

УДК 550.371.5

Д.С.Прокофьева (5 курс, каф. ФХБК)

## ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Первое упоминание об акриламидном геле датируется 1959 годом, когда была опубликована статья Raymond and Winstraub [1]. Она была посвящена контролю таких параметров полиакриламидного геля, как размер пор и стабильность.

В 1964 году увидели свет результаты многолетней работы Ornstein and Davis [2,3]. Они разработали новый электрофоретический метод и успешно провели с его помощью разделение белков сыворотки крови. Этим результатам предшествовали годы кропотливой работы.

Как пишут сами исследователи, их работа была стимулирована разработкой технологии разделения молекул в крахмальном геле, проведенной Smithies в 1955 г.[4], и применением данной технологии Hunter для получения зимограммов ферментов в 1958 г. [5]. Вклад Smithies в разработку нового метода состоял в открытии им добавочной разрешающей силы, создаваемой «ситовой» структурой гелей. С ее помощью можно проводить разделение ионов с почти одинаковой или даже идентичной подвижностью, что нельзя сделать в случае, например, ацетата целлюлозы.

О возможности использования полиакриламидного геля для разделения макромолекул впервые задумался Oster [6], и порекомендовал полиакриламид Ornstein как среду, имеющую потенциал для внедрения в секционирование тканей.

Ornstein and Davis слышали о том, что крахмальный гель трудно приготовить как сам по себе, так и трудно приготовить дважды гель с одинаковыми параметрами. Полиакриламидный гель по сравнению с крахмальным гелем имеет ряд преимуществ. Он термостабильный, прозрачный, прочный, относительно химически инертный, может быть приготовлен с различным размером пор, и является неионной средой (даже крахмал несет несколько анионных групп, которые, в частности, ответственны за обратный эндоосмотический ток жидкости, возникающий при использовании таких гелей). Все вышеперечисленное говорило о том, что попытки замены крахмальных гелей полиакриламидными гелями могут иметь успех. Первая попытка такого рода была выполнена Davis и была так успешна, что побудила Ornstein and Davis начать интенсивную работу в этой области. После года упорной работы они, наконец, поняли механизм процесса. В марте 1959 года были опубликованы предварительные результаты их работы [7]. Всего несколько месяцев позднее появился доклад независимой группы из лаборатории университета Пенсильвании, который также рекомендовал использование полиакриламидных гелей в качестве замены крахмальных гелей.

Заслуга Ornstein and Davis состоит не только в использовании для разделения белков новой гелевой матрицы. Они разработали прерывистую электрофорезную буферную систему, которая, в отличие от предшествующей ей непрерывной системы, включает в себя наложенный поверх разделяющего геля концентрирующий гель с большими порами, которые практически не задерживают макромолекулы. Оба геля и буфер для емкостей имеют разное значение молярности и pH. Это обеспечивает сужение белковых зон, и, как следствие, значительно повышает разрешающую способность метода.

Созданный метод был назван его авторами Polyacrylamide Disc Electrophoresis. Его высокое разрешение достигается при довольно небольшой длительности процесса. Метод позволяет одновременно определять как значение подвижности белка в воде, так и его

водную константу диффузии. Кроме того, он дает возможность проводить анализ очень разбавленных проб.

Одна из разновидностей электрофореза в полиакриламидном геле – градиентный полиакриламидный гель-электрофорез. Он характеризуется тем, что в качестве среды разделения используется пластина с гелем с изменяющейся концентрацией (от 4 до 30 %) полиакриламида. Разделение осуществляется в результате застревания белковых молекул во все более мелкопористом геле. В результате происходит накопление белка в соответствующих участках геля, за счет постепенного «подтягивания» отстающих молекул. Метод отличается высокой эффективностью разделения и очень узкими белковыми полосами.

Из преимуществ этого метода необходимо отметить, что, так как разделяемые белки находятся в нативной форме, то, например, многие ферменты сохраняют свою ферментативную активность. К недостаткам следует отнести несовершенство разделяющей эффективности нативного электрофореза – фракционирование белков происходит в соответствии с их размером и зарядом. Как следствие, белки с различными молекулярными массами могут иметь одинаковую подвижность.

В 1970 году Laemmli [8] модифицировал систему, предложенную Ornstein and Davis, используя додецил сульфат натрия (ДСН), который представляет собой анионный детергент с сильно выраженными амфифильными свойствами. ДСН прочно связывается с большинством белков, при этом суммарный комплекс белок-(ДСН)<sub>n</sub> приобретает отрицательный заряд, кроме того ДСН приводит к разрушению нековалентных связей, приводя к денатурации белков. Подвижность белок-(ДСН)<sub>n</sub> обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы. Это означает, что молекулярная масса белков может быть определена по относительной подвижности белка в геле, а наличие одной полосы в таком геле может являться хорошим критерием чистоты препарата.

Процесс разделения белков по Laemmli можно осуществлять как на геле постоянной плотности, так и на градиентных гелях.

На сегодняшний день система прерывистого ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле является самой широко распространенной электрофоретической системой. Ее отличают высокая разрешающая способность и относительная простота исполнения. Она используется в подавляющем большинстве исследовательских лабораторий, занимающихся изучением белковых молекул.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Raymond S., Weintraub L.S. 1959. Science 130: 711.
2. Ornstein, L. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1964, 121, 321-349.
3. Davis, B. J. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1964, 121, 404-427.
4. Smithies O. 1955. Biochem. J. 61: 629.
5. Hunter R.L., Burstone M.S. 1958. J. Histochem. Cytochem. 6: 396.
6. Oster G. K., Oster G., Prati G. 1957. J. Am. Chem. Soc. 79: 595.
7. Davis B.J., Ornstein L. A new high resolution electrophoresis method. March 24, 1959. Delivered at the Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine.
8. Laemmli U.K. 1970. Nature, 227 (5259), 680-685.