

## Изоэлектрическое фокусирование.

### История метода

В 1912 году Икеда и Сузуки опубликовали свои работы по выделению глутамата натрия с помощью электролизера, который состоял из трех отсеков, разделенных ионопроницаемыми мембранами. И принято считать появление на свет метода ИЭФ именно это время. В дальнейшем эта конструкция с различными модификациями использовала многими исследователями для разделения аминокислот и других амфолитов.

Существенный шаг вперед был сделан Вольтерманом и Вильямсом в 1929 году. Они увеличили число отсеков до 12, а также четко сформулировали принцип ступенчатого изменения рН при переходе от одного отсека к другому и установлению стационарного значения рН и накоплению амфолитов при значениях рН в соответствии с их изоэлектрическими точками (pI). Это означает, что амфолит будет перемещаться в электрическом поле до тех пор, пока не попадет в зону со значением рН, при котором степень его кислотной ионизации сравняется со степенью основной ионизации, т.е. непосредственно в зону его pI. Этот принцип был использован для выделения вазопрессина и окситоцина из экстракта гипофиза.

Другой важной датой в истории ИЭФ можно считать работу Тизелиуса (1941) по стационарному электролизу растворов амфолитов. В этой работе было показано, что при положительном электролизе достигается стационарное распределение концентраций электролитов и устанавливается равновесие между процессами электромиграции и тепловой диффузией.

Первые опыты по изоэлектрофокусированию не смогли привести к столь высоким результатам. Поэтому разработка метода

шла дальше. И в 1954-1955 гг. Колин разработал принцип фокусирования ионов в непрерывном градиенте рН со стабилизацией градиентом плотности раствора сахарозы. Им был предложен термин «изоэлектрический спектр». Формирование градиента рН достигалось благодаря диффузии буферных компонентов в электрическом поле. Разделяемые вещества помещались на границе раздела между кислым и щелочным буфером в приборе типа аппарата Тизелиуса. В подобных градиентах рН Колину удавалось получать наборы изоэлектрических линий красителей, белков, клеток, микроорганизмов и вирусов за промежутки времени от 40 секунд до нескольких минут, т.е. с очень высокой скоростью. В разделяющей ячейке Колина градиенту рН сопутствовали градиенты плотности, электропроводности и вертикальный температурный градиент. Весьма совершенной была и система оптической регистрации разделяемых веществ. В случае окрашенных образцов картина разделения в левом колене ячейки проецировалась на экран или небольшую стеклянную платину с матовой поверхностью и фотографировалось. Регистрация неокрашенных компонентов была основана на значительных изменениях коэффициента преломления света в зонах изоэлектрической линии. За задней стенкой ячейки, со стороны левого колена, помещали трафарет в виде параллельных тонких черных линий, наклоненных под углом 45 градусов к вертикальной оси электрофоретической колонки, и настраивали объектив для получения контрастной проекции.

### *Принципы ИЭФ.*

#### **Принципиальные различия между ИЭФ и обычным электрофорезом:**

При обычном электрофорезе разделяемая смесь исходно вносится в виде узкой зоны, как правило, со стороны катода. Разделение происходит в процессе вынужденной электромиграции образца в слое инертной матрицы (аце-

тилцеллюлоза, крахмал, агароза, полиакриламидный гель, сефадекс), насыщенной буфером с определенной рН. В отсутствие заметных молекулярно-силовых явлений белковые зоны мигрируют с постоянной скоростью, поскольку в данном буферном растворе они несут постоянный суммарный поверхностный заряд. В рассматриваемом примере это соответствует миграции двух компонентов, А и Б, при постоянных значениях заряда, которые можно определить по кривым титрования. При данном фиксированном значении рН=9 суммарный поверхностный заряд для белков А и Б составляет -3 и -1 соответственно. По мере продвижения обоих компонентов от точки нанесения к аноду компонент А будет постоянно опережать Б. В то же время обе зоны в ходе электрофореза будут уширяться, поскольку в данной системе ничто не противодействует тепловой диффузии макромолекул. При обычном электрофорезе стационарное состояние в принципе недостижимо и процесс разделения необходимо прервать в какой-то момент прежде, чем произойдет элюция мигрирующих компонентов в анодную камеру.

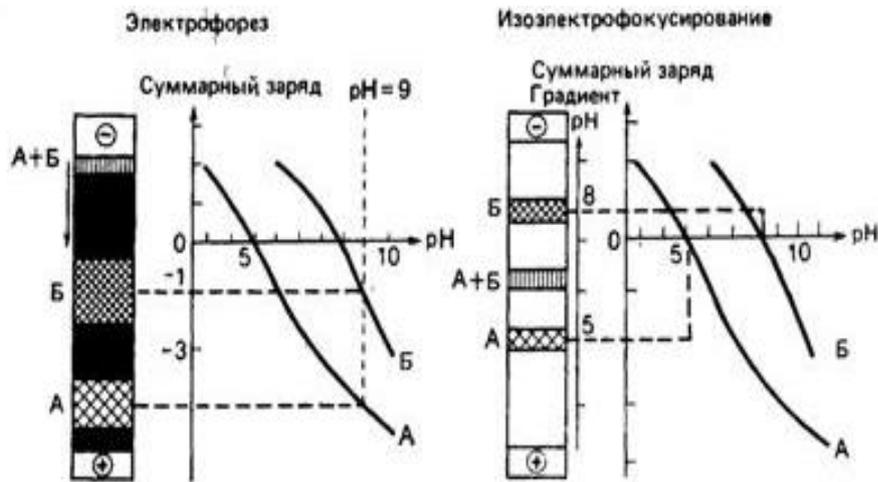


Рис. 1.3. Сравнение зонального электрофореза (слева) и ИЭФ (справа). В каждом случае проводится разделение смеси двух белков А ( $pI=5$ ) и Б ( $pI=8$ ), кривые титрования которых показаны справа. При обычном электрофорезе в среде поддерживается постоянное значение рН=9, при котором оба макроиона обладают постоянным суммарным отрицательным зарядом и мигрируют с постоянными скоростями (в отсутствие дифференцированных молекулярно-силовых эффектов антиконвекционной среды разделения). В ходе фракционирования зоны диффундируют. В случае ИЭФ белки мигрируют с постоянно убывающей скоростью по направлению к стационарным зонам нулевого заряда ( $pH=pI$ ). (С любезного разрешения фирмы LKB Produkter AB.)

При ИЭФ, напротив, устанавливается стабильный градиент увеличения рН в направлении от анода к катоду, формирующийся за счет электрофоретической сортировки амфолитов носителей в подходящей антиконвекционной жидкой среде. Попадая в такую систему белки или иные амфотерные молекулы начинают мигрировать в электрическом поле в соответствии со своими значениями поверхностного заряда. Так, если молекула на данном участке градиента при данном значении рН заряжена положительно, то она будет мигрировать к катоду, т. е. в сторону увеличения рН. По мере продвижения по-

ложительный заряд этой молекулы будет уменьшаться, а отрицательный возрастать, например за счет депротонирования аминогрупп и карбоксилов. В итоге молекула достигнет такой зоны, где ее электрический заряд окажется равным нулю, т. е. зоны с  $pH$ , равным  $pI$  этой молекулы.

Следовательно, в процессе ИЭФ скорость миграции белка постоянно уменьшается, поскольку его суммарный поверхностный заряд, соответствующий положению равновесия протонирования -депротонирования (которое в каждой точке определяется положением кривой титрования данного белка), также уменьшается, стремясь к нулю. В конце концов миграция белка полностью прекращается. Как только молекула случайно выйдет за пределы зоны  $pI$ , она тотчас приобретет отличный от нуля заряд и вынуждена будет вернуться к равновесному положению. Таким образом, электрическое поле прямо противодействует диффузии, и при соответствующих условиях белки или иные амфотерные макромолекулы достигают равновесного положения, вблизи которого они концентрируются в виде необычайно узких зон. Разделение двух амфолитов помимо всего прочего определяется крутизной градиента  $pH$ , в котором происходит фокусирование. При данной геометрии разделительной колонки (при неизменной длине пути) разрешение тем выше, чем положе градиент.

#### Разделение амфолитов в зависимости от крутизны градиента

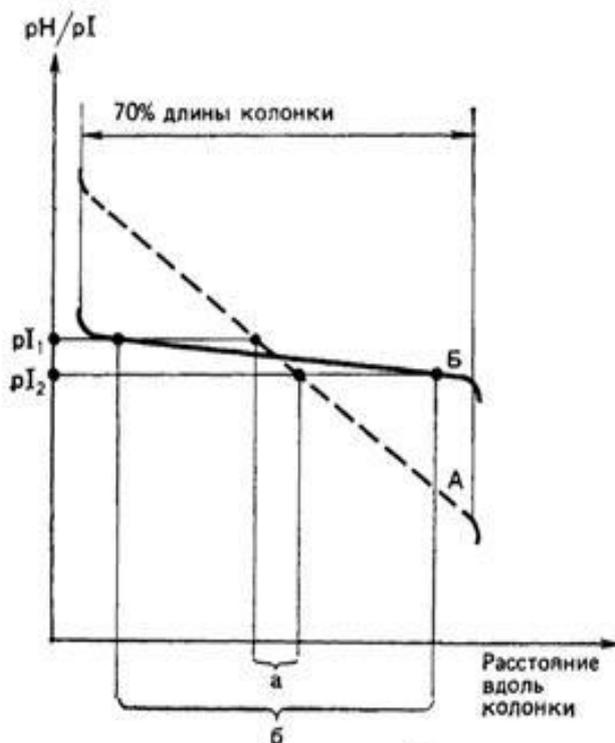


Рис. 1.4. Разделение амфолитов в зависимости от крутизны градиента  $pH$ . В крутом градиенте  $pH$  (пунктирная линия А) два типа амфотерных молекул с изоточками  $pI_1$  и  $pI_2$  расходятся лишь на небольшое расстояние (а). В более пологом градиенте  $pH$  (сплошная линия Б) разрешение значительно выше (расстояние б). (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

## Эффект фокусирования, или конденсирования, при ИЭФ.

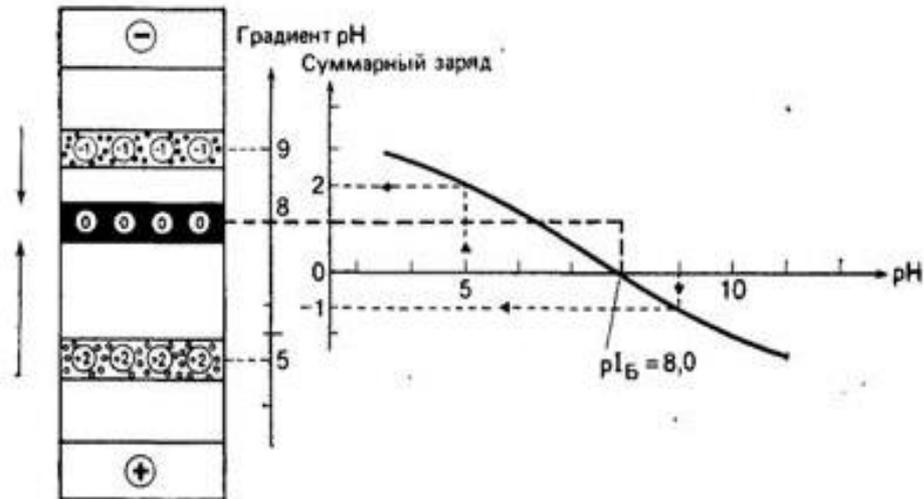


Рис. 1.5. Эффект фокусирования, или конденсирования, при ИЭФ. Один и тот же белок ( $pI=8,0$ ) вносят в гель с предварительно сфокусированным градиентом  $pH$  двумя порциями — у катода (зона отрицательного заряда) и у анода (зона положительного заряда для данного белка). Обе исходные зоны будут мигрировать навстречу друг другу и в итоге конденсироваться, или фокусироваться, в виде одной зоны нулевого заряда и нулевой подвижности. Справа приведена кривая зависимости подвижности (заряда) белка от  $pH$  среды. (С любезного разрешения LKB Produkter AB.)

После внесения одного и того же белкового иона ( $pI=8$ ) в заранее сформированный градиент  $pH$  в виде двух зон — со стороны катода (при  $pH9$ ) и со стороны анода (при  $pH5$ ) — эти зоны приобретут заряды противоположного знака. Это приведет к их встречной миграции вплоть до полного слияния в одну зону, содержащую белковые молекулы с нулевым суммарным зарядом и нулевой подвижностью ( $pH=pI=8$ ). В этой стационарной зоне достигается динамическое равновесие между тепловой диффузией и электрофоретической миграцией по направлению к изоточке.

Таким образом, выявляются две существенные особенности ИЭФ, отличающие его от электрофореза: белки мигрируют с замедлением, а начальный объем препарата не влияет на конечное положение белковой зоны. Молекулы разных белков фокусируются в различные узкие зоны — так осуществляется фракционирование белковой смеси по значениям  $pI$  входящих в нее белков. Эти зоны будут оставаться очень узкими неограниченно долго, пока сохраняется электрическое поле. Конечно, молекулы белка в результате тепловой диффузии могут случайным образом покидать зону фокусирования, но при попадании в более кислую или щелочную среду они будут заряжаться и под действием электрического поля возвращаться обратно, в зону фокусирования.

Важно подчеркнуть одно обстоятельство, которое часто недооценивается при трактовке сложных картин при ИЭФ. В процессе ИЭФ участвуют не все ионогенные группы данного белка, а только те, которые лежат на поверхно-

сти белковой глобулы и контактируют с растворителем. Только они могут диссоциировать, определяя суммарный заряд белка. В силу этого значение  $pI$  для одного и того же белка в разных конформациях может изменяться. Конформационные перестройки могут происходить в результате окисления, разрыва внутримолекулярных дисульфидных мостиков, при частичной денатурации белка, при образовании комплексов с липидами, углеводами, и др. Наконец, это может произойти просто в силу присущей данному белку конформационной изометрии. Таким образом, наличие двух близкорасположенных линий после ИЭФ еще не говорит о разделении двух различных по первичной структуре белков.

Особенностью ИЭФ является и то, что он позволяет легко определять такой параметр белка, как  $pI$  – измерением  $pH$  в точке градиента, где находится зона этого белка после ИЭФ.

Изначально ИЭФ было разработано как препаративный метод. Фракционирование проводили в градиенте плотности раствора сахарозы, который служил антиконвекционной средой, стабилизирующей градиент  $pH$  и сфокусированные белковые зоны. Эксперименты обычно выполняли в колонках объемом 110 или 440 мл; равновесие устанавливалось лишь через 2–4 суток. Проведение ИЭФ в этих условиях требовало большой затраты времени и тщательной стандартизации всех условий эксперимента. Определенные сложности возникали в связи с изоэлектрической преципитацией образцов, а также в связи с размыванием зон при опорожнении колонки в отсутствие электрического поля. В таком варианте метод был явно непригоден для проведения рутинных анализов. Многие недостатки, присущие ИЭФ в градиенте плотности, удалось преодолеть с введением более удобных антиконвекционных систем, таких, как полиакриламидный гель, сефадекс или агарозная матрица. Это позволило полностью реализовать широкие возможности ИЭФ – высокоэффективного метода разделения амфотерных макромолекул. Методология ИЭФ в геле в настоящее время достаточно хорошо разработана как для аналитического разделения, так и для препаративных вариантов разделения

ИЭФ можно рассматривать как «нулевой» метод, так как в процессе разделения частицы достигают равновесного положения и фокусируются в зонах «нулевой силы» (Kolin, 1977). Проанализировав теоретические основы ИЭФ, он пришел к выводу, что его можно включить в определенную группу методов, основанных на принципе «изоперихорического фокусирования»

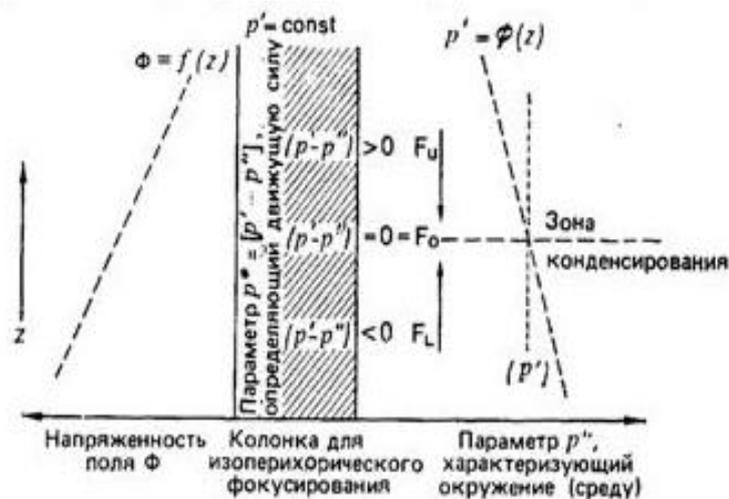


Рис. 1.6. Изоперихорическое фокусирование. Внутри колонки создается среда, характеризующаяся параметром  $p''$ , который постепенно изменяется вдоль оси  $z$  [ $p'' = \varphi(z)$ ]. Частицы вещества, характеризующиеся значением  $p'$  соответствующего параметра, произвольным образом распределены в разделительной колонке. Предполагается, что в градиенте  $p''$  имеется точка, в которой  $p' = p''$  (зона фокусирования, или конденсирования). (Kolin, 1977.)

Общая особенность подобных методов заключается в том, что разделяемые компоненты, мигрирующие в поле движущей силы вдоль концентрационного градиента, распределяются по колонке в виде узких стационарных зон. Внутри этих зон устанавливается такое соотношение между определенными физическими параметрами частиц данного типа и соответствующими параметрами поддерживающей среды, что для этих частиц движущая сила стремится к нулю. К процессам такого типа можно отнести изопикническое, изокондуктивное, изодиэлектрическое, изомагнитное, изопарамагнитное и изодиамагнитное фокусирование.

На рисунке представлена обобщенная схема изоперихорического фокусирования. К разделительной ячейке (или изоперихорической фокусирующей колонке) прикладывается поле напряженностью  $\Phi = f(z)$ . Специфическая химическая среда  $p'' = \varphi(z)$  внутри колонки формируется предварительно или возникает непосредственно за счет действия поля. Эта среда фактически выступает в роли источника противодействующей силы, которая, придя в соответствие с неким физико-химическим параметром  $p'$  данного соединения, уравнивает внешнюю данную силу  $\Phi$ . Таким образом, это соединение попадает в зону динамического равновесия двух противоположно направленных сил  $F_U$  и  $F_L$  и остается в ней.

## Равновесные методы фракционирования.

Таблица 1.1. Равновесные методы фракционирования

Метод	Поддерживающая среда	Определяемый параметр	Нижний предел разрешения
Изоэлектрическое фокусирование	Сахароза, полиакриламидный или агарозный гель	$pI^{1)}$	0,005 $pI^{4)}$
Изопикническое центрифугирование	Сахароза, CsCl	$\rho^{2)}$	0,003 $\rho^{3)}$
Электрофорез в градиенте пористости геля	Полиакриламидный гель	$R_S^{3)}$	3 000 дальтон <sup>6)</sup>

<sup>1)</sup> Изоэлектрическая точка.  
<sup>2)</sup> Плотность (г/см<sup>3</sup>).  
<sup>3)</sup> Стоксов радиус.  
<sup>4)</sup> Allen R. C., Hasley, R. A., Talamo R. C. (1974). Am. J. Clin. Pathol. 62, 732—739.  
<sup>5)</sup> Dawin I. B., Wolstenholme D. R. (1968). Biophys. J. 8, 65—70.  
<sup>6)</sup> Для глобулярных белков. Margolis J., Kenrick K. G. (1968). Anal. Biochem. 25, 347—362.

### Амфолиты для ИЭФ

Градиент рН создает само электрическое поле. Это обусловлено особыми свойствами среды. Она представляет собой водный раствор смеси большого количества различных типов амфотерных молекул сравнительно небольшой молекулярной массы (300-900). Такого рода смеси для ИЭФ выпускаются под различными фирменными названиями: амфолины, фармалиты, сервалиты и биолиты.

Особенностью амфотерных веществ такого рода является то, что при растворении в воде каждое из них стремится изменить рН раствора таким образом, чтобы приблизить его к своему значению  $pI$ . При этом протоны диссоциируют от остатков кислот и присоединяются к аминогруппам. Для осуществления ИЭФ амфолиты не только должны задавать каждой точке градиента определенное значение рН, но и обеспечивать в этой точке буферную емкость, достаточную для того, чтобы это значение не зависело от присутствия белка в растворе.

### Создание градиента рН

Первоначально во всем объеме жидкости растворяют до суммарной концентрации 1-2% смесь всех амфолитов, перекрывающих выбранный интервал значений  $pI$ . В состав смеси входят амфолиты с различными значени-

ями  $pI$  примерно в эквимольном соотношении. Как и в случае смеси различных буферов, их совокупное воздействие на водную среду определит некоторое среднее значение  $pH$ , одинаковое по всему объему трубки или пластины. При этом  $pH$  лишь один из амфолитов (если для него  $pI=pH$ ) может оказаться незаряженным. Для всех остальных значений  $pI$  будут более или менее заметно отличаться от исходного  $pH$  смеси, поэтому практически все амфолиты окажутся положительно или отрицательно заряженными.

При наложении электрического поля все амфолиты начнут мигрировать в направлении анода или катода в зависимости от знака их заряда. Никаких других ионов в растворе быть не должно

Быстрее других будут двигаться амфолиты с максимальным значением  $pI$ , т.к. при исходном  $pH$  они несут наибольший положительный заряд. Чтобы избежать их выхода из рабочей зоны градиента и попадания на сам катод, последний помещают в слабый раствор щелочи, где положительный заряд амфолитов нейтрализуется и они останавливаются. Там же, вблизи катода, будут первоначально находиться и амфолиты с меньшими значениями  $pI$ . Однако по мере повышения в этой зоне содержания амфолитов с максимальным  $pI$  исходная эквимольная пропорция будет нарушаться в пользу последних. Они будут «навязывать» раствору локальный сдвиг  $pH$  в щелочную сторону. Это ускорит уход отрицательно заряженных амфолитов с меньшим  $pI$ , и дальнейшему защелачиванию раствора. Это будет происходить до полного вытеснения прочих амфолитов, а область градиента катода окажется занятой только молекулами амфолита с максимальным значением  $pI$ . Соответственно и  $pH$  раствора в этом месте окажется равным этому же значению.

В это же время аналогичная «борьба» за место поближе к аноду будет происходить под действием поля с противоположного конца трубки или пластины. Здесь крайнее положение останется за амфолитами с наименьшим значением  $pI$ , которые первоначально имели наибольший отрицательный заряд. От выхода к аноду их там удерживает слабый раствор кислоты.

В результате описанного процесса все амфолиты «выстраиваются» вдоль электрического поля от анода к катоду в порядке возрастания значений  $pI$ . Все они при этом нейтрализуются и обеспечивают буферную емкость раствора в своем месте. Такое положение сохраняется до тех пор, пока электрическое поле существует.

В результате диффузии и близости значений  $pI$  соседних амфолитов границы между зонами сглаживаются и получается практически линейный градиент  $pH$

### **Проблема электропроводности**

«Расставленные по своим местам» амфолиты утрачивают заряд, из чего будто бы следует, что они не могут участвовать в проведении электрического тока. Но других носителей тока практически нет. Между тем, для обеспечения миграции белков вдоль градиента  $pH$  и для поддержания самого градиента необходимо наличие электрического поля – жидкость должна оставаться

электропроводящей. На практике электропроводность раствора сильно снижается, но не до нуля.

Суммарный заряд всех молекул при  $pH=pI$  равен нулю, причем не только за счет молекул, действительно электронейтральных, которых подавляющее большинство, но и за счет некоторого (и одинакового) числа ионов того и другого знака. Это происходит за счет динамического равновесия процессов ионизации и нейтрализации.

Описанное явление обеспечивает стационарный уровень электропроводности в любой точке установившегося градиента  $pH$ . При протекании тока градиент не «смазывается»: ионы амфолитов, покидающие под действием поля область своего сосредоточения, попадают в соседний участок градиента с иным  $pH$ ; там они легко разряжаются, отдавая свой заряд амфолитам этого участка, и останавливаются; разрядившиеся ионы приобретают противоположный заряд, что заставляет их вернуться в свою исходную зону.

Таким образом, возникает своеобразная эстафета с передачей зарядов ионами амфолитов, совершающих колебательные движения в окрестностях своих зон сосредоточения. Вдоль градиента  $pH$  протекает вполне заметный электрический ток, а сам градиент остается при этом неизменным.

### **Опасность образования слоя чистой воды.**

Желательно, чтобы амфолиты были равномерно распределены по всему градиенту  $pH$ . Особенно это важно в области нейтральных значений  $pH$  во избежание образования там слоя чистой воды. Если такой слой возникает, то в силу его малой электропроводности произойдут сильный разогрев и искажение соседних участков градиента  $pH$  за счет усиленной диффузии. Кроме того, в слое чистой воды сконцентрируется практически все напряжение источника тока, так что фокусирующий эффект градиента в целом окажется очень малым.

Ввиду этого при составлении кислой или щелочной рабочей смеси амфолитов нередко добавляют в небольшой концентрации еще и амфолиты для нейтральной области  $pH(6-8)$ . Они заполняют участок перехода от рабочего градиента к одному из электролитов.

### **Разрешающая способность. Выбор диапазона $pH$ .**

Разрешающая способность – это минимальное различие  $pI$  двух белков, которое еще обеспечивает четкое разделение соответствующих зон (полос).

Разделение будет лучше в случае крупных белков ввиду уменьшения расширения полос за счет диффузии. Кроме того, разделению двух близких по значениям  $pI$  белков должно способствовать повышение напряженности электрического поля и уменьшение крутизны градиента  $pH$ . Чем более пологий градиент, т.е. чем меньше интервал изменения  $pH$ , перекрывающий всю длину трубки или пластины, тем дальше будут отстоять друг от друга полосы белков, незначительно отличающихся по величине  $pI$ , тем лучше разрешение. Однако при этом увеличивается длительность процесса ИЭФ.

Амфолиты, обеспечивающие широкий интервал рН, удобны для исследования сложных смесей белков с неизвестными значениями рI, тогда как амфолиты с узким интервалом – для тонкого фракционирования белков с близкими и приблизительно известными значениями рI.

В некоторых случаях линейный характер градиента рН не является оптимальным – когда в одном опыте желательно отделить все не интересующие исследователя белки, не заботясь об их фракционировании, но одновременно провести тонкое разделение белков, лежащих в определенном узком диапазоне рН. Для этой цели удобен градиент с «площадкой».

Такую форму градиента нетрудно получить, если к раствору с умеренной (0,5-1%) концентрацией амфолитов широкого диапазона рН добавить в такой же или большей концентрации амфолиты для интересующего интервала рН. Благодаря своей повышенной (суммарной) концентрации амфолиты добавленного интервала оттеснят другие амфолиты к краям градиента, куда в процессе ИЭФ отойдут и ненужные белки. В то же время для представляющих интерес белков будут созданы условия тонкого фракционирования в пологом градиенте рН.

### **Физико-химические особенности амфолитов**

Желательно, чтобы амфолиты максимально отличались от белков по способу окраски, легкости отделения и др.

Подробно изучены амфолины фирмы «ЛКВ». Молекулярная масса амфолинов ограничена интервалом в 300-900 дальтон, что позволяет отделить их от сфокусированных белков после опорожнения колонки или элюции из геля с помощью гель-фильтрации, диализа или высаливания. За счет присоединения к двум соседним азотным группировкам амфолины способны хелатировать металлы. При этом наибольшей активностью отличаются амфолины интервала рН 8,5–10. Наибольшая хелатирующая эффективность – для ионов двухвалентной меди.

Токсичностью по отношению к белкам амфолины не обладают.

### **Эндосмос.**

Его суть заключается в том, что с неподвижной матрицей геля всегда связано некоторое количество заряженных ионогенных групп (чаще всего отрицательных). Их соответствующие противоионы находятся в растворе. Под действием электрического поля они мигрируют к катоду, понемногу увлекая за собой и жидкость, находящуюся внутри геля. На смену им приходят катионы из анодного электролита. Вместе с жидкостью в направлении катода дрейфует и весь градиент рН. Ввиду длительности процессов ИЭФ этот дрейф может существенно сместить картину распределения белков. Явление эндосмоса сильнее выражено в щелочной области рН.

# **Аналитические варианты ИЭФ**

## **ИЭФ в цилиндрических ПААГ**

Используют прибор для обычного аналитического фракционирования, только поменяли центральный блок прибора на аналогичный блок, рассчитанный на трубки большего размера. Трубки закрепляют в соответствующих гнездах с резиновыми прокладками между двух параллельных дисков, образующих герметичный центральный отсек. В этом отсеке циркулирует охлаждающая жидкость с температурой 1 градус. Кольцевые платиновые электроды расположены в верхних и нижних отсеках, близко к концам трубок, для сведения к минимуму выхода амфолитов из геля и подавления катодного дрейфа градиента pH. В препаративном варианте прибор содержит 6 трубок с гелем – 3 трубки объемом по 50 мл (диаметр 2 см), 2 – по 20 мл (диаметр 1.2 см) и 1 контрольную трубку объемом 2 мл при внутреннем диаметре 2 мм. Трубки (стеклянные или пластиковые) имеют в длину 16 см.

Заполимеризованные гели выдерживают при температуре 4 градуса Цельсия. Максимальная нагрузка для самых широких трубочек составляет около 200 мг белка. Образцы можно наносить на верхний торец геля или же включать в состав исходного раствора мономеров до полимеризации геля.

Разрешающая способность такого метода высокая. Как и в других гелевых средах, концентрация белка в зоне может быть настолько высока, что даже неокрашенные сфокусированные белки часто хорошо различимы невооруженным глазом: они имеют вид матовых дисков.

Основными проблемами препаративного фракционирования ПААГ связаны с обнаружением и извлечением белков после ИЭФ.

## **Основные этапы ИЭФ в цилиндрических ПААГ.**

### **1.Трубочки**

1.1.Замотать парафильмом наиболее сколотый конец (на верхнем крае допускаются сколы не более 2-3 мм), установить манжету и поставить в штатив. Выровнять нижний конец трубочек по срезу выреза камеры.

На 4 трубочки необходимо:

Мочевина – 1г

Вода – 680 мкл

Акрил – 260 мкл

Амфолиты 3-10 – 35 мкл

Амфолиты 5-8 – 70 мкл

Все растворить и дать постоять.

Добавить CHAPS – 120 мкл стока (30 % CHAPS и 10% NP40 с амберлитовой смолой)

Дегазировать.

Добавить PSA (10%) – 4 мкл и TEMED 2мкл.

1.2.Набрать взвесь в шприц с длинной иглой(весь объем), опустить игле до конца в трубку и сильно надавить на поршень, чтобы не допустить образования пузырей. Гель заливается по верхнему обрезу штатива (18 см общая длина трубочки). После заливки всех трубочек постучать штативом по столу, чтобы выгнать пузыри.

1.3. 2 часа на полимеризацию.

1.4. Сток CHAPS:

На 4 мл воды – 1.2г CHAPS и 400 мкл NP40. Растворять около 15 минут в ультразвуковой бане, предварительно замотав пробку парафильмом или на ночь на столе.

Программа фокусировки:

100-200-300-400-500-600- по 1 часу

700 Вт – 10 часов

900 Вт – 10 часов (фактически получается 1-1.5 часа)

Сила тока не должна превышать 0.7 мА

## **2.Буферы**

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

2.Нижний буфер(фосфатный) – 20 мМ ортофосфорная кислота

3. После полимеризации снять с трубочек парафильм, проверить, нет ли пузырьков воздуха.

4. Внести пробы шприцем на поверхность гелей, сразу наслить верхний буфер до края, стараясь не перемешать пробу и буфер.

Примечание. Нижний буфер заливать всегда свежий.

5. Установить штатив с трубочками. Набрать в шприц нижнего буфера и «повесить» снизу у каждой трубочки каплю. Установить рамку в камеру, залить верхний буфер (трубочки и электроды закрыть). Следить, чтобы верхний и нижний буфера не взаимодействовали.

## **ИЭФ в горизонтальных пластинах ПААГ.**

Преимущества использования для ИЭФ тонких горизонтальных пластин:

1. Препарат можно вносить в любое место открытой поверхности геля.
2. Можно одновременно вести ИЭФ многих препаратов в идентичных условиях.

3. Лабильные белки можно вносить в любой участок градиента рН уже после его формирования.
4. Интенсивный и равномерный теплоотвод.
5. Можно измерять рН и напряженность поля непосредственно на поверхности геля.
6. Удобство фиксации, окраски, фотографирования и автордиографии материала в геле.

В отличие от электрофореза объемы электродных буферов при ИЭФ желательнее свести до минимума.

### **ПААГ для ИЭФ.**

Приготовление смеси мономеров акриламида производят точно так же, как для электрофореза. Вносить в смесь ТЕМЕД нет необходимости, так как амфолиты сами играют роль катализаторов полимеризации.

Следует избегать внесения избытка персульфата аммония – он может окислять амфолиты и вносить искажения в градиент рН. При замене персульфата на рибофлавин следует иметь в виду, что такая замена возможна только для первоначального значения рН смеси амфолитов ниже 7,5.

ИЭФ удобно вести в крупнопористом ПААГ(5%). Для его полимеризации достаточно ввести персульфат аммония в концентрации 0,025%. Особенно высокие требования при ИЭФ приходится предъявлять к чистоте акриламида. Важно уменьшить содержание в нем акриловой кислоты, приводящей к возникновению эндосмоса.

Для подавления эндосмоса имеет смысл увеличить вязкость жидкой среды в геле, введя в нее до 10% глицерина.

### **Использование мочевины и детергентов.**

Из-за снижения растворимости белков вблизи изоэлектрической точки и опасности их осаждения иногда в состав геля для ИЭФ приходится вводить мочевины. Многие гидрофобные белки для своего растворения нуждаются в добавлении детергентов.

Мочевину можно использовать в высокой концентрации. Она должна быть надежно очищена и деионизирована с помощью бифункциональной ионообменной смолы.

Детергент, связываясь с белком, может вызвать артефакты дополнительного расщепления полос за счет маскирования каких-либо заряженных групп на поверхности белка или воздействия на характер их диссоциации.

### **Подготовка пластин и прибора.**

Подготовка и сборка формы для пластины геля, деаэрации смеси мономеров акриламида и амфолитов, добавление персульфата аммония, заливка в форму – все эти операции проводят так же, как при электрофорезе, но из-за глицерина деаэрацию следует вести дольше – около 10 мин.

Перед установкой на столик прибора готовой пластинки ПААГ или геля под них подкладывают специальный трафарет с сеткой, которую достаточно хорошо видно через гель. Это удобно для параллельного расположения полосок фильтровальной бумаги, на которые накладывают электроды. Между трафаретом и нижележащим охлаждающим столиком, а также между стеклом, на котором полимеризован гель, и трафаретом должен быть обеспечен надежный контакт для эффективного теплоотвода.

Полоски фильтровальной бумаги шириной 1 см накладывают прямо на гель, по краям его, параллельно друг другу, по трафарету. Бумага должна быть хорошо увлажнена. Платиновые электроды прижимают к полоскам влажной бумаги по всей длине специальными приспособлениями для равномерного контакта. ИЭФ в узком щелочном интервале рН ввиду значительного эндосмоса может приводить к перенасыщению катодной полоски фильтровальной бумаги и выступанию влаги на ее поверхности. Эту влагу нужно время от времени удалять.

### **Внесение препарата.**

ИЭФ в горизонтальной пластине, как и электрофорез, ведут одновременно для многих образцов в параллельных треках. При этом нет необходимости вносить исходные препараты равномерно по сечению пластины, например в колодцы.

Препарат в небольшом объеме жидкости (10-15 мкл) можно наносить в виде капли или полоски непосредственно на поверхность геля. Концентрация белка в препарате обычно должна составлять 5-10 мг/мл.

Полоски фильтровальной бумаги обычно снимают через час после начала фокусирования.

Выбор места нанесения препарата в гель может диктоваться возможностью сорбции на фильтровальную бумагу белков из исходной смеси и устойчивостью белка к кислым или щелочным воздействиям.

В отношении скорости фокусирования белки выгоднее вносить с той стороны геля, где большая их часть сильнее заряжена (кислые белки - со стороны катода, щелочные - со стороны анода). Следует также иметь в виду опасность агрегации белков в препарате, которая также может зависеть от рН.

Надежный критерий достоверности фракционирования белков – совпадение картин фокусирования при внесении препаратов как со стороны анода, так и со стороны катода.

Присутствие в исходном белковом препарате соли в относительно высокой концентрации (более 0,1М) может заметно исказить градиент рН и форму полос сфокусированных белков. Как и при электрофорезе, исходный препарат не должен содержать нерастворенных частиц белка, иначе будут появляться характерные «хвосты» у полос белка при фокусировании.

Белковый препарат можно вносить как с самого начала, так и после образования градиента рН в геле.

## **Электрический режим и время ИЭФ.**

Для ускорения процесса фракционирования белков желательно использовать максимально допустимую напряженность электрического поля. Ее ограничивает возможность эффективного отвода выделяемого тепла.

При ИЭФ целесообразно пользоваться источниками тока постоянной мощности, т.к. сопротивление геля по мере утраты зарядов амфолитами непрерывно увеличивается (напряжение увеличивается, сила тока падает). Плотность тока определяется напряженностью электрополя, которая в ходе ИЭФ может изменяться от 20-50 до 100-150 В/см. Это намного больше, чем при электрофорезе.

В указанных условиях для широкого градиента рН 3,5-9,5 процесс ИЭФ большинства белков занимает 1,5-2 ч. Для узких диапазонов рН разделение заканчивается за 3-4 ч. При этом предполагается, что через охлаждающий столик циркулирует вода при температуре 10<sup>0</sup>.

## **Измерение рН.**

После окончания ИЭ на пластине производят измерения рН в ряде точек вдоль градиента, используют специальные поверхностные стеклянные электроды с диаметром мембраны 1,5-3 мм и расстоянием между электродами 3-5 мм. Ориентируясь по трафарету, измеряют рН в точках, отстоящих на 1 см друг от друга, и строят кривую фактического градиента рН. Поскольку рН зависит от температуры, измерения проводят, не снимая гель с охлаждающего столика прибора.

В концентрированном растворе мочевины рН градиента измеряется с некоторым завышением: 4М мочевины завышает значение на 0,3 ед.рН.

## **Окрашивание белковых зон.**

### **1. Быстрый зеленый.**

Применяют для регистрации зон при содержании белка не более 10 мкг. Гели погружают на 4-8 часа в 0.2% водный раствор красителя, содержащий 10% уксусной кислоты и 25% этанола.

### **2. Кумасси**

Перед окрашиванием белки фиксируют осаждением кислотой, одновременно стараясь удалить из геля амфолиты. Необходимость этого обусловлена образованием нерастворимых окрашенных комплексов амфолитов и белковых красителей. Обычно гель после ИЭФ вымачивают в течение 30-60 мин. в водном растворе с 3,5% сульфосалициловой кислоты и 10,5% ТХУ. Затем гель в течение 15 мин. промывают в водном растворе уксусной кислоты(8%) и этанола(25%). Окрашивают гель 0,1%-ным раствором красителя Кумасси ярко-голубого в этой же смеси в течение 10 мин. при 60<sup>0</sup>С. Избыток красителя отмывают в течение 12-18 ч. тем же растворителем., с несколькими его сменами.

### 3.Окрашивание серебром.

Используют для гелей толщиной 1.5 мм и размером 20X20.

#### 3.1. Фиксация

10% уксусная кислота и 20 % этанола не менее 1 часа

#### 3.2.Отмывка

Деионизированная вода 2 раза по 20-30 минут (15 мин 3 раза).

#### 3.3. Обработка тиосульфатом 2 минуты

#### 3.4. Отмывка в деионизированной воде 2 раза по 10 минут.

#### 3.5. Окраска серебром- 10-15 минут

#### 3.6. Отмывка в деионизированной воде 2-3 раза по 30 сек

#### 3.7. Проявка визуально.

#### 3.8.Остановк: 10% уксусная кислота, 15 минут

#### 3.9. Отмывка водой.

#### 3.10. Фиксация: 10% уксусная кислота, 15 минут

#### 3.11. Отмывка водой 20 мин

Раствор серебра:  $\text{AgNO}_3$  1 г\л + формалин (37%) 1 мл\л

Проявитель:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  40г\л +  $\text{NaS}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 20 мл раствора тиосульфата + формалин 1мл

Для дальнейшего хранения окрашенного геля его следует продержать около часа в 10% растворе глицерина в той же смеси. Затем гель вместе с пластиной можно обернуть смоченным целлофаном и высушить при комнатной температуре или при  $50^0$ . Влажный гель надежно прилипает к нитроцеллюлозной пленке и высыхает на ней при комнатной температуре или при обдувании его теплым воздухом без деформации.

Повышенной чувствительности и избирательности окрашивания белков после ИЭФ можно достичь в тех случаях, когда удастся использовать специфические ферментативные реакции, дающие окрашенные продукты.

При использовании кварцевой подложки сфокусированные белковые зоны можно регистрировать прямо в геле УФ-сканированием с помощью спектрофотометра.

Положение белковых зон можно также определить, быстро окрашивая полоски геля, отрезанных с двух концов пластины.

Белки извлекаются из геля с помощью обычной или электрофоретической элюции. Общий выход составляет примерно 74% белка.

### ***Препаративное изоэлектрофокусирование.***

ИЭФ является весьма эффективным методом препаративного фракционирования. Любой хороший препаративный метод должен обладать высокой разрешающей способностью и давать высокий выход при разделении значительных количеств материала без существенного изменения физико-химических или биологических свойств разделяемых объектов. ИЭФ удовлетворяет большинству этих критериев и имеет дополнительные преимущества. Например, в отличие от многих других методов ИЭФ позволяет добиться уникального сочетания высокой загрузки образца и хорошего разрешения. Другое преимущество ИЭФ заключается в том, что при надлежащем выборе интервала рН многие ненужные компоненты окажутся вовсе удалены из зоны фракционирования. Наконец. Поскольку ИЭФ – это равновесный метод, разделение сопровождается концентрированием разбавленных образцов.

С помощью различных экспериментальных приемов, использованных для выявления реальных возможностей ИЭФ, удалось подтвердить предсказанные теорией значения предельной загрузки и разрешающей способности метода при хороших выходах как по белку, так и по биологической активности. Среди удачных экспериментальных подходов к препаративному фракционированию можно отметить ИЭФ в вертикальных колонках со стабилизацией при помощи градиента плотности, в горизонтальных лотках со спонтанно образующимся градиентом плотности, в зонально-конвекционных системах, а также в сплошных полимерных гелях типа ПААГ или в гранулированных гелях типа сефадекса – в форме горизонтального слоя или в вертикальной колонке. Каждая система имеет свои преимущества. Некоторые из них, например, выигрывают за счет изоэлектрической преципитации.

### **Препаративное ИЭФ в жидкой среде.**

1. Колонки фирмы LKB
2. Колонки фирмы ISCO
3. Система Poly-Prep200
4. Колонки Свенссона (Рильбе)
5. Зонально-конвекционное ИЭФ по Вальмету
6. Зонально-конвекционное ИЭФ по Тальботу
7. Зонально-конвекционное ИЭФ по Денкла
8. Зонально-конвекционное ИЭФ в сплошной спирали
9. Зонально-конвекционное ИЭФ в «открытой спирали»

10. Жидкостное ИЭФ во вращающихся трубках по Хьертену
11. Многокамерные электролизеры
12. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Ханнигу
13. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Джасту и Вернеру
14. Высоковольтное ИЭФ в свободном потоке по Прусику
15. Циклическое ИЭФ в непрерывном потоке
16. Проточное ИЭФ в градиенте плотности
17. Стационарный реоэлектролиз

### Препаративное ИЭФ в гелях

#### 1. Проточное ИЭФ по Фоусетту

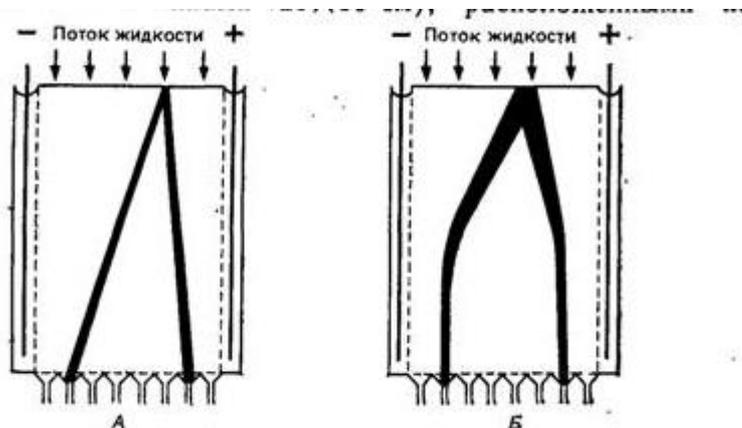


Рис. 2.21. Иллюстрация принципов проточного электрофореза (А) и проточного ИЭФ (Б). (Fawcett, 1973.)

Разделительная фокусирующая камера образована двумя охлаждаемыми пластинами, расположенными на расстоянии 0,3 см друг от друга. Электронные отсеки отделены от рабочего пространства камеры закрепленными по бокам полупроницаемыми мембранами, которые представляют собою пористые полиэтиленовые пластинки, в порах которых заполимеризован раствор акриламида. Разделительная камера заполнена слоем сефадекса G-100 (гранулированный полиакриламид), который снизу поддерживается мембранным фильтром. 54 выходных канала, расположенных в нижней части камеры присоединены к многоканальному перистальтическому насосу.

Преимущества:

А. Сфокусированные зоны в проточных системах находятся под действием электрического поля вплоть до выхода из разделительной камеры. Таким об-

разом, они меньше размываются и перемешиваются, чем при элюции из обычных градиентных колонок.

Б. Количество белка в зоне при проточном ИЭФ может быть достаточно большим, т. е. метод обладает достаточной пропускной способностью.

В. С помощью этой системы можно работать и в режиме «каскада», т. е. проводить сначала прикидочное разделение в широком диапазоне рН, а затем тонкое фракционирование в более узких градиентах рН.

### Проточная разделительная камера Квормби

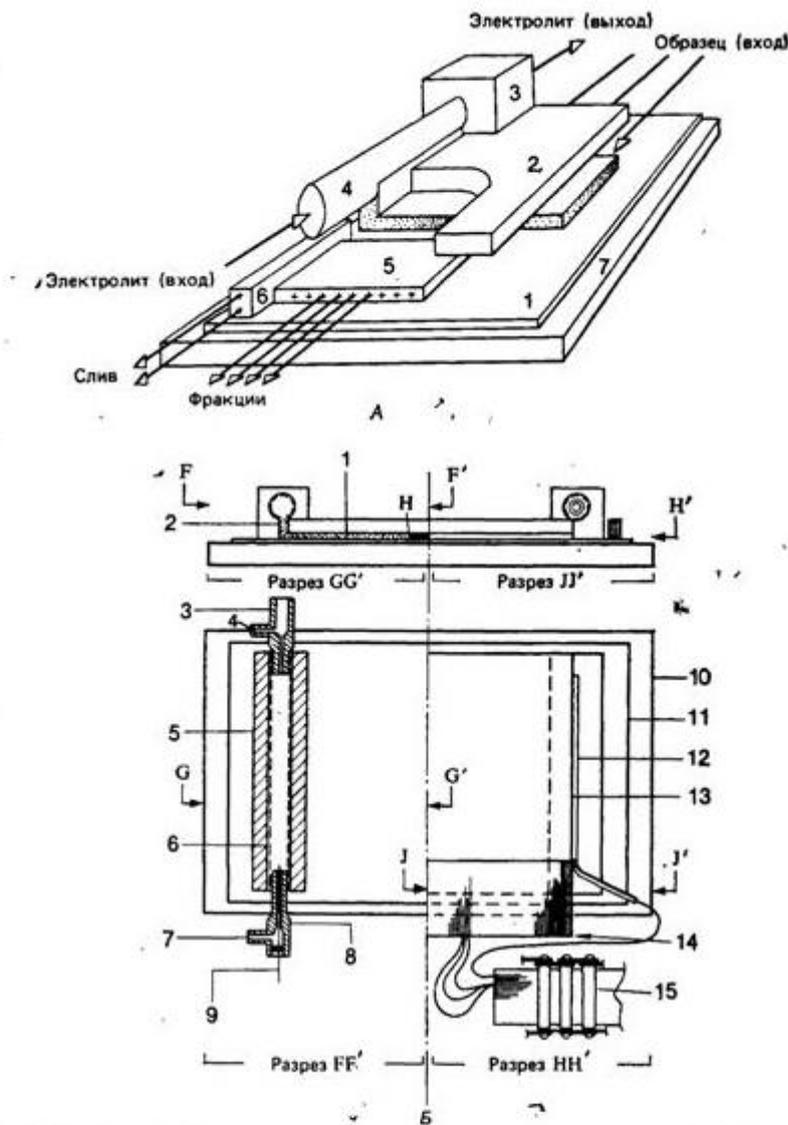


Рис. 2.22. А. Общий вид и устройство камеры для проточного ИЭФ в гранулированном геле. 1 — подложка из тонкого стекла, 2 — верхняя пластина из толстого стекла, 3 — электродный блок, 4 — диализная трубка, 5 — сбор фракций, 6 — слив, 7 — блок охлаждения. Затемненная поверхность указывает расположение слоя гранулированного геля. Б. Четыре разреза камеры. 1 — слой геля, 2 — желобок, 3 — отвод газа, 4 — электролит (выход), 5 — электродный блок, 6 — диализная трубка, 7 — электролит (вход), 8 — штеккер, 9 — электрод, 10 — блок охлаждения, 11 — стеклянная подложка, 12 — желобок, 13 — верхняя стеклянная пластина, 14 — сбор фракций, 15 — перистальтический насос. (Quarmby, 1981.)

2. ИЭФ в гранулированных гелях (не проточное)
3. ИЭФ в многофазных колонках
4. ИЭФ в цилиндрических полиакриламидных гелях
5. ИЭФ в пластинах ПААГ и агарозного гелей

Препаративное ИЭФ в агарозном геле стало возможно после того, как появилась специальная очищенная агароза, практически не содержащая заряженных групп. Гель готовят на основе 0.8%-ного раствора агарозы, содержащего 2 % амфолитов-носителей. В качестве электродных растворов следует использовать слабые растворы электролитов, например, 0.1М NaOH и 0.1 М уксусную кислоту. В пластине размером 84\*30\*2 мм при мощности 16 Вт фокусирование продолжается 8 часов (начальные условия 500 В и 30 мА; конечные-1500 В и 10 мА). Пластины геля разделяют на 30 сегментов с помощью фракционирующей решетки, сегменты измельчают и трижды экстрагируют подходящим буфером. Выход-68%-82%.

6. Хроматофокусирование и амфолит-вытеснительная хроматография

### Аналитическое изоэлектрофокусирование

1. ИЭФ в градиенте плотности с использованием небольших колонок
2. Аналитическое ИЭФ в гелях
  - А. ИЭФ в тонких агарозных пластинах
  - Б. ИЭФ на ацетил-целлюлозных пленках
  - В. ИЭФ в тонком слое гранулированного геля
  - Г. ИЭФ в ПААГ
  - Д. ИЭФ в ультратонких ПААГ
  - Е. ИЭФ в плоских и цилиндрических гелях
  - Ж. Микро – ИЭФ
3. ИЭФ при минусовых температурах
- И. Изоэлектрофокусирование – изотахофорез
- К. ИЭФ в перпендикулярном градиенте концентрации мочевины
- Л. ИЭФ – электрофорез в ДСС Na

М. Предстационарное ИЭФ

## **Примеры применения метода ИЭФ**

### **1.ИЭФ пептидов**

Возможность использования метода ИЭФ для разделения пептидов привлекает своей высокой разрешающей способностью и эффектом изоэлектрического концентрирования сфокусированных фрагментов. Последнее обстоятельство весьма существенно для анализа сложных смесей пептидов - природных, синтетических или полученных в результате фрагментации крупных полипептидных цепей.

### **2.ИЭФ клеток, субклеточных частиц, бактерий и вирусов.**

ИЭФ можно использовать для измерения плотности поверхностного заряда клеток, для определения значений рК ионизирующихся групп на клеточной мембране, а также для контроля за химической модификацией заряженных групп клеточной оболочки

### **3.ИЭФ ферритинов**

Ферритин – форма запаса железа во всех тканях млекопитающихся.

С помощью ИЭФ возможно выявление его микрогетерогенности, число зон и распределение ферритинов в тканях (специфично).

### **4.ИЭФ гемоглобинов**

Используется ИЭФ при массовом скрининге образцов крови,а также для диагностики гемоглобинопатии.

### **5.ИЭФ нуклеиновых кислот.**

Поскольку метод ИЭФ основан на разделении только по заряду, то он вообще говоря, должен быть индифферентен к полидисперсности по молекулярной массе при условии постоянства отношения заряда к массе.

1. В случае ИЭФ тРНК число и относительное распределение сфокусированных зон зависят от способа внесения образца и от количественного соотношения тРНК:амфолины.

2. Картина распределения зон тРНК при ИЭФ существенно изменяется в присутствии 6М мочевины.
3. При выделении индивидуальных фракций тРНК и повторном их фокусировании вновь обнаруживалась микрогетерогенность, хотя и выраженная в меньшей степени, чем при первом фракционировании.
4. Рибосомные РНК фокусируются в зонах, соответствующих  $pI$  4,8 и 5,2, однако характер миграции этих РНК от катода к аноду скорее свидетельствует о фракционировании по размеру, а не по заряду.
5.  $\alpha$ -глобиновая мРНК мигрирует несколько быстрее, чем  $\beta$ -глобиновая, которая крупнее первой.

Таким образом, эти наблюдения свидетельствуют о том, что изоэлектрическое фракционирование НК по сути имеет неизоэлектрическую природу. В основе разделения НК при ИЭФ лежит образование прочных комплексов между ними и амфолитами – носителями, формирующими градиент рН. Прочность таких комплексов зависит от рН – они практически не образуются в нейтральной области (рН7,4), малоустойчивы при рН5,4 и прочны при рН4,2 и ниже, т. е. в характерной области кажущегося фокусирования и фракционирования тРНК.

