**Оглавление**

Введение

Электрофорез в медицине

Электрофорез в научных исследованиях

Изотахофорез

Капиллярный электрофорез

Электрофорез белков

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез белков в агарозном геле

Электрофорез ДНК

Иммуноэлектрофорез

**Введение**

Электрофорез (от электро- и греч. переносить) - это электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (коллоидных или белковых растворов) в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые было открыто профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году.

С помощью электрофореза удаётся покрывать мелкими частицами поверхность, обеспечивая глубокое проникновение в углубления и поры. Различают две разновидности электрофореза: катафорез - когда обрабатываемая поверхность имеет отрицательный электрический заряд (то есть подключена к отрицательному контакту источника тока) и анафорез - когда заряд поверхности положительный.

Электрофорез применяют в физиотерапии, для окраски автомобилей, в химической промышленности, для осаждения дымов и туманов, для изучения состава растворов и др. Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии, биохимии и молекулярной биологии.

**Электрофорез в медицине**

Лечебное вещество наносится на прокладки электродов и под действием электрического поля проникает в организм через кожные покровы (в терапии, неврологии, травматологии и др.) или слизистые оболочки (в стоматологии, ЛОР, гинекологии и др.) и влияет на физиологические и патологические процессы непосредственно в месте введения. Электрический ток также оказывает нервно-рефлекторное и гуморальное действие.

Преимущества лечебного электрофореза:

 введение малых, но достаточно эффективных доз действующего вещества;

 накопление вещества и создание депо, пролонгированность действия;

 введение в наиболее химически активной форме - в виде ионов;

 возможность создания высокой местной концентрации действующего вещества без насыщения им лимфы, крови и других сред организма;

 возможность введения вещества непосредственно в очаги воспаления, блокированные в результате нарушения локальной микроциркуляции;

 лечебное вещество не разрушается, как например, при введении per os;

 слабый электрический ток благоприятно влияет на реактивность и иммунобиологический статус тканей.

Противопоказания к проведению электрофореза: острые гнойные воспалительные заболевания, лихорадка, тяжелая форма бронхиальной астмы, дерматит или нарушение целостности кожи в местах наложения электродов, злокачественные новообразования. Учитываются противопоказания для лечебного вещества. Вещества, используемые при электрофорезе, по способу введения разделяются на:

 отрицательно заряженные, вводимые с отрицательного полюса - катода (бромиды, йодиды, никотиновая кислота и другие);

 положительно заряженные, вводимые с положительного полюса - анода (ионы металлов - магний, калия, кальция);

 вводимые как с анода, так и с катода.

Преимущество бишофита - в биполярном введении, так как эффект оказывают одновременно и положительно, и отрицательно заряженные ионы.

**Электрофорез в научных исследованиях**

В биохимии и молекулярной биологии электрофорез используется для разделения макромолекул - белков и нуклеиновых кислот. Различают множество разновидностей этого метода. Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества и используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике, популяционной биологии (для изучения генетической изменчивости) и др.

**Изотахофорез**

Изотахофорез (ИТФ) - метод разделения различных типов ионов по их подвижности в электрическом поле. При ИТФ все виды ионов мигрируют в одном направлении, образуя набор зон, находящихся в равновесном состоянии и перемещающимися с одинаковыми скоростями.

В основе метода ИТФ лежит система, состоящая из трех различных электролитов, объединенных общим противоионом:

 ведущий электролит, содержащий анионы с наиболее высокой электрофоретической подвижностью, располагается в анодной области;

 замыкающий электролит, содержащий анионы с минимальной подвижностью, располагается в катодной области;

 смесь электролитов анализируемой смеси, содержащая анионы с промежуточной подвижностью.

Если через эту систему пропустить электрический ток, то анионы расположатся последовательно в соответствии с их электрофоретической подвижностью, ведущий в области анода, замыкающий в области катода, остальные между ними в виде узких зон с четкими концентрационными границами. Ширина отдельных зон по завершении процесса соответствует абсолютному количеству в смеси того или иного аниона.

Поскольку отдельные зоны располагаются последовательно. они практически соприкасаются, поэтому в исследуемый образец вносят буфер, содержащий анион с промежуточной подвижностью, зона которого встроится в полученную последовательность и раздвинет зоны исследуемых анионов. Эти вспомогательные зоны называются спейсерами - разделителями, функции которых выполняют амфолиты-носители, используемые в методе ИЭФ. особенностью метода ИТФ является то, что процесс сопровождается концентрированием зон, эффект от которого приводит к разрешению, сравнимому и даже превосходящему разделение методом ИЭФ. Результаты разделения смесей методом ИТФ фиксируются на ленте самописца в виде графика измерения трех параметров:

 интегральная кривая тепловыделения: по этой кривой можно определить разницу температур между соседними зонами, что служит мерой градиента напряженности поля, то есть разницы электрофоретических подвижностью двух ионов

 дифференциальная кривая тепловыделения: длина отрезков этой кривой соответствуют ширине зоны вещества, а также служит мерой абсолютного количества вещества в пробе

 кривая поглощения в УФ-свете: длина отрезков этой кривой соответствует значению экстинкции вещества. Зная коэффициент молярной экстинкции вещества, можно определить абсолютное содержание вещества в пробе, а также вычислить его концентрацию в зоне.

Аналитический изотахофорез проводят в капиллярном приборе для изотахофореза, в тефлоновом капилляре с внутренним диаметром 0,5 мм.

Препаративный изотахофорез проводят в колонке с полиакриламидным гелем.

Применение изотахофореза

 Аналитическое разделение (мкг) пептидов, белков, нуклеотидов, органических кислот, ионов металлов (частично изотопов) с высоким разрешением.

 Препаративное разделение белков (г).

 Накопление в виде узкой зоны следовых количеств веществ (мкг) из больших объемов пробы вследствие эффекта концентрирования.

 Определение электрофоретической подвижности.

**Капиллярный электрофорез**

электрофорез молекулярный биология капиллярный

Капиллярный электрофорез, известный также как капиллярный зональный электрофорез, используется для разделения ионов по заряду. В случае обычного электрофореза заряженные молекулы перемещаются в проводящей жидкости под действием электрического поля. В 1960х годах была предложена методика капиллярного электрофореза для разделения молекул по заряду и размеру в тонком капилляре, заполненном электролитом.

Оборудование

Для проведения капиллярного электрофореза требуется относительно простое оборудование.

Основные компоненты системы - флакон для нанесения образца, стартовый флакон, конечный флакон, капилляр, электроды, мощный источник питания, детектор и устройство обработки данных. Флакон для нанесения образца, стартовый и конечный флаконы заполнены электролитом, например, водным буферным раствором. Для нанесения образца конец капилляра опускают в флакон с образцом и затем перемещают в стартовый флакон. Перемещение анализируемых веществ осуществляется под действием электрического поля, которые прилагают между стартовым и конечным флаконами. Все ионы передвигаются по капилляру в одном направлении под действием электроосмотического тока. Анализируемые вещества разделяются по электрофоретической мобильности и детектируются около конца капилляра.

Детектирование разделившихся молекул при капиллярном электрофорезе может осуществляться различными устройствами. Наиболее распространенные приборы детектируют изменение поглощения излучения в ультрафиолетовой области или в области видимого света. Обычно в таких системах в качестве ячейки используют участок капилляра. Длина пути проходящего света при капиллярном электрофорезе составляет порядка 50 микрометров, что намного меньше, чем в случае обычных ультрафиолетовых ячеек, в которых длина пути света порядка 1 сантиметра.

В соответствии с законом Бугера -Ламберта-Бера, чувствительность детектора пропорциональна длине пути, по которому свет проходит через ячейку. Для увеличения чувствительности удлиняют путь, по которому проходит свет, однако при увеличении размеров ячейки снижается разрешение. Капиллярная трубка может быть расширена в месте детектирования, такую разновидность называют пузырьковой ячейкой. В другом варианте увеличение пути проходящего света достигается за счёт добавления дополнительного капилляра. Оба этих метода снижают эффективность разделения.

Для того, чтобы отличить сходные образцы, системы разделения капиллярным электрофорезом могут быть напрямую связаны с масс-спектрометрами. В большинстве таких систем конец капилляра помещают в прибор для электроаэрозольной ионизации. Ионизированные частицы далее анализируют масс-спектрометрией.

**Электрофорез белков**

Электрофорез белков - способ разделения смеси белков на фракции или индивидуальные белки. Электрофорез белков применяют как для анализа компонентов смеси белков, так и для получения гомогенного белка. Наиболее распространенным вариантом электрофоретического анализа белков, является электрофорез белков в полиакриламидном геле.

Существует множество разновидностей и модификаций данного метода, которые используются в различных областях:

 Электрофорез в свободных средах (без поддерживающей среды)

 Электрофорез с подвижной границей

 Капиллярный электрофорез

 Зональный электрофорез в поддерживающей среде с капиллярной структурой

 Электрофорез на фильтровальной бумаге

 Электрофорез белков на ацетат-целлюлозной мембране

 Электрофорез в колонках и блоках гранулированной поддерживающей среды

 Электрофорез белков в ПААГ

 Электрофроез белков в крахмальном геле

 Электрофорез белков в агарозном геле

Электрофорез белков подразделяется также на одномерный и двумерный (2D-) электрофорез, препаративный и аналитический, а также электрофорез нативных белков и электрофорез в присутствии детергента. Разновидностью метода электрофореза являются изоэлектрическое фокусирование и изотахофорез. В случае использования иммунологических методов для выявления разделённых белков говорят про иммуноэлектрофорез.

**Электрофорез белков в полиакриламидном геле**

Электрофорез белков в полиакриламидном геле - метод разделения смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью (функцией длины полипептидной цепочки или молекулярной массы, а также укладки белковой молекулы, посттрансляционных модификаций и других факторов). Данный способ фракционирования белков и пептидов широко применяют в современной молекулярной биологии, биохимии, генетике.

Разработано большое количество модификаций электрофореза белков в полиакриламидном геле для решения разных задач и для различных белков и пептидов. Наиболее распространённой разновидностью является электрофорез белков в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли.

В 1970 году Лэммли для изучения процесса сборки капсида бактериофага Т4 предложил метод электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле в зависимости от молекулярной массы. Для этого перед нанесением на гель образцы кипятили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и 2-меркаптоэтанола. Под воздействием 2-меркаптоэтанола происходит восстановление дисульфидных связей, что предотвращает выпетливание денатурированных полипептидов и повышение их подвижности. SDS является сильным детергентом, его молекула состоит из двенадцатичленной алифатической неразветвленной цепи и ковалентно связанного с ним сульфата, имеющего в растворе отрицательный заряд.

При использовании описываемого метода исходят из следующих допущений:

 белки после обработки SDS находятся в полностью денатурированном состоянии;

 количество молекул SDS, связанных с полипептидом, пропорционально его длине, и, следовательно, молекулярной массе;

 собственный заряд полипептида несущественен в сравнении с зарядом связанного с ним SDS.

В данных условиях, все полипептиды имеют одинаковый удельный заряд и разделяются обратно пропорционально логарифму их молекулярной массы. Практика подтверждает верность данных предположений в подавляющем большинстве случаев.

Для проведения денатурирующего электрофореза в ПААГ используются различные буферные системы. Наиболее распространённая система, которая подразумевается по умолчанию - это буферная система Лэммли. Кроме того, в подавляющем числе работ используют, так называемый, disc-электрофорез то есть используют гель, состоящий из двух частей. Концентрирующий гель имеет pH 6,8 и концентрацию полиакриламида от 2 до 8 %. Разделяющий гель имеет рН в районе 8,5-9 и концентрацию полиакриламида от 5 до 20 %. Выбор плотности геля зависит от молекулярных масс исследуемых белков. Все буферы не содержат неорганических солей, основным переносчиком тока в них является глицин. При рН 6,8 суммарный заряд молекулы глицина близок к нулю. Вследствие этого для переноса определенного заряда (который определяется силой тока в электрофоретической ячейке), отрицательно заряженные комплексы полипептидов с SDS должны двигаться с большой скоростью. При рН 8,8 глицин приобретает отрицательный заряд, вследствие чего на границе концентрирующего и разделяющего гелей белки резко тормозятся (в переносе одинакового заряда через единицу площади теперь участвует гораздо больше заряженных молекул, следовательно, они двигаются с меньшей скоростью). Результатом этого является концентрирование белков на границе гелей, что очень сильно повышает разрешающую способность метода.

В разделяющем геле белки мигрируют в зависимости от длины полипептидной цепи, то есть обратно пропорционально молекулярной массе.

Механизм разделения

Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле зависит от ряда параметров. Скорость миграции пропорциональна заряду молекулы, и в свободной жидкости молекулы с одинаковым удельным зарядом мигрируют с равной скоростью. В случае разделения в среде, имеющей жесткую пространственную матрицу, происходит сегрегация за счет трения о гель. Сила трения зависит от пространственной конфигурации молекулы, в том числе от её размера. Таким образом, в случае электрофоретического разделения нативных белков будет наблюдаться сложная картина их распределения в зависимости от вышеприведенных факторов.

Визуализация продуктов разделения

Для визуализации результатов электрофореза чаще всего используют окрашивание белков в гелях красителем Кумасси или серебром. Для проведения вестерн блоттинга белки переносят из геля на нитроцеллюлозную мембрану.

Интерпретация результатов

В большинстве случаев результаты электрофоретического разделения достаточно получить путем визуальной оценки геля. Однако, с целью получения достоверных данных и надлежащего документирования результатов, гель сканируют на просвет при помощи высокочувствительного денситометра. По сути, денситометр является сканером, который относится к контрольно-измерительным приборам и подлежит поверке с целью определения и подтверждения соответствия характеристик средства измерения установленным требованиям. Подобные требования к денситометру позволяют надежно определять не только положение белков в геле, но и оптическую плотность белкового пятна. Оцифрованное изображение геля обрабатывают при помощи специализированного программного обеспечения, которое позволяет достоверно определить такие параметры как электрофоретическая подвижность белка, его чистота, количество белка в пятне и др. Определение молекулярной массы исследуемого белка предполагает необходимость калибровки геля по молекулярным массам. Калибруют гель относительно молекулярных масс белков-маркеров, которые разделяют параллельно с исследуемым образцом. Смеси маркерных белков доступны в различном интервале масс. Калибрование предполагает построения зависимости относительной электрофоретической подвижности (Rf) каждого из маркерных белков от десятичного логарифма их молекулярной массы. Обычно зависимость имеет вид сигмообразной кривой. Расчет молекулярной массы исследуемого белка осуществляют относительно его Rf, используя при этом метод регрессионного анализа. Достоверными результаты считаются, в случае если длина пробега белков-маркеров составляет не менее 80% длины разделяющего геля, а зависимость их Rf от логарифма молекулярной массы является линейной (R2 > 0,95). Т.е. для расчетов используют лишь тот участок калибровочной кривой, который покрывает электрофоретическую подвижность исследуемого белка.

Чувствительность метода SDS-PAGE по Лэммли обратно пропорциональна молекулярной массе белка. Например, в интервале 10-20 кДа удается разделить белки, отличающиеся всего на 0,1 кДа (разница всего в один аминокислотный остаток). Однако, для получения удовлетворительных результатов следует выполнить несколько простых методических рекомендаций. Так, в связи с тем, что высокая электропроводность исследуемых образцов способна значительно исказить электрофоретическую подвижность белка, их ионная сила должна быть по возможности минимальной и приблизительно равной. Еще одним важным условием надежности определения молекулярной массы является оптимальная нагрузка белка на гель. При окраске Coomassie Blue R250 оптимальное содержание белка в пятне должно находиться в пределах 0,1-1 мкг и как минимум на порядок меньше при окраске серебром. В противном случае белки в геле сформируют широкие пятна, что в свою очередь затруднит определение их электрофоретической подвижности. Несмотря на высокую чувствительность и несложность метода молекулярная масса белков, определенная с использованием SDS-PAGE, часто отличается от истинного значения. Разница может составлять от нескольких кДа для низкомолекулярных белков до десятков кДа для высокомолекулярных белков.

Буферные системы

Для электрофореза белков в полиакриламидном геле в качестве буферных растворов используют: Трис-HCl, Трис-трицин, TBE, TBE с мочевиной, Bis-Tris.

**Электрофорез в агарозном геле**

Наиболее просты и удобны в использовании гели агарозы, которая представляет собой линейный полисахарид. Образование геля идёт путём связывания в пространственную сетку пучков нитей, за счёт образования водородных связей между ними. Благодаря механической прочности и достаточно большому размеру пор, агарозные гели нашли широкое применение при разделении крупных макромолекул, таких как ДНК. Варьируя концентрацию агарозы, можно менять средний размер пор в геле, и при концентрации агарозы в геле свыше 2% в нем становится возможным разделять не только НК, но и крупные белковые молекулы. Средний размер пор 2%-ного геля агарозы примерно соответствует размеру биополимера с массой 50 млн. дальтон. Использовать гели более высокой концентрации не целесообразно, т.к. при электрофорезе поры геля должны быть легко проницаемы для молекул биополимеров, чтобы лишь тормозить их миграцию в электрическом поле за счёт трения. Поэтому обычно применяются гели с концентрацией 0.4 - 2%, а наиболее распространены форезы в гелях с концентрацией около 1 %.

Агароза растворяется в воде при нагревании в кипящей водяной бане. Растворять агарозу непосредственно на нагревателе следует при интенсивном помешивании, однако делать этого не рекомендуется, во избежание пригорания агарозы к перегретому дну сосуда. В качестве альтернативного способа, может использоваться нагрев раствора в микроволновой печи, что занимает всего несколько минут. В этом случае, однако, необходимо внимательно следить за тем, чтобы раствор не закипел, иначе он моментально "убежит". Рекомендуется нагревать раствор на малой или средней мощности, перемешивая каждые полминуты. После застывания гель можно плавить повторно, однако делать это нужно только на водяной бане или при аккуратном нагреве в микроволновой печи. Некоторые авторы рекомендуют при первом приготовлении геля выдерживать расплавленную агарозу на водяной бане или в термостате не менее двух часов, для получения истинного раствора полимера.

Процесс плавления/застывания агарозы обладает ярко выраженным гистерезисом. Плавление разных типов агарозы обычно происходит при температурах 85-95°, тогда как застывание наступает при температурах 38-40°. Во избежание значительных тепловых деформаций расплавленную агарозу заливают в форму охлаждённой до 50-55°. При проведении количественного анализа расплавленный гель перед заливкой можно выдерживать в термостате при температуре 50- 55° в течение двух часов. Это рекомендуется делать для того, чтобы после заливки в форму, гель застывал равномерно по всему объёму. Застывший гель чистой агарозы не вполне прозрачный и на вид немного опалесцирует. Со временем он несколько уплотняется, вытесняя из себя жидкость, по этой причине агарозные гели перед использованием рекомендуется выдерживать в буфере в течение 12 и более часов.

Миграция ДНК в агарозном геле.

Гели агарозы содержат отрицательно заряженные группы, преимущественно сульфатные, полное количество которых зависит от степени очистки агарозы. Вследствие этого, при электрофорезе положительно заряженных молекул может возникать их неспецифическое взаимодействие с волокнами геля, которое проявляться в виде растягивания зон, при обратимом связывании с отрицательными группами геля, или в виде задержки, если взаимодействие необратимое. Кроме того, присутствие отрицательно заряженных групп приводит к возникновению электроосмоса, который вызывает противоток жидкости внутри геля, что однако затрудняет расчёт их электрофоретической подвижности. По некоторым данным, при использовании различных типов агарозы дня разделения трёх форм плазмидной ДНК (суперспиральной, релаксированной кольцевой и линейной) наблюдаются сильные изменения скорости миграции молекул, и что ещё важнее, изменяется взаимное расположение полос, соответствующих разным формам ДНК, в геле. Для количественного описания величины электроосмоса в агарозных гелях используют коэффициент относительной миграции который равен отношению скоростей миграции незаряженного полимера (только за счёт электроосмоса) и аналогичного по структуре полианиона при электрофорезе в агарозном геле данного тина. Обычно выделяют три типа агарозы: с низкой, средней и высокой степенью электроосмоса.

Помимо учёта эффектов электроосмоса, важно также правильно подобрать размеры пор геля и напряжённость электрического поля, в зависимости от свойств исследуемого образца. Дня оптимального разделения ДНК в агарозном геле необходимо создать условия, при которых молекулы ДНК могут достаточно свободно мигрировать в геле, лишь изредка сталкиваясь с его волокнами. В этом случае подвижность линейных молекул ДНК оказывается обратно пропорциональной логарифму их молекулярной массы, а, следовательно, и размеру.

**Электрофорез ДНК**

Электрофорез ДНК - это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине) и форме (в случае, если ДНК образует вторичные структуры, например шпильки). Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее.

К образцам обычно добавляют низкомолекулярный кислый краситель (например, динитрофенол, бромфеноловый синий), чтобы визуализировать ход электрофореза в процессе. Краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс.

Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис и борную кислоту. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля.

После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

Определение размеров производят путем сравнения коммерчески доступных фрагментов ДНК, содержащий линейные фрагменты ДНК известной длины.

Для электрофоретического анализа ДНК обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК, например, в случае секвенирования) гели.

**Иммуноэлектрофорез**

Иммуноэлектрофорез (ИЭФ) - метод исследования антигенного состава биологических материалов, сочетающий электрофорез и иммунодиффузию. Впервые описан Грабаром и Уильямсом в 1953 году, в 1965 году метод был модифицирован Шейдеггером с целью минимизации.

Образец антигенного материала разделяют электрофорезом в геле (обычно агарозном), в результате чего формируются характерные зоны. Далее параллельно зонам электрофореза вносится преципитирующая антисыворотка, антигены и антисыворотка диффундируют навстречу друг к другу, и в месте встречи антисыворотки с антигеном появляются линии преципитации, имеющие форму дуги. После проведения иммунодиффузии и элюирования непреципитировавших молекул из геля гель окрашивают специальными красителями (например амидочёрным 10В, азокармином В и другими красителями, окрашивающими белки в случае белковых антигенов или суданом чёрным в случае липопротеиновых антигенов). Существует также ряд модификаций метода ИЭФ (при помощи чистого антигена, при помощи моноспецифической антисыворотки, метод ИЭФ по Оссерману, метод ИЭФ по Геремансу.