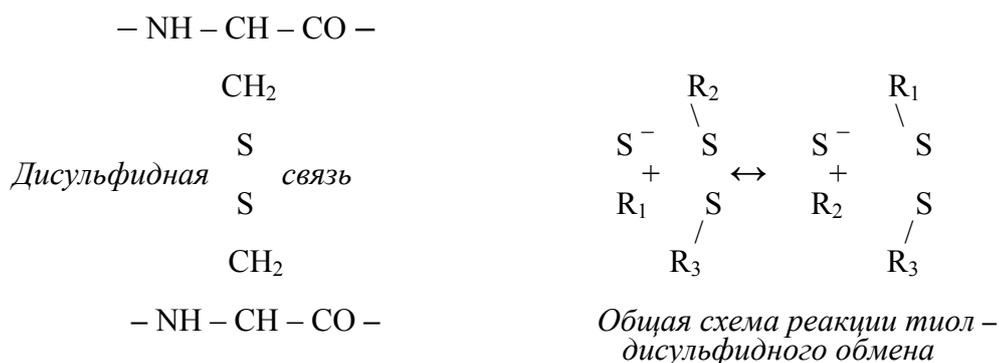
Протеолитические ферменты – трипсин, α -химотрипсин, эластаза, карбоксипептидаза и пр. – синтезируются ацинарными клетками поджелудочной железы в виде неактивных предшественников, так называемых зимогенов (трипсиногена, химотрипсиногена, проэластазы...). Синтезируемые рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР) полипептиды сразу оказываются в просвете ЭР, где подвергаются действию катализаторов правильного свёртывания – шаперонов, а также протеин-дисульфид-изомеразы – белка, образующего внутрицепочечные дисульфидные связи в молекулах, предназначенных для функционирования вне клетки. Затем зимогены, собранные в секреторные пузырьки, переносятся в аппарат Гольджи, а откуда в виде плотно упакованных зимогеновых гранул транспортируются в апикальную область клетки; она обращена в сторону желудочно-кишечного тракта.

Сигналом к секреции является связывание с наружными клеточными рецепторами молекул ацетилхолина (он выделяется постганглиозными нейронами блуждающего нерва), а также холецистокинина – полипептидного гормона желудочно-кишечного тракта. Активация сигнальной системы, состоящей из G – белков, фофолипазы, инозитолтрифосфата и пр. приводит к открыванию Ca^{++} -каналов в мембране ЭР и в клеточной мембране и, вследствие этого, – к увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{++} . Под действием ионов Ca^{++}

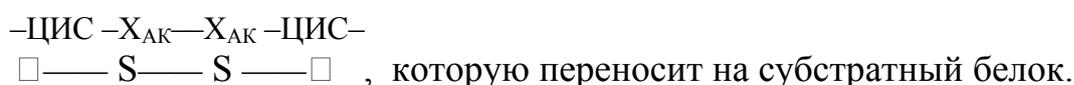
мембраны зимогеновых гранул сливаются с мембраной клетки, и содержимое гранул через систему протоков попадает в тонкий кишечник. Здесь в результате каскада протеолитических реакций происходит отщепление пептидов от неактивных предшественников и образование ферментов. Таким образом, первичная структура секретируемого белка после трансляции модифицируется дважды: 1) в ЭР образуются дисульфидные связи, 2) вне клетки в результате протеолиза удаляется часть аминокислотной последовательности.

1.1. Образование дисульфидных связей.

Дисульфидные связи являются прочными ковалентными связями между двумя цистеиновыми остатками, обычно удаленными друг от друга по первичной последовательности. Дисульфидные связи стабилизируют пространственную структуру белка, внося в неё значительные конформационные ограничения.



При значениях pH, больших величины pK_a SH-группы (обычно ~ 8), цистеиновый остаток образует реакционноспособный тиолат-анион ($R-S^-$). Тиолат реагирует со многими соединениями; наиболее важны из них тиолы и дисульфиды – в реакциях обменного типа, протекающих при нейтральных или щелочных pH. Эти реакции являются обратимыми; их направление зависит от концентраций окисленных и восстановленных форм. Так, в просвете ЭР, где, в отличие от цитоплазмы, поддерживается большое содержание окисленных форм, протеин-дисульфид-изомераза имеет в активном центре дисульфидную связь:



Дисульфидные связи белков восстанавливаются низкомолекулярными тиол-содержащими веществами. Так, перед проведением электрофореза пробы



Рис 1.1. Первичная структура α-химотрипсина.

Обозначения:

аланин	глицин	метионин	фенилаланин
аспарагиновая кислота	глутамин	пролин	цистеин
аспарагин	глутаминовая кислота	серин	
аргинин	изолейцин	тирозин	
валин	лейцин	треонин	
гистидин	лизин	триптофан	

тре - аминокислотные остатки, удаленные из молекулы химотрипсиногена при активации,
 сер - аминокислотные остатки, составляющие активный центр.

Практическое задание включает в себя обработку α-химотрипсина дитиотреитолом, проведение электрофореза полученных образцов, анализ электрофореграммы и сопоставление результатов с данными о структуре.

2. Метод электрофореза

2. 1. Движение ионов в растворе.

Движение ионов в растворе в электрическом поле описывается с помощью эмпирически вводимой величины, называемой подвижностью. Она определяется как скорость равномерного движения иона в направлении электрического поля, равном 1 в/см, и соответствует уравнениям: $F_e = F_{тр}$ или $q \cdot E = f \cdot v$,

$$(1) \quad v = E \cdot u,$$

где $u = q/f$ – подвижность иона,

F_e – сила, действующая на ион со стороны электрического поля,

E – напряженность электрического поля,

$F_{тр}$ – сила трения, действующая на ион со стороны раствора,

f – коэффициент трения,

v – скорость движения иона,

q – заряд иона.

Если в растворе имеется смесь веществ, например, катионы А, В и анионы R, S, ..., то общий ток создается как движением катионов по полю, так и движением анионов против него, так что для электропроводности (σ) имеем:

$$(2) \quad \sigma = F (c_A u_A + c_B u_B + \dots + c_S u_S + c_R u_R + \dots),$$

где $u_{(n)}$ – подвижности ионов, $c_{(n)}$ – их концентрации, F – число Фарадея.

Многие органические вещества существуют в водном растворе в виде смеси нейтральных молекул и ионов. Соотношение заряженных и нейтральных форм зависит от концентрации ионов гидроксония (величины рН). Описание движения ионов органических веществ (слабых кислот, оснований и амфолитов) осложнено необходимостью учитывать постоянно происходящие реакции обмена протонами с растворителем. За счет этих реакций, протекающих гораздо быстрее перемещения ионов, в каждом элементарном объеме, куда переместилась заряженная часть вещества, восстанавливается соотношение заряженных и незаряженных форм. Другими словами, перемещается не только заряженная часть, но все вещество в целом. Такое движение описывается величиной усредненной подвижности

$$\bar{u} = \sum c_i u_i / c,$$

где u_i – подвижности разных ионных форм, c_i – их концентрации,

c – общая концентрация вещества. *Подвижность оказывается зависящей от рН* из-за того, что от рН зависит концентрация разных ионных форм.

Для шарообразных ионов в разбавленных растворах подвижность можно вычислить по формуле Стокса: $u = q/6\pi\eta r$. В общем же случае подвижность зависит не только от размеров и состава самого иона, но и от свойств раствора.

Так, заряд молекул белков зависит как от pH раствора, так и от присутствия других ионов, в частности, ионов детергентов. Эффективный заряд электрофоретической частицы снижается при увеличении ионной силы. Форма молекул, от которой зависит коэффициент трения, также различна в разных средах. При движении в поддерживающей среде, содержащей заряженные группы, возникает тормозящая сила, вызванная током растворителя (электроэнодоосмосом) и т.д.

Но, так или иначе, подвижность является индивидуальной характеристикой вещества, и различия в подвижности ионизованных макромолекул служат основой для разделения их смесей. По характеру движения ионов выделяют два вида электрофореза – зональный и изотахофорез. Эти режимы создаются подбором буферов и их пространственным распределением.

2. 2. Зональный электрофорез.

При зональном электрофорезе слой поддерживающей среды размещается между камерами с электродами, все заполняется буферным раствором, смесь молекул наносится на границу поддерживающего слоя и разделяется под действием тока на зоны отдельных компонентов, мигрирующих в однородном электрическом поле и в однородной среде в соответствии со своими подвижностями (1). Следует отметить, однако, что движение ионов в электрическом поле в любом растворе не вполне свободно, так как в любой точке раствора поддерживается постоянная, не зависящая от времени, следующая величина, называемая управляющей функцией Кольрауша: $\sum c_j/u_j = \text{const.}$, где c_j – концентрация j -го компонента раствора, u_j – его подвижность. Движение анализируемых молекул можно считать свободным только в том случае, когда определяющим в этой функции является вклад ионов среды.

2. 3. Изотахофорез.

При изотахофорезе, напротив, среда разделения является неоднородной.

Движение анализируемой смеси управляется специально подобранными ионами. *Участники процесса:* (1) анализируемая смесь одно-одно заряженных, например отрицательно, молекул (A_1^- , A_2^- ,..... A_n^-) с общим противоионом; (2) раствор с большей, чем у молекул из (1) подвижностью отрицательного иона, и с тем же противоионом; (3) раствор с меньшей, чем у молекул из (1) подвижностью отрицательного иона и с тем же противоионом. *Расположение участников:* раствор (2) занимает лидирующее положение – со стороны анода ; за ним расположена смесь (1), за ней, со стороны катода – замыкающий раствор (3). Экспериментально установлено, что после включения электрического поля смесь молекул (1) при движении за лидирующим раствором разделяется на стопку растворов компонентов, расположенных в порядке убывания подвижности ($u_{A_1^-} > u_{A_2^-} > \dots > u_{A_n^-}$), причем каждый раствор имеет четкие границы и плотно примыкает к следующему. Электрическое поле на каждом из следующих участков больше предыдущего. Нетрудно видеть, что такое расположение растворов является устойчивым, так как ион, обогнавший свою зону или отставший от нее, будет замедлен или, соответственно, ускорен соседним полем. Стопка растворов движется с постоянной скоростью к аноду. *В условиях изотахофореза концентрации ионов во всех зонах определяются концентрацией лидирующего иона.* Действительно, для любых соседних растворов например, α и β (рис. 1,), справедливы соотношения:

$$J_\alpha = J_\beta \text{ и } v_{Cl^-} = v_{A_1^-}, \quad (J - \text{плотность тока, } v - \text{ скорость иона}).$$

Из них с учетом (1) и (2) следует:

$$(4) \quad c_{A_1^-} = c_{Cl^-} \left[\frac{u_{Cl^-}}{u_{Cl^-} + u_{Tris^+}} \right] \left[\frac{u_{A_1^-}}{u_{A_1^-} + u_{Tris^+}} \right],$$

или.
$$c_{A_1^-} = c_{Cl^-} \times \text{const.}$$

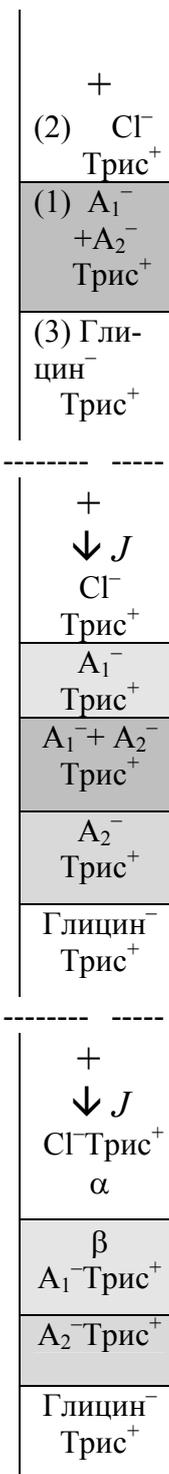
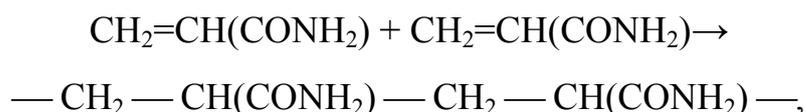


рис.2.1. начальная, переходная, стационарная стадия изотахофоретического разделения двух анионов.

Изотахорофрез используется и как самостоятельный метод, и как вспомогательный прием для концентрирования растворов в методе диск-электрофореза.

2. 4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

В качестве *поддерживающей среды* в этих методах используется гель полиакриламида. Это – пористая среда; не препятствующая движению низкомолекулярных ионов, но оказывающая сопротивление движению макромолекул. Размер пор зависит от концентраций акриламида и N,N'-метиленбисакриламида (сокращенно *бисакриламида*). Полимеризация идет по цепному механизму после запуска её агентом, образующим свободные радикалы: персульфатом аммония, рибофлавином на свету и пр.; катализатором реакции служит тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД). Молекулы акриламида соединяются в цепи в ходе винильной полимеризации:



а бисакриламид $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CO}) \text{— NH — CH}_2 \text{— NH — CH}(\text{CO})= \text{CH}_2$ образует поперечные сшивки. Полиакриламидный гель принято характеризовать двумя параметрами: T – отношением суммарной массы мономеров к объёму раствора в % и C – отношением массы бисакриламида к суммарной массе мономеров в %.

При электрофорезе белков используют $3\% < T < 30\%$ и $1\% < C < 5\%$. Сопротивление движению белков со стороны геля увеличивается с увеличением размеров молекул белка. Связь между молекулярными массами разделяемых белков и величиной T ориентировочно такова:

M kDa	10 – 40	40-100	100-300	>300
T %	15-20	10-15	5-10	5

Определение молекулярных масс белков по подвижности осложняется

различиями в их зарядах, связанных с различиями в первичной структуре. Нивелирование этих различий достигается при образовании *комплексов белков с додецил-сульфатом натрия* (ДСН или SDS):



SDS связывается с гидрофобными аминокислотными остатками, причем отношение массы SDS к массе белка в комплексе примерно одинаково для разных бел-

ков и равно 1,4. Отрицательный заряд комплекса пропорционален размеру молекулы белка, намного превосходя её собственный заряд; комплексы имеют сходную, вытянутую форму, что создает однородные условия для их движения.

Помимо движения в электрическом поле, организующем разделение смеси белков на зоны, существует тепловое движение, эти зоны размывающее. Задача противодействия этому процессу в методе *диск-электрофореза* решается с помощью концентрирования исходной пробы, а при использовании градиента концентрации акриламида (в так называемых *градиентных гелях*) – с помощью фокусировки зон непосредственно в процессе разделения.

2.4.1. Диск-электрофорез.

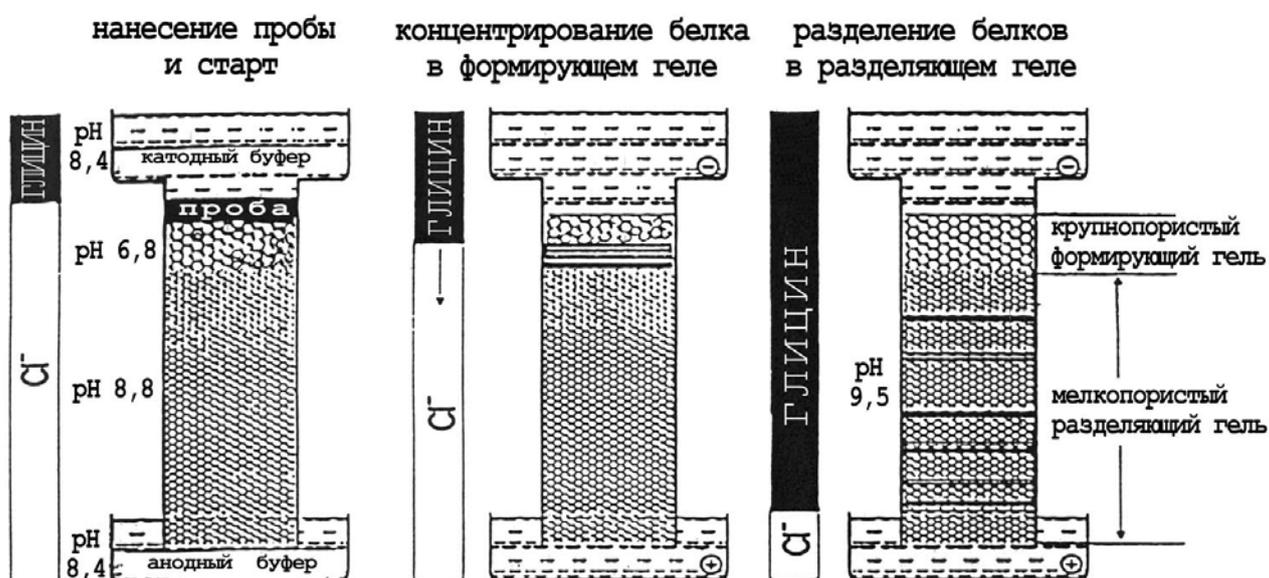


рис 2.2. Принципиальная схема диск – электрофореза.

Электрофорез проводится в пластине или трубке, заполненной гелем и размещённой между резервуарами, в которые помещены электроды*. Состав геля и пропитывающих его растворов, различен в разных частях пластины. Верхняя часть пластины заполнена крупнопористым гелем ("формирующим" или "концентрирующим"), который является лишь поддерживающей средой, устраняющей конвекцию, но не препятствует движению макромолекул. В остальной части

При используемых напряжениях на электродах (платиновых или угольных) происходит разложение воды с выделением кислорода и водорода, а около электродов образуются кислота и щелочь. Приборы для электрофореза сконструированы так, что загрязнение рабочих буферов продуктами электролиза сведено к минимуму.

пластины расположен мелкопористый гель, служащий для разделения макромолекул. Пробы белков вместе с низкомолекулярным красителем вносят в карманы, сформированные в верхней части концентрирующего геля. Растворы, ограничивающие пробу сверху и снизу, отвечают условиям изотахофореза: буфер концентрирующего геля содержит подвижный анион, обычно Cl^- ; катодный буфер содержит анион, малоподвижный при установленном в буфере pH , например глицин. При движении в электрическом поле белки подходят к границе разделяющего геля в виде стопки концентрированных слоев, зажатых между быстрым лидирующим анионом (Cl^-) и замыкающим глицином. На границе соотношение подвижностей макромолекул и глицина резко меняется: первые тормозятся разделяющим гелем и еще больше концентрируются, а у глицина, оказавшегося при большем pH , подвижность значительно возрастает, и он обгоняет белки. Дальнейшее движение макромолекул происходит в условиях зонального электрофореза – в однородном электрическом поле и в растворе постоянного состава. Электрофорез заканчивают, когда низкомолекулярный краситель доходит до нижней границы геля. После окрашивания измеряют расстояния от начала разделяющего геля до белковых полос. Отношение этого расстояния к пробегу красителя (R_f) используют как меру подвижности. В определенном диапазоне молекулярных масс, зависящем от размеров пор геля, можно получить линейную зависимость между R_f и $\lg M$.

2.4.2. Электрофорез в гелях с градиентом концентрации полиакриламида .

Для расширения диапазона молекулярных масс используют гели с возрастающей от старта к финишу концентрацией акриламида. Такие гели отличаются еще и узостью полос. Механизм их фокусировки сходен с рассмотренным для изотахофореза, только в данном случае не электрическое поле, а концентрация геля впереди и позади полосы влияет на подвижность.

Задача. Сравните pH разделяющего геля на рис.2 и 2 . Почему он изменился?

Оцените pH разделяющего геля на рис.2 для следующих концентраций:

$[\text{ГЛИЦИН}]_{\text{катодный буфер}} = 40 \text{ мМ}$, $[\text{ТРИС}]_{\text{разделяющий гель}} = 400 \text{ мМ}$.

Указания: 1) учтите рассуждения о миграции слабого электролита, приведенные на стр 2;
2) используйте условие электронейтральности для концентрирующего геля (см. раздел «Кислотно-основное равновесие» описания задачи по титрованию).

3. Практическое задание: выявление межцепочечных дисульфидных связей в α -химотрипсине.

В работе проводится диск-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с буферной системой по Лэммли, приведенной в таблице 2.1:

1	2	3	4
электродный буфер	буфер для концентрирующего геля	буфер для разделяющего геля	буфер для приготовления пробы
глицин 192мМ трис* 25 мМ SDS 0,1% рН 8,3	трис - HCl 125 мМ SDS 0,1% рН 6,8	трис-HCl 375 мМ SDS 0,1% рН 8,8	трис-HCl 62мМ глице-рин*** 10% SDS 2% БФС** 0,001% рН 6,8

* трис – основание, $pK_a=8,1$, $(CH_2OH)_3 - C - NH_2$,

**БФС бромфеноловый синий, низкомолекулярный краситель, мигрирующий впереди белков,

*** глицерин добавляют для увеличения плотности пробы.

таблица 3.1.

Представленные в таблице растворы соответствуют условиям проведения диск-электрофореза (см. рис. 2.2)

Растворы готовятся заранее в концентрированном виде и хранятся в морозильнике. Их состав приведен в таблице 3.2.

Реактивы	Раствор мономеров		10-кратный электродный буфер		4-кратный буфер для разделяющего геля		4-кратный буфер для концентрирующего геля		4-кратный буфер для пробы		
	<i>M</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>P</i>
Акриламид		30%	60 г								
Бисакриламид		0,8%	1,6 г								
Бромфеноловый синий										0,004%	1,6 мл 0,05% раствора
Глицерин										40%	8 г
Глицин	76			1,92 М	72 г						
Дитиотреитол	140									2%	1,6 г
ДСН (SDS)				1%	5 г	0,4%	0,4 г	0,4%	200 мг	2%	1,6 г
Трис	121			0,25 М	15,1 г	1,4 М	18 г	0,5 М	3 г	0,25 М	605 мг
Вода			0,2 л		0,5 л		0,1 л		50 мл		20 мл
рН					8,5		8,8 ^(HCl)		6,8 ^(HCl)		6,8 ^(HCl)

Обозначения: *M* – молекулярная масса, *C* – концентрация, *P* – количество; рН 8,8^(HCl) означает, что для доведения рН используется HCl

таблица 3.2.

3.1. Сборка камеры для электрофореза и приготовление геля.

	Общий объем	Вода	Раствор мономеров	10-кратный электродный буфер	4-кратный буфер для разделяющего геля	4-кратный буфер для концентрирующего геля	25% персульфат аммония 50 мг 200мкл	ТЕМЕД
электродный буфер	1 л	900 мл		100мл				
концентрирующий гель 3,75%	6 мл	3,75 мл	0,75мл			1,5 мл	24 мкл	6 мкл
разделяющий гель 15%	20 мл	5 мл	10 мл		5 мл		30мкл	12 мкл

таблица 3.3.

В таблице 3.3 показано разбавление запасных растворов до рабочих концентраций.

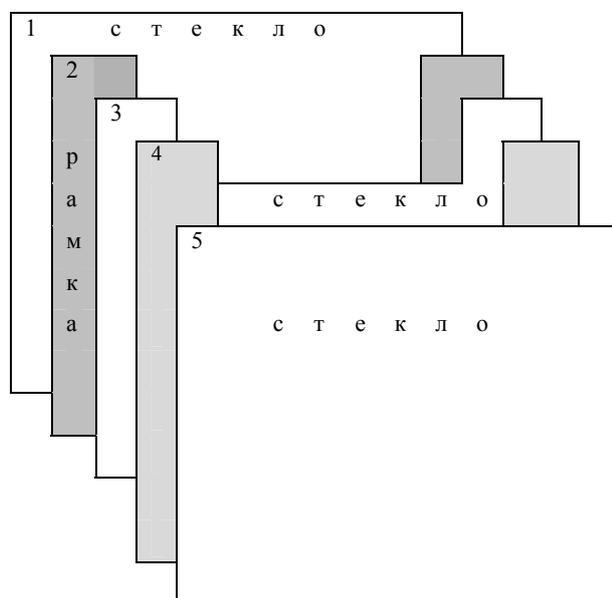
Порядок работы.

При подготовке к занятию составьте план нанесения проб (таблица 3.4)

Меры предосторожности. **Все манипуляции с гелем следует проводить в перчатках.**

1. Приготовьте электродный буфер.

2. Соберите камеру.



а) сложите стопкой детали камеры в порядке, показанном на рисунке;

б) зажмите всю стопку зажимами сбоку.

2 - рамка с электродами

3 – стекло с вырезом

4 - уплотнитель

3. Приготовьте 25% раствор персульфата аммония (ПСА) (50 мг/200мкл).

4. Отметьте на стекле 5 уровень разделяющего геля (на 1 см ниже гребенки).

4. Приготовьте разделяющий гель без ПСА и ТЕМЕДа.

5. Добавьте ПСА и ТЕМЕД.

6. Залейте разделяющий гель между стеклами 3 и 5.

7. Наслоите воду на поверхность разделяющего геля.
8. Приготовьте концентрирующий гель без ПСА и ТЕМЕДа.
9. После завершения полимеризации уберите воду, сполосните получившийся карман буфером для концентрирующего геля.
10. Добавьте ПСА и ТЕМЕД в концентрирующий гель.
11. Вставьте (не полностью) гребенку между стеклами 3 и 5.
12. Залейте концентрирующий гель, вставьте полностью гребенку.
13. После полимеризации выньте уплотнитель, установите верхнюю камеру в нижнюю, налейте буфер, удалите пузыри из-под геля.
14. Выньте гребенку, промойте лунки буфером для пробы, поправьте изогнувшиеся перегородки между карманами.
15. Нанесите пробы.

2. Приготовление проб белков.

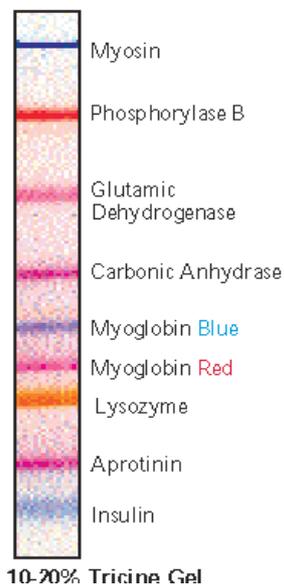
3.2.1. Маркерные белки.

Чтобы оценить молекулярные массы полученных проб химотрипсина, электрофорез необходимо дополнить белками с известной молекулярной массой. Для этого имеются наборы белков №№ 1, 2:

	М kDa
бычий сывороточный альбумин	67
яичный альбумин	43
глицеральдегидфосфат дегидрогеназа	36
химотрипсиноген	25
ингибитор трипсина	20,1
миоглобин	17,8
лизоцим	14,3
цитохром С	11,7
апротинин	6,5

Набор №1 приготовлен из растворов отдельных белков в буфере для пробы (1мг/мл), восстановленных дитиотреитолом, и хранится в морозильнике; каждый из белков можно использовать и отдельно от других.

Маркерные белки наносят и на отдельные дорожки геля, и вместе с анализируемой пробой. По зависимости R_f от lgM , построенной для маркеров, определяют молекулярные массы анализируемых белков.



Набор №2 содержит предварительно окрашенные белки. Такие белки удобны для того, чтобы наблюдать за ходом электрофореза. Но их миграция из-за ковалентной связи с красителем отличается от миграции комплексов белков с ДСН, поэтому при их использовании нужно учитывать поправку на молекулярный вес.

3.2.2. Приготовление проб α -химотрипсина.

- 1) Приготовьте раствор дитиотреитола (500мМ - 70 мг/мл).
- 2) Взвесьте маленькую стеклянную пробирку (А).
- 3) Поместите в неё 0,8– 1,5 мг α -химотрипсина и взвесьте точно.
- 4) Добавьте раствор 4% SDS-1мМ HCl до концентрации α -химотрипсина 4 мг/мл.
- 5) Поместите пробирку в кипящую воду на 3 мин.
- 6) Добавьте 1/2 объема H₂O и 1/2 объема 4^x буфера для пробы.
- 7) Для получения пробы исходного, не восстановленного α -химотрипсина смешайте в пробирке №6 125 мкл H₂O и 125 мкл раствора из пробирки А.
- 8) Для получения восстановленной пробы смешайте в пробирке №5 125 мкл раствора из пробирки А и 125 мкл раствора дитиотреитола.

Таким образом, имеются следующие образцы белков:

№ 1 - набор маркерных белков,

№2 - набор окрашенных маркерных белков,

№5 - восстановленный α -химотрипсин,

№6 - исходный, не восстановленный α -химотрипсин

Составьте план распределения проб по дорожкам геля (табл.3.4), т.е. укажите для каждой из дорожек объёмы вносимых проб в мкл, причем общий объем, приходящийся на одну дорожку, не должен превышать 20 мкл.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
№1																
№2								5мкл								
№5																
№6																

табл. 3. 4. План распределения проб по дорожкам геля.

Дорожка №8 загружается цветным маркером для наблюдения за ходом электрофореза

Рекомендуемая нагрузка на полоску белка составляет 0,5-1мкг.

3.3. Проведение электрофореза.

- 1 Внесите пробы в карманы в соответствии с планом.
2. Заполните внутреннюю камеру полностью.
- 3 Закройте прибор крышкой и подсоедините его к блоку питания.
4. Установите ток, равный 25 мА.
5. После входа белков в разделяющий гель установите 35 мА
6. Выключите напряжение, когда лидирующий краситель (или полоса аprotинина – при использовании цветных маркеров) дойдет до нижнего края геля.
7. Разъедините стекла и снимите одно из них.
8. Держа стекло с гелем над контейнером с краской гелем вниз, освободите угол геля и осторожно переместите его в контейнер.

3.4. Окрашивание гелей и обработка результатов.

Окрашивание и отмывание проводите в вытяжном шкафу, гель держите в закрытом контейнере, оставляйте шкаф с опущенным стеклом.

1. Приготовьте раствор краски, содержащий 0,1% кумасси R 250 в 40% этаноле или изопропанолем и 10% уксусной кислоте.
2. Оставьте гель в краске на 2 часа.
3. Приготовьте отмывающий раствор, содержащий 10% этанол и 7,5 % уксусную кислоту.
4. После вынимания сполосните гель дистиллированной водой.
5. Меняйте отмывающий раствор по мере вымывания краски из геля .

После появления полос и почти полного обесцвечивания фона сполосните гель, расположите его между стеклами на подсветке и измерьте расстояния от дна карманов до линий. Постройте зависимости IgM от R_f , определите молекулярные массы. Объясните полученные результаты.

Литература.

1. Fr. Kohlrausch. Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen. (О перемещении концентрации внутри растворов и их перемешивании). *Annalen der Physik und Chemie*, 1897, 62, №10, 209-239.
2. Л.А.Остерман. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., Наука, 1981.
3. Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М., Мир, 1982.
4. L.M. Hjelmeland and A. Chrambach. The impact of L.G. Longworth (1905-1981) on the theory of electrophoresis. *Electrophoresis*, 1982, 3, 9-17.
5. Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Управляющая функция для любой точки разбавленного раствора.

Изложено по работе Ф. Кольрауша 1897 г.

Однородная жидкость во время электролиза остается неизменной, не считая загрязнения продуктами электролиза. В неоднородной же по составу жидкости движение ионов в электрическом поле сопровождается локальными изменениями концентрации.

Общие уравнения.

Пусть имеется смесь катионов A, B, \dots и анионов R, S, \dots . Обозначим их концентрации* в данной точке раствора в данный момент времени $\alpha, \beta, \dots, \rho, \sigma$; при этом всюду внутри должно быть соблюдено условие электронейтральности:

$$(1) \quad \alpha + \beta + \dots = \rho + \sigma + \dots$$

Градиенту потенциала E в каком-нибудь направлении соответствует скорость в том же направлении:

$$\begin{array}{lll} +a E \text{ для катионов } A, & +b E \text{ для катионов } B & \text{и т.д.} \\ -r E \text{ для анионов } R & -s E \text{ для анионов } S & \text{и т.д.} \end{array}$$

Коэффициенты a, b, \dots, r, s , которые называются электрическими подвижностями ионов, постоянны лишь в разбавленных растворах, в целом же являются эмпирически определяемыми величинами, которые зависят от степени диссоциации и электрического трения соответствующих ионов и тем самым от концентрации собственных и прочих ионов в данной точке.

Если V – значение потенциала в данной точке, имеем следующие компоненты скоростей ионов в декартовых координатах:

$$(2) \quad \begin{array}{ll} \text{для катиона } A & -a \partial V / \partial x, -a \partial V / \partial y, -a \partial V / \partial z; \\ \text{для аниона } R & +r \partial V / \partial x, +r \partial V / \partial y, +r \partial V / \partial z; \end{array}$$

и, соответственно, для других ионов с множителями $-b, \dots$ и $+s, \dots$

Элемент объема $dx dy dz$ получает за время dt через переднюю площадку $dy dz$ следующую массу катионов A :

$$-a \alpha dy dz dt \partial V / \partial x,$$

в то время как через вторую площадку выходит:

* Концентрации выражены в электрохимических эквивалентах на единицу объема, умноженных на число Фарадея.

$$-a \alpha \, dy \, dz \, dt \, \partial V / \partial x - \partial / \partial x (a \alpha \partial V / \partial x) \, dx \, dy \, dz \, dt.$$

Прирост составляет, таким образом:

$$+ \partial / \partial x (a \alpha \partial V / \partial x) \, dx \, dy \, dz \, dt.$$

Прибавим к этому соответствующие выражения для обеих остальных пар плоскостей, разделим сумму на величину объёма $dx \, dy \, dz$ и получим прирост концентрации α за время dt . Итак,

$$(3a) \quad \partial \alpha / \partial t = \partial / \partial x (a \alpha \partial V / \partial x) + \partial / \partial y (a \alpha \partial V / \partial y) + \partial / \partial z (a \alpha \partial V / \partial z).$$

Для катиона B справедливо такое же выражение с заменой a, α на b, β и т.д.

Для анионов надо изменить знак, так что

$$(3b) \quad \partial \rho / \partial t = -\partial / \partial x (r \rho \partial V / \partial x) - \partial / \partial y (r \rho \partial V / \partial y) - \partial / \partial z (r \rho \partial V / \partial z)$$

и т.п. для остальных.

Другая форма дифференциальных уравнений.

Часто используется следующая удобная форма уравнений. Часть плотности тока в каком-нибудь направлении движения ионов выражается через произведение концентрации и скорости ионов в этом направлении. Таким образом, плотность тока, переносимого катионами A в направлении x , составляет $-a \alpha \partial V / \partial x$, для анионов R , учитывая, что знак скорости меняется, $-r \rho \partial V / \partial x$ и т.д.

Общая плотность тока в направлении x , т.о.:

$$(4) \quad i_x = -\partial V / \partial x (a \alpha + b \beta + \dots + r \rho + s \sigma + \dots)$$

и т.д. Выразим проводимость раствора в виде:

$$(5) \quad \kappa = a^* \alpha + b^* \beta + \dots + r^* \rho + s^* \sigma + \dots;$$

тогда имеем

$$(6) \quad -\partial V / \partial x = i_x / \kappa, \quad -\partial V / \partial y = i_y / \kappa, \quad -\partial V / \partial z = i_z / \kappa.$$

Состояние непрерывности тока в проводниках описывается соотношением:

$$(7) \quad \partial i_x / \partial x + \partial i_y / \partial y + \partial i_z / \partial z = 0.$$

Подставим (6) и (7) в (3) и получим простую форму, которая вместо градиента потенциала содержит компоненты тока и проводимость:

$$\begin{aligned} \partial \alpha / \partial t &= -\partial / \partial x (a \alpha i_x / \kappa) - \partial / \partial y (a \alpha i_y / \kappa) - \partial / \partial z (a \alpha i_z / \kappa) = \\ &= -i_x \partial / \partial x (a \alpha / \kappa) - i_y \partial / \partial y (a \alpha / \kappa) - i_z \partial / \partial z (a \alpha / \kappa) - (\partial i_x / \partial x + \partial i_y / \partial y + \partial i_z / \partial z) a \alpha / \kappa. \end{aligned}$$

Так как вторая часть = 0, получим

$$(8a) \quad \partial\alpha/\partial t = -i_x \partial/\partial x(a\alpha/\kappa) - i_y \partial/\partial y(a\alpha/\kappa) - i_z \partial/\partial z(a\alpha/\kappa),$$

и, соответственно, для β Далее для анионов:

$$(8b) \quad \partial\rho/\partial t = +i_x \partial/\partial x(r^*\rho/\kappa) + i_y \partial/\partial y(r\rho/\kappa) + i_z \partial/\partial z(r\rho/\kappa) \text{ и т.д.}$$

.....
Разбавленные растворы.

Для разбавленных растворов подвижности a, b, \dots, r, s, \dots постоянны. В таком случае из (8) следует:

$$(9) \quad \partial\alpha/\partial t = -a [i_x \partial/\partial x(\alpha/\kappa) + i_y \partial/\partial y(\alpha/\kappa) + i_z \partial/\partial z(\alpha/\kappa), \text{ и т.д.}$$

$$\partial\rho/\partial t = +r [i_x \partial/\partial x(\rho/\kappa) + i_y \partial/\partial y(\rho/\kappa) + i_z \partial/\partial z(\rho/\kappa) \text{ и т.д.}$$

.....
Управляющая функция $\alpha/a + \beta/b + \dots + \rho/r + \dots$ для любой точки

разбавленного раствора.

Разделим последовательно уравнения (9) на a, \dots, r, \dots и сложим полученное; справа получают члены в виде

$$i_x \partial/\partial x [(\alpha + \beta + \dots - \rho - \sigma - \dots)/\kappa] \text{ и т.д.}$$

По условию электронейтральности сумма, стоящая в скобках, равна нулю.

Следовательно, получим:

$$(10) \quad 1/a \partial\alpha/\partial t + 1/b \partial\beta/\partial t + \dots + 1/r \partial\rho/\partial t + \dots = 0 \quad \text{или}$$

$$(11) \quad \boxed{\alpha/a + \beta/b + \dots + \rho/r + \dots = \text{const.}}$$

т.е. не зависит от времени. Эту сумму можно назвать управляющей функцией.

Если в начальный момент в какой-нибудь точке существуют концентрации

$\alpha_0, \beta_0, \dots, \rho_0$, а в любой более поздний момент - $\alpha, \beta, \dots, \rho$, то всегда

$$(11a) \quad (\alpha - \alpha_0)/a + (\beta - \beta_0)/b + \dots + (\rho - \rho_0)/r + \dots = 0.$$

Если, например, в процессе электролиза в некоторой точке раствора находился электролит A, R концентрации α , а со временем он заменился на электролит B, S , то концентрация последнего должна составлять такую величину β , чтобы

$$\alpha/a + \alpha/r = \beta/b + \beta/s \quad \text{или} \quad \alpha/\beta = ar/(a+r) : bs/(b+s)$$

.....