

## **Лабораторный практикум** **Электрофоретическое разделение белков** **(PAGE)**

### Оборудование:

- 1) камера для электрофореза в ПААГ
- 2) источник тока
- 3) стеклянные пластины для заливки ПААГ гелей
- 4) спейсеры
- 5) заливочный столик
- 6) термостат, 100 С
- 7) ванночка

### Реактивы:

- 1) деионизованная вода
- 2) акриламид/бис-акриламид (30%Т, 2,67% С stock),
- 3) 1,5М Трис HCl pH 8,8,
- 4) 0,5М Трис HCl pH 6,8,
- 5) SDS,
- 6) персульфат аммония (ПСА),
- 7) TEMED,
- 8) Глицерин
- 9) 1% бромфеноловый синий,
- 10) Трис
- 11) Глицин
- 12) Кумасси голубой R 250.
- 13) конц. уксусная кислота
- 14) этанол

### Экспериментальная часть:

#### **1) Подготовка стеклянных пластин для заливки геля.**

Для заливки геля необходимо использовать две стеклянные пластины разного размера.

1. Поместить стеклянную пластинку большего размера на ровную горизонтальную поверхность, по ее краям расположить два спейсера. Сверху на спейсеры положить стеклянную пластинку меньшего размера.

2. Переместить стеклянные пластинки в вертикальное положение и поставить на горизонтальную поверхность. С помощью

специальных зажимов зафиксировать стеклянные пластинки с находящимися между ними спейсерами.

3. Поместить зафиксированные стеклянные пластинки с находящимися между ними спейсерами на заливочный столик.

### **1) Приготовление геля**

Реактивы	Разделяющий, 12%	Концентрирующий, 4%
акриламид/бис-акриламид (30%Т, 2,67 % С stock)	4 мл	0,67 мл
деионизованная вода	3,35 мл	3,05 мл
1,5М Трис HCl pH 8,8	2,5 мл	-
0,5М Трис HCl pH 6,8	-	1,25
10% SDS	100 мкл	50 мкл
10% ПСА.	100 мкл	50 мкл
ТЕМЕД	10 мкл	10 мкл

- 1). Для приготовления разделяющего геля необходимо смешать компоненты (за исключением ТЕМЕД и ПСА) в количествах, указанных в таблице. Полученную смесь тщательно перемешать.
- 2). Добавить ПСА и ТЕМЕД, тщательно перемешать полученный раствор, не допуская образования пузырьков с газа.

### **2) Заливка геля**

- 1). Полученный раствор разделяющего геля с помощью пипетки поместить между стеклянными пластинами так, чтобы его уровень составлял  $\frac{3}{4}$  высоты меньшей стеклянной пластины.
- 2). Наслоить на раствор разделяющего геля тонкий слой деионизованной воды и оставьте гель застывать (около 20 минут).
- 3). Приготовить раствор концентрирующего геля.
- 4). Удалить слой воды с поверхности застывшего разделяющего геля.
- 5). Вставить гребенку между стеклянными пластинами и наслоить на поверхность застывшего разделяющего геля раствор концентрирующего геля.
- 6). Оставить гель застывать в течение 20 минут.

### **3) Подготовка электрофорезной камеры.**

- 1) Поставить электрофорезную камеру на ровную горизонтальную

поверхность.

- 2) Удалить пластины с гелем с заливочного столика и закрепить их в электрофорезной камере.
- 3) Приготовить 5х стоковый раствор электродного буфера: 9 г трис, 43,2 г глицина, 3 г SDS растворить в деионизованной воде.
- 4) Добавить разведенный в 5 раз (60 мл стокового раствора + 240 мл деионизованной воды) электродный буфер в нижнюю и верхнюю часть электрофорезной камеры так, чтобы уровень электродного буфера на 0.5 см был выше уровня геля.
- 5). Осторожно удалить гребенку из геля, сразу же промыть лунки дистиллированной водой.

#### **4) *Нанесение образцов и проведение электрофореза.***

- 1) Приготовить буфер для образцов:

- деионизованная вода – 3,8 мл,
- 0,5М Трис HCl pH 6,8 – 1,0 мл,
- глицерол – 0,8 мл,
- 10% SDS – 1,6 мл,
- 2-меркаптоэтанол – 0,4 мл,
- 1% бромфенол.

- 2) Развести анализируемый раствор белка буфером для образцов до концентрации 1 мкг/мкл.
- 3) Поместить пробирки с растворами в термостат на 100 С на 2 мин.
- 4) Нанести по 20 мкл полученных растворы образцов в лунки (крайние лунки заполнить буфером для образцов).
- 5) Подключить электрофорезную камеру к источнику тока.
- 6) Электрофорез проводится при постоянном токе - 30 мА для одного геля и 60мА для двух гелей и напряжении 150 В.
- 7) По достижению краской нижнего края геля отключить ток.
- 8) Удалить пластинки с гелем из электрофорезной камеры.
- 9) Осторожно вынуть спейсеры, находящиеся между стеклянными пластинками.
- 10) Отделить гель от стеклянных пластинок.

#### **5) *Окраска гелей***

- 1.) После окончания электрофореза поместить гели на ночь в ванночку с красящим раствором Кумасси (0,1%), приготовленном в

смеси дистиллят : этанол : конц. уксусная кислота в соотношениях 5:4:1.

2) На следующий день удалить раствор для окрашивания и поместить гель в обесцвечивающий раствор (дистиллят : этанол : конц. уксусная кислота в соотношениях 5:4:1) примерно на 3 часа. В процессе отмывки геля необходимо менять обесцвечивающий раствор, когда он приобретает синеватую окраску.

3) Гель помещается в ванночку с деионизованной водой. После отмывки геля окрашенными остаются только полоски геля, содержащие белок.

Следующий этап работы заключается в переносе информации о полученном геле в базу данных PS и подготовка выбранных участков геля для последующего анализа. Для этого используется робот SpotPicker, Bruker Daltonics GbmH, Германия, и прилагающееся к нему программное обеспечение SPControl. Выполнить процедуру согласно нижеприведенной схеме:

1. Запустить программу SPControl 3.
2. Поместить гель на сканер и закрепить держателем, поместить плашку/стрипы /пробирки на подставку.
3. В меню выбрать: Action → Change plates → Change all.
4. В меню выбрать: File → New Run → Выбрать Remote Gel Location (Ввести логин и пароль доступа к ProteinScape) и указать местоположения геля в PS → Acquire.
5. В Setup Run выбрать PROTEINEER Method = PROTEINEER Default96 (Standart).
6. Нажатиями мышки выбрать точки для нарезания и через меню Action → Execute.

Для идентификации белков проводится **масс-спектрометрический анализ**. Подготовка точек для масс-спектрометрии включает в себя: в 1) отмывку вырезанных кусочков геля от красителя, 2) трипсинолиз белков, 3) нанесение полученной смеси пептидов на мишень для масс-спектрометрии. После этих подготовительных этапов проводится снятие масс-спектров точек.

## **Отмывка и трипсинолиз**

### **Реактивы:**

- 1) 100 мМ бикарбонат аммония (стоковый раствор)
- 2) ацетонитрил
- 3) раствор трипсина Promega V5111, 200 мкг/мл
- 4) 0,7% ТФУ.

### **Оборудование:**

- 1) термостатирующий шейкер, 600 грт
- 2) термостат 37 С
- 3) латексные перчатки

### **Экспериментальная часть:**

На всех этапах трипсинолиза необходимо работать в перчатках.

#### ***1) Отмывка***

- 1) Отобрать воду из каждой пробирки.
- 2) Добавить отмывочный раствор (50% ацетонитрил, 50% 100 мМ бикарбонат аммония). Пробирки с отмывочным раствором поместить на 15 мин на шейкер, 600 грт, затем отобрать отмывочный раствор из каждой пробирки. Повторить шаг 2) еще раз.
- 3) Добавить в каждую пробирку 100-200 мкл ацетонитрила для дегидратации.
- 4) Поместить пробирки на термостатирующий шейкер, 58 С 600 грт на 15 мин. Отобрать ацетонитрил из всех пробирок.

#### ***2) Трипсинолиз***

В пробирки с раствором трипсина (5 мкл в пробирке) добавить 35 мкл гидролизного буфера (50 мМ бикарбонат аммония). Т. е. концентрация трипсина в рабочем растворе должна составлять 25 мкг/мл. Затем в каждую пробирку с кусочками геля, содержащими анализируемые белки, раскапать по 5 мкл полученного рабочего раствора трипсина.

Поместить пробирки в термостат на 37 С на 2-18 часов.

#### ***3) Остановка трипсинолиза и экстракция пептидов.***

Добавить в каждую пробирку по 7 мкл 0,7% ТФУ. Инкубировать 2-3 часа при комнатной температуре.

## **Подготовка мишени и нанесение образцов на мишень**

### **Реактивы:**

- 1)  $\alpha$ -цианокоричная кислота,
- 2) ацетонитрил,
- 3) 0,5% трифторуксусная кислота,
- 4) деионизованная вода.
- 5) этанол
- 6) деионизованная вода

### **Оборудование:**

- 1) шейкер, 600 грм.
- 2) ультразвуковая ванна
- 3) мишень для MALDI масс-спектрометрии.

### **Методика:**

#### *1) подготовка матрицы для масс-спектрометрии*

Для нанесения на мишень готовится полунасыщенный раствор  $\alpha$ -цианокоричной кислоты в растворе ТА (50% ацетонитрил, 0,5% ТФУ, доводится до объема деионизованной водой).

#### *2) подготовка мишени*

Перед нанесением образцов необходимо очистить мишень с помощью ультразвуковой ванны в 50% растворе этанола в течение 10-15 минут.

#### *3) нанесение матрицы и образцов на мишень*

Нанести на мишень по 0,5-0,7 мкл раствора матрицы, затем в каплю раствора матрицы добавить по 2,5-3,0 мкл образца.

Нанесенным каплям дать высохнуть. Произвести снятие масс-спектров.