Электрофоретические методы исследования биологических макромолекул.

Лектор: заведующий кафедрой биохимии, чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н. Гусев Николай Борисович

Программа курса

Аннотация. В курсе рассматриваются принципы электрофоретического разделения и анализируются классические и современные методы, используемые для разделения макромолекул. Приводятся примеры использования электрофоретических методов для решения проблем протеомики и геномики.

Лекция 1. Классификация различных электрофоретических методов разделения макромолекул (аналитически и препаративные методы разделения в электрическом поле, электрофорез со свободной границей, зональных электрофорез, вытеснительные методы электрофореза). Перемещение частицы в электрическом поле. Зависимость скорости перемещения от напряженности электрического поля, заряда частицы и силы трения, препятствующей перемещению. Частицы в электрическом поле. Зависимость скорости перемещении заряженной частицы от ее молекулярной массы и формы.

Лекция 2. Электрофорез с подвижной границей. Электрофоретический прибор Тизхелиуса и современные жидкостные сортировщики клеток.

Различные виды зонального электрофореза. Бумажный электрофорез и разделение аминокислот и пептидов. Зависимость электрофоретической подвижности аминокислот от pK и pH. Условия разделения аминокислот и пептидов на бумаге. Используемые буферы и приборное оснащение. Электрофоретическое разделение мононуклеотидов на бумаге. Методы детекции аминокислот, пептидов и нуклеотидов при электрофорезе на бумаге. Электрофорез на нитроцеллюлозе.

Лекция 3. Электрофорез в крахмале, агарозе и полиакриламидном геле. Достоинства полиакриламидного геля. Строение и свойства акриламида, метиленбисакриламида, инициаторов и катализаторов полимеризации. Полимеризация с использованием персульфата аммония и рибофлавина. Зависимость пористости геля от концентрации мономеров и «сшивки». Механические и оптические свойства полиакриламидных гелей. Использование окислителей и восстановителей и специальных видов «сшивок» для деполимеризации гелей. Уравнение Фергюссона и его использование для определения молекулярной массы белков и их олигомерного состава. Гомогенные и гетерогенные (прерывистые) буферные системы, используемые для электрофоретического разделения белков. Диск-электрофорез при щелочных и кислых значениях pH. Использование ионных детергентов для электрофоретического определения молекулярной массы белков и пептидов. Додецилсульфат натрия и цетилтриметиламмоний бромид и их использование для определения кажущейся молекулярной массы белков. Факторы, влияющие на определение молекулярной массы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, возможные артефакты и пути их преодоления. Сопоставление различных способов определения молекулярной массы с помощью электрофореза.

Лекция 4. Способы детекции белков в полиакриламидном геле (окрашивание анионными красителями Кумасси, амидовый черный, окрашивание универсальным красителем stains-all, окрашивание серебром). Способы электропереноса белков и пептидов на нитроцеллюлозные фильтры. Сухие и влажные блоттеры, состав буферных

растворов, используемых для электропереноса. Детекция белков на нитроцеллюлозной мембране (красители, авидин-биотиновый метод, «окрашивание» антителами, окрашивание коллоидным золотом, использование радиоактивных изотопов для детекции катион-связывающих белков) Секвенирование белков, перенесенных на нитроцеллюлозные фильтры.

Капиллярный электрофорез. Приборное оснащение, влияние электроэндоосмоса. Различные варианты капиллярного электрофореза (зональный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, капиллярных электрофорез, использование изоэлектрофокусирования и изотахофореза в капиллярном электрофорезе).

Лекция 5. Использование методов электрофореза для решения задач современной протеомики. Одно- и двумерное электрофоретическое разделение белков. Элюция белков с геля и определение их молекулярной массы с помощью методов масс-спектроскопии. Различные виды масс-спектроскопии (MALDI и электроспрей). Гидролиз белков геле и разделение полученных пептидов методами масс-спектроскопии. Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектроскопия. Тандемная масс-спектроскопия и определение частичной и полной первичной структуры неизвестных белков. Изучение экспрессии различных белков на разных этапах жизнедеятельности клетки.

Лекция 6.Особенности электрофореза нуклеиновых кислот (размер молекулы, постоянство соотношения заряд/масса, высокая гибкость, наличие вторичной структуры). Пульсовый электрофорез. Разделение нуклеиновых кислот в агарозе. Электрофорез олигонуклеотидов в полиакриламидном геле. Принципы секвенирования нуклеиновых кислот. Эффективность определения первичной структуры белка по структуре гена.

Лекция 7. Изоэлектрофокусирование как один из методов вытеснительного электрофореза. Искусственные градиенты pH (градиенты pH, создаваемые с помощью градиента температуры или градиента неэлектролитов). Структура амфолинов и их свойства. Требования, предъявляемые к амфолинам. Препаративное и аналитическое изоэлектофокусирование, носители, используемые при проведении опытов по изоэлектрофокусированию. Роль электроэндоосмоса и катодный дрейф. Особенности окрашивания гелей после проведения изоэлектрофокусирования. Иммобилины и электрофокусирование на гелях с иммобилизованным градиентом pH.

Изотахофорез. Принципы метода и его разрешающая способность. Управляющее уравнение Кольрауша и соотношение концентрации исследуемых веществ в разделяемых зонах. Техническое оснащение метода изотахофореза. Использование амфолинов для разделения зон веществ, фракционируемых при изотахофорезе. Разрешающая способность изотахофореза и сравнение процессов, происходящих при изотахофорезе, с процессами, происходящими при диск-электрофорезе.