

НАТИВНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПРОТЕОМИКЕ КЛЕТКИ: BN- И CN-PAGE

© С. А. Шуколюков

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: tinycapers@mail.ru*

Целью представленного мини-обзора является привлечение внимания отечественного читателя к быстрому, дешевому и легко воспроизводимому методу нативного электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE), который по непонятным причинам до сих пор не применяется в нашей стране. В обзоре приведены наиболее интересные примеры использования трех типов нативного электрофореза — «голубого нативного» (BN-PAGE), «неокрашенного нативного» (CN-PAGE) и «неокрашенного нативного высокого разрешения» (hrCN-PAGE) для изучения особенностей протеомов клеток животных, растений и бактерий. Приведены ссылки на фундаментальные обзоры, основные протоколы, модификации исходных методов и на примеры комбинации нативного электрофореза с другими физическими или химическими методами. Особое внимание уделено принципам BN-, CN- и hrCN-PAGE и преимуществам и недостаткам этих методов.

Ключевые слова: нативный электрофорез, BN-PAGE, CN-PAGE, hrCN-PAGE, детергенты, ку-масси G-250.

Принцип метода нативного электрофореза

Под термином протеомика (proteomics) подразумевается исследование структуры и функции белков. Он возник по аналогии с термином геномика (genomics), который означает изучение структуры и функции генов (James, 1997). Термин протеом (proteome), впервые прозвучавший в 1996 г. (Wilkins et al., 1996), является производным от слов «protein» и «genome» и обозначает полный набор всех белков организма, органа или функциональной системы. В настоящее время понятия протеомика и протеом прочно вошли в обиход мировой научной литературы. Большая часть работ по протеомике выполняется с использованием разных видов нативного электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE), на свойствах которого мы остановимся далее.

В основе нативного PAGE лежит движение в электрическом поле солюбилизованных мягкими детергентами водорастворимых или мембранных белков в виде белок-липид-детергентных комплексов (рис. 1, 2). Миграция белков при PAGE происходит за счет их собственного отрицательного заряда или благодаря созданному на их поверхности искусственному отрицательному заряду. Как правило, большинство белков (в особенности основные белки) имеют низкий отрицательный заряд и при электрофорезе в условиях нейтрального pH движутся крайне медленно. Существенное увеличение суммарного отрицательного заряда на белках и соответственно возрастание скорости их миграции достигаются связыванием ими анионного красителя, Comassie brilliant blue G-250 (СВВ) или смеси анионных и неионных детергентов, таких как дезоксихолат (ДОХ) + додецилмальтозид (ДДМ) или ДОХ + Тритон X-100 (ТХ).

Электрофорез в полиакриламидном геле с использованием СВВ для создания дополнительного заряда на белках получил название голубой нативный электрофорез (BN-PAGE). Движение в геле кислых белков с pI ~5.5 за счет их внутреннего отрицательного заряда называется бесцветный (или неокрашенный) нативный электрофорез (CN-PAGE). Разновидностью CN-PAGE является бесцветный нативный электрофорез высокого разрешения (hrCN-PAGE), где дополнительный заряд на белках создается смесью неокрашенных анионных и неионных детергентов (см. выше), добавляемых в катодный буфер.

При нативном электрофорезе в градиентном полиакриламидном геле белки разделяются согласно своему размеру, а не благодаря соотношению заряд : масса. Индивидуальные белки или белковые комплексы, которые не могут разделиться при одномерном электрофорезе (1D PAGE), останавливаются, когда приблизятся к размеру тех пор градиентного геля, которые будут препятствовать их дальнейшей миграции (эффект молекулярного сита). В дальнейшем неразделившиеся белковые комплексы или агрегаты могут быть разделены в гелях с другой пористостью при использовании 2, 3 и 4 D PAGE.

Теория нативного электрофореза предполагает, что область поверхности биологической мембраны или сами солюбилизованные белки, приобретая негативный заряд благодаря связыванию краски или добавочного детергента, теряют свой гидрофобный характер. Более того, считается, что негативно заряженная поверхность солюбилизованных белков после связывания анионной краски или детергента вызывает отталкивание различных белков друг от друга. При этом тенденция мембранных белков агрегировать существенно снижается, и они превращаются фактически в водорастворимые белки. При-

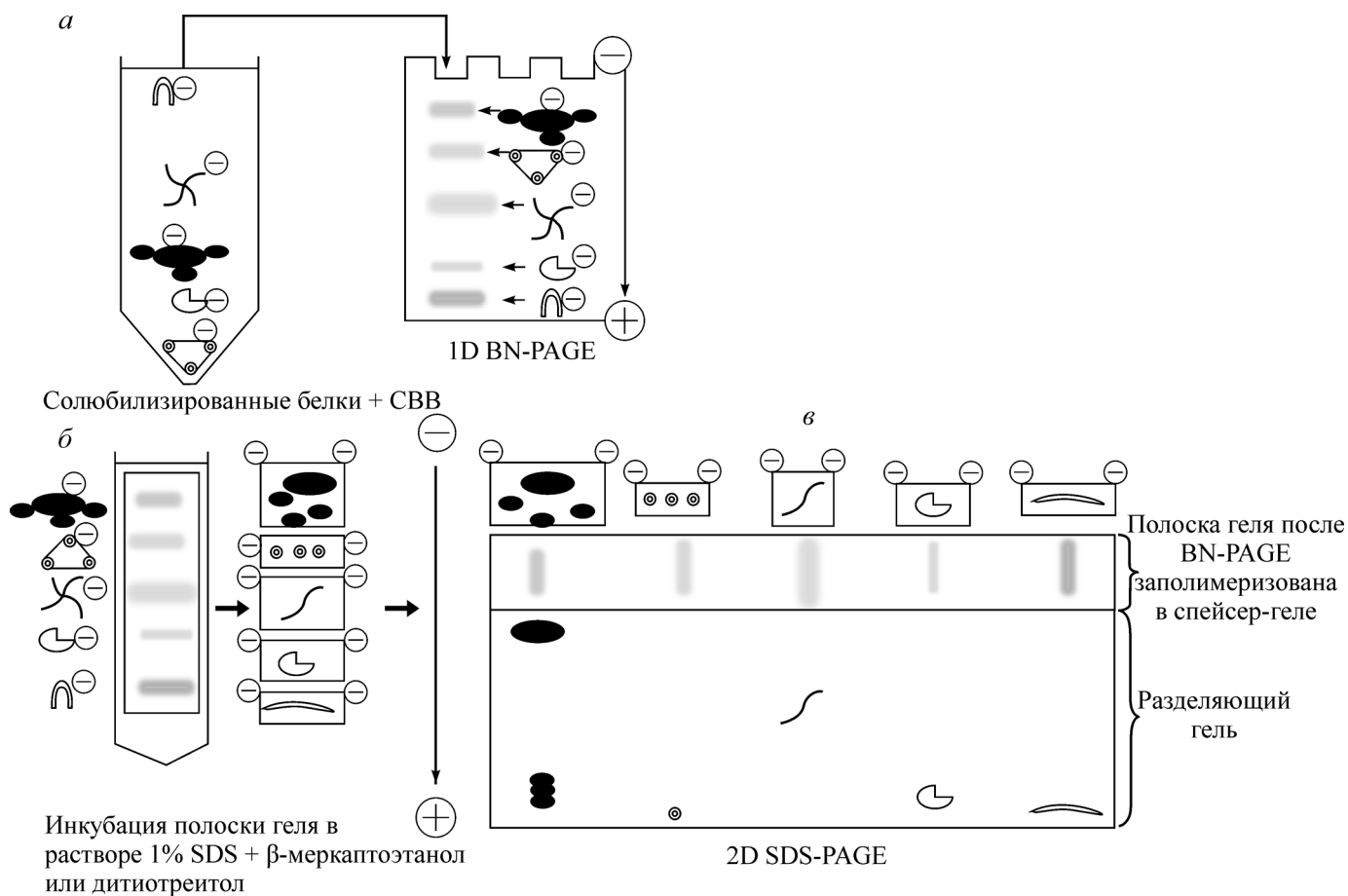


Рис. 1. Схема использования 1D BN-PAGE в сочетании с 2D SDS-PAGE.

а — 1D BN-PAGE, разделение согласно молекулярной массе; *б* — инкубация вырезанной полоски геля после BN-PAGE в смеси 1 % SDS + меркаптоэтанол или дитиотреитол, приводящая к разворачиванию белковых комплексов и диссоциации их до составляющих полипептидов; *в* — 2D SDS-PAGE диссоциированных белковых комплексов после включения вырезанной полоски геля в спейсер-гель нового геля. Благодаря остающемуся СВВ и связыванию с SDS полипептиды приобретают мощный суммарный отрицательный заряд и разделяются согласно их молекулярной массе.

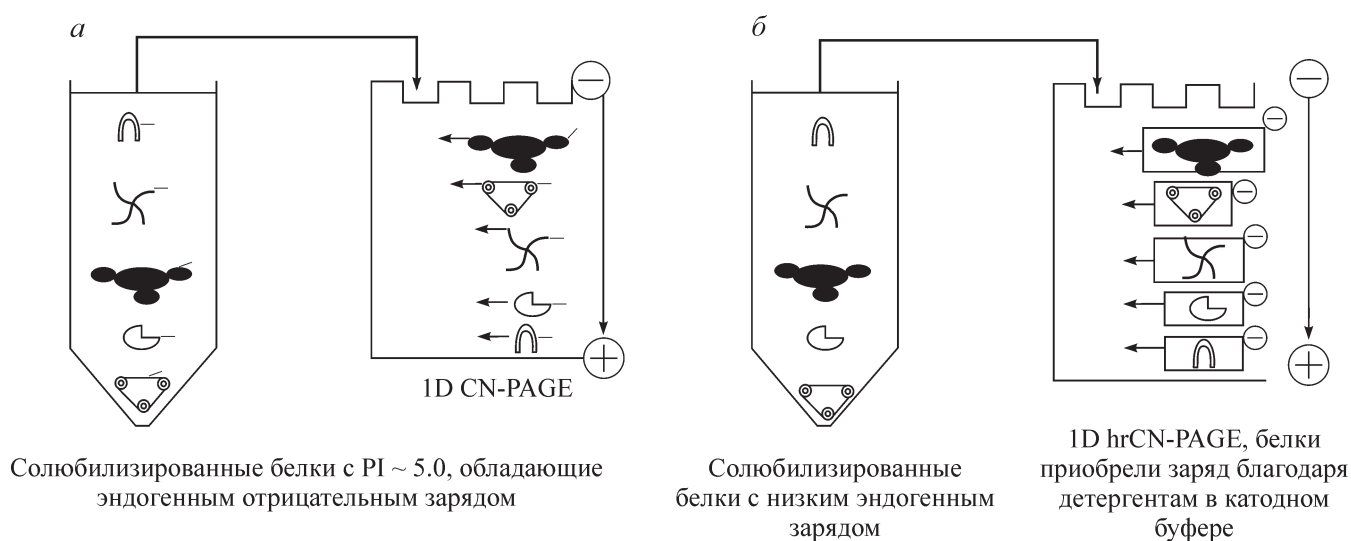


Рис. 2. Схематический принцип работы CN-PAGE и hrCN-PAGE.

а — CN-PAGE, разделение согласно молекулярной массе; *б* — hrCN-PAGE, белковые комплексы или отдельные белки получают дополнительный суммарный отрицательный заряд благодаря взаимодействию с растворенными в катодном буфере анионными (дезоксихолат) и неионными (Тритон X-100 или додецилмальтозид) детергентами и разделяются согласно молекулярной массе. В случаях *а* и *б* разделившиеся белки выявляются окраской СВВ.

нято также считать, что солиubilизация мягкими детергентами, связывание краски или детергентов для создания заряда да и само движение искусственно заряженных белков или их мультикомплексов в электрическом поле не меняют своих нативных свойств, в частности ферментативной активности. Это дает возможность определять ферментативную активность разделившихся белков непосредственно в геле. Таким образом, методы BN- и CN (hrCN)-PAGE, сохраняющие нативное состояние белка, выгодно отличаются от широко известного метода электрофореза в SDS (SDS-PAGE), где анализируемая проба денатурирована, полностью развернута и часто находится в неестественном для нативной структуры полностью восстановленном состоянии.

Как свидетельствует анализ отечественной литературы по протеомике, ни BN-, ни CN (hrCN)-PAGE до недавнего времени не применялись в нашей стране. Первые работы по использованию этих методов для изучения мембранного белка — родопсина — появились лишь недавно (Shukolyukov, 2009, 2010). Нам представляется, что в настоящее время возникла необходимость детально проинформировать отечественного читателя относительно этих сравнительно недорогих, точных и быстрых методов. В связи с громадным массивом работ в медицине и биологии, где успешно были применены методы нативного электрофореза, наше внимание по понятным причинам будет сосредоточено только на особо интересных работах с точки зрения методов и результатов.

В задачу настоящего мини-обзора входит: доступно изложить специфику методов нативного электрофореза, рассказать об их достоинствах и недостатках, снабдить эту информацию основными ссылками по разнообразному применению, а также обратить внимание читателя на последние обзоры и на новые методические подходы и рекомендации. Нам представляется, что выполнение этой скромной задачи создаст определенную основу для пропаганды и массового использования в нашей стране BN- или CN (hrCN)-PAGE с целью изучения различных протеомов в самых разнообразных разделах медицинской и биологической науки.

Метод BN-PAGE

Применение BN- PAGE. Этот метод был первоначально разработан как 1D PAGE для разделения мембранных белков митохондриальных дыхательных комплексов, имеющих диапазон кажущейся мол. массы (M app) 10 кДа—10 мДа (Schägger, von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994; Schägger, 2001). Впоследствии методология была расширена до 2D и 3D BN-PAGE с дополнением комбинации с SDS-PAGE и изоэлектрофокусированием (Wittig et al., 2006). С целью выделить трудно разделяемые гидрофобные белки, склонные к агрегации, позже протокол был усложнен введением 4D-электрофоретической системы (два нативных и два денатурирующих разделения) (Burté et al., 2009; Wumaier et al., 2009). Метод BN-PAGE нашел самое разнообразное применение во многих областях биологии и медицины. Приведенный ниже список его использования далеко не исчерпывает всех его возможностей в протеомике. На сегодняшний день BN-PAGE используется: при выделении мембранных белковых комплексов из биологических мембран (Schägger, 1995, 2001; Ludwig et al., 1998; Pfeiffer et al., 2003), целых клеток, лизатов клеток и тканевых гомогенатов (Vahsen et

al., 2004; Remmerie et al., 2009); для клинической диагностики митохондриальных патологий (Schägger et al., 1996, 2004; Murayama et al., 2009); для того чтобы идентифицировать физиологические белок-белковые взаимодействия (Carrozzo et al., 2006) и белковую агрегацию (Schägger, Pfeiffer, 2000; Shukolyukov, 2009); в протеомике ядра клетки (Braz, Howard, 2009) и для изучения апоптоза (Nováková et al., 2006); при работах с антителами (Valentijn et al., 2008); для изучения поринов и других компонентов наружной мембраны бактерий (Marzoa et al., 2009; Zickermann et al., 2010); для изучения ферментативных активностей в геле (Sabar et al., 2005; Dresler et al., 2010); в протеомике водорастворимых белков (Yan et al., 2007) и водорастворимых ферментов (Singh et al., 2005; Srivastava et al., 2008); для изучения возрастных проблем в геронтологии (Blough et al., 2007; Kim et al., 2007; Mailloux et al., 2008), а также для решения многих других задач (Wittig et al., 2006).

Основная методология BN-PAGE для изучения протеомов животных и растений описана в руководствах, обзорах и некоторых экспериментальных работах (Schägger, von Jagow, 1991; Eubel et al., 2005; Krause, 2006; Wittig et al., 2006; Braun et al., 2007; Reisinger, Eichacker, 2007, 2008; Sunderhaus et al., 2007; Bailey et al., 2008; Distler et al., 2008; Krause, Seelert, 2008; Schamel, 2008; Wittig, Schägger, 2008, 2009; Wumaier et al., 2009). Этот список можно было бы продолжить и дальше. Хотелось бы упомянуть недавно вышедший обзор (Dresler et al., 2010), который демонстрирует, что BN-PAGE является мощным инструментом и для исследований протеомов микробиологических мембран, включающих представителей археобактерий (*Archae*), грамположительных и грамотрицательных бактерий и *Chlamydia*.

В последние годы возрастает число примеров использования совместно с BN-PAGE других физических или биохимических методов. Так, заслуживают упоминания сочетание BN-PAGE с разными видами масс-спектрометрии — MALDI-TOF-MS и LA-ICP-MS (Becker et al., 2008), LC-MS/MS (Wessels et al., 2009), LILBID (Sokolova et al., 2010), комбинация BN-PAGE с регистрацией флуоресценции при дифференциальном гелевом электрофорезе (DIGE), позволяющая усилить эффективность разделения мономеров или мультибелковых ансамблей (Dani et al., 2010), а также сочетание BN-PAGE с эксклюзионной хроматографией (SEC) и динамическим светорассеянием (DLS) (Ma, Xia, 2008), с нативным жидкофазным изоэлектрофокусированием (D'Amici et al., 2008) и с гель-фильтрацией (Remmerie et al., 2009).

Необходимо отметить и некоторые модификации, которым подвергся классический метод BN-PAGE. Так, например, для разделения митохондриальных белковых комплексов мозга крысы был использован крупнопористый, не градиентный полиакриламидный гель, позволяющий не только выявить митохондриальные комплексы I—V, но провести последующий анализ их ферментативной активности в геле и масс-спектрометрическое определение пептидной последовательности, но также идентифицировать полимеры белка Hsp60 и дигидролипоамид дегидрогеназу (DLDH) (Yan, Forster, 2009). Интересен метод ретардации в геле при BN-PAGE (BN-PAGE retardation assay), позволяющий регистрировать взаимодействия белковых комплексов с биомолекулами, которые были включены в гель и вызвали замедление движения этих комплексов (Swamy et al., 2009). Благодаря этому методу авторам удалось доказать, что олигомер триозофосфат изомеразы ведет себя как декстрансвязыва-

ющий комплекс. Другая модификация объединяет BN-PAGE и непрерывную электрофоретическую элюцию (CEE), в результате чего были получены жидкофазные фракции белковых комплексов вплоть до M_{app} 800 кДа (Huang et al., 2009). Описан протокол 2D BN/SDS PAGE, в котором гель BN одного направления полимеризуется на пленке GELBond PAG (Klepsch et al., 2008). Такая иммобилизация предотвращает перекашивание белковых полос вдоль линий нанесения, что существенно повышает воспроизводимость метода. Возможности метода BN-PAGE можно существенно расширить, если экстрагированные белки, связывающие нуклеиновые кислоты, предварительно осадить стрептомицин сульфатом, а сами нуклеиновые кислоты затем удалить добавлением полиэтиленimina (Liang et al., 2009). Многие лаборатории адаптировали BN-PAGE для создания в протеомике окислительного фосфорилирования белковых карт высокого разрешения (Andringa et al., 2009). Для разделения трудноразделяемых бактериальных мембранных белков вместо изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле была применена комбинация BN-PAGE и изоэлектрофокусирования в агарозе, что позволило выделить в одном направлении мембранные белки в нативном состоянии, а также обнаружить добавочные белковые полосы (Altenhofer et al., 2006). Заслуживает упоминания модификация BN-PAGE, где классическая непрерывная буферная система была заменена на прерывную, в которой, как и в системе Лэммли (Laemmli, 1970), в качестве высокоподвижного аниона в геле и анодном буфере был использован ион Cl. При этом обычный медленный дипольный ион глицин в катодном буфере был заменен на гистидин (Niermann, Zheng, 2006).

Недостатки, достоинства и тонкости метода BN-PAGE. Как видно из приведенных данных, метод BN-PAGE широко применяется в разнообразных направлениях биологии и медицины, дает воспроизводимые результаты и описан во многих протоколах. Однако для получения надежных результатов, даже руководствуясь уже отработанными прописями, необходимо обращать внимание прежде всего на первый и самый важный этап — на соллюбилизацию изучаемого белка. На результаты соллюбилизации мембран и белков оказывают влияние не только детергент-липидные и детергент-белковые взаимодействия, но также и липид-липидные, липид-белковые и белок-белковые взаимодействия. Поэтому для получения стабильных и воспроизводимых результатов необходимо обращать внимание на постоянство молярных соотношений белок: детергент, детергент: СВВ и белок : СВВ. Считается, что на практике оптимальные условия соллюбилизации каждой мембраны или мембранного белка должны подбираться индивидуально, поскольку экспериментальные результаты часто не соответствуют теоретическим расчетам (Reisinger, Eichacker, 2008). Для сохранения нативных свойств соллюбилизированных белков используют мягкие неионные детергенты: дигитонин, додецилмальтозид, Тритон X-100, бридж-96, октилглюкозид, сапонин, CHAPS, n-Decanoylsucrose и NP-40 (Eubel et al., 2005). Однако жесткий анионный детергент SDS также может быть использован (Shukolyukov, 2010). Для подавления протеазной активности, а также для полной соллюбилизации мембранных белков рекомендуется добавлять в пробу 6-аминогексановую кислоту, а также хлорид натрия или ацетат калия (Eubel et al., 2005; Wittig et al., 2006). Большим преимуществом метода BN-PAGE является возможность быстрого и точного определения

кажущейся молекулярной массы опытных мембранных и растворимых белков, которые связывают СВВ. Для этого необходимо использовать в тех же условиях соответствующие нативные белки-маркеры с известной молекулярной массой, которые на калибровочном графике будут проявлять линейную зависимость логарифма M_{app} белка от величины пути их миграции (Rf). Однако здесь все обстоит не так гладко. Как правило, при определении M_{app} методом BN-PAGE не учитывается, что неодинаковая форма различных мембранных белков, а также разная степень их развернутости в детергентах с разной степенью жесткости могут оказать влияние на их подвижность в электрическом поле. При изучении M_{app} димера родопсина мы столкнулись с этой проблемой, обнаружив, что местоположение этого белка в геле (и соответственно рассчитанная M_{app}) после BN-PAGE неодинаково в детергентах, различающихся разной степенью жесткости (Shukolyukov, 2009, 2010).

Разумеется, BN-PAGE, как и всякому методу, присущи некоторые недостатки, которые могут частично ограничить его применение. Одним из таких недостатков является невозможность полностью убрать СВВ из геля и отделить его от разделившихся белковых полос. Остающийся СВВ может полностью гасить эндогенную флуоресценцию самого белка (например, как это произошло с N-ретинил опсином; Shukolyukov, 2010) или экзогенную флуоресценцию красителей, которым предварительно был помечен белок (Wittig et al., 2006), а также подавлять ферментативную активность того или иного белка в геле, что требует каждый раз индивидуальной проверки. Некоторые белок-белковые взаимодействия субъединиц комплексов в присутствии СВВ могут разрушаться, что может приводить к диссоциации комплексов до их составляющих. Так, соллюбилизированная детергентом F_0F_1 АТФ-синтаза шпината остается интактной при BN-PAGE, если концентрация СВВ в катодном буфере составляет 0.002 % (Neff, Dencher, 1999), но количественно распадается на два субкомплекса F_0 и F_1 после увеличения концентрации СВВ в буфере до общеупотребительной (0.02 %) (Schägger, von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Высокие концентрации СВВ, добавленного к высокоочищенной строме хлоропластов *Arabidopsis* перед BN-PAGE, приводили к снижению ее устойчивости (Peltier et al., 2006). Известно также, что некоторые металлодержачие белки при BN-PAGE могут терять свой лиганд. Так, например, в результате BN-PAGE супероксид дисмутаз (содержит ионы Cu и Zn) и алкогольдегидрогеназа (содержит ионы Zn) теряют эти металлы, причем степень потери зависит не только от параметров электрофоретического процесса (денатурирующий или неденатурирующий электрофорез, величина приложенного тока) и способов обработки геля после разделения (фиксация и окраска), но и от природы медленного дипольного иона в катодном буфере (Jiménez et al., 2010). Для получения корректных количественных результатов эти авторы рекомендуют предпочтительно использовать неденатурирующий BN-PAGE, трицин как медленный дипольный ион, низкие значения тока, а также неокрашенный гель. Необходимо упомянуть также, что большим неудобством метода BN-PAGE является невозможность нанести пробу белка под катодный буфер без специального аппликатора (например, ориентира ReadyGel Sample, Bio-Rad, США), поскольку наносимая проба и катодный буфер из-за их синего цвета полностью сливаются друг с другом и глазом не различаются.

CN-PAGE: применение, достоинства и недостатки

После разработки BN-PAGE (Schägger, von Jagow, 1991) из той же лаборатории в 1994 г. вышел протокол CN-PAGE, который представляет собой фактически систему BN-PAGE, но из которой был удален СВВ (Schägger et al., 1994). Однако в этих условиях в отличие от BN-PAGE мигрировать к аноду могут только кислые белки, а их электрофоретическая подвижность определяется не только их размером, но и величиной pI . Практика разделения с помощью CN-PAGE различных растворимых кислых белков или комплексов белок—липид—детергент, солибилизированных из мембран с $pI < 5.5$, показывает, что разделяемый материал может иметь достаточный заряд, чтобы обеспечить такую же подвижность в геле, как и при BN-PAGE, но может и существенно отставать, что особенно заметно для комплексов окислительного фосфорилирования (Krause, 2006; Wittig, Schägger, 2009). Поэтому в случае применения CN-PAGE для неизвестных белков требуются «пристрелочные» эксперименты, позволяющие выяснить применимость этого метода. К тому же разрешение полос при CN-PAGE несколько хуже, чем при BN-PAGE, что проявляется в их диффузности и в эффекте «размазывания». Вдобавок в условиях CN-PAGE мембранные белки могут быть склонны к агрегации. Поскольку при CN-PAGE дистанция миграции белков зависит от их внутреннего заряда (а он определяется их pI), а также от размера пор градиентного геля, использовать этот метод для определения M_{app} нативных белков, а также для изучения состояния их олигомеризации достаточно проблематично. В то же время CN-PAGE явно демонстрирует достоинства в том случае, когда после разделения белков необходимо предпринять дальнейшее изучение нативных комплексов, например определять в геле их каталитическую активность, эндогенную или экзогенную флуоресценцию меченых белков (Wittig, Schägger, 2005). К тому же CN-PAGE из-за исключения дополнительного влияния СВВ значительно мягче, чем BN-PAGE. В сочетании с самым мягким неионным детергентом дигитонином электрофорез CN-PAGE может сохранять лабильные супрамолекулярные ассамблеи мембранных белковых комплексов (например, митохондриальную АТФ-синтазу), которые быстро диссоциируют в условиях электрофореза BN-PAGE (Pfeiffer et al., 2003; Wittig, Schägger, 2005). Подробности сравнения CN- и BN-PAGE для растительных и животных объектов можно узнать в обзорах (Wittig, Schägger, 2005, 2009; Krause, 2006).

hrCN-PAGE: первые результаты применения

Как уже упоминалось ранее, hrCN-PAGE является модификацией метода CN-PAGE, обладающего, как мы видим, определенными недостатками. Для того чтобы сохранить преимущества двух техник, BN- и CN-PAGE, в 2007 г. Виттиг и сотрудники (Wittig et al., 2007) заменили СВВ в катодном буфере BN-PAGE на неокрашенную смесь анионных и нейтральных детергентов (ДОХ + ТХ или ДОХ + ДДМ). Как сообщают авторы (Wittig et al., 2007), смешанные мицеллы детергентов подобно краске СВВ приводят к сдвигу заряда на поверхности белков и тем самым увеличивают скорость миграции белков по на-

правлению к аноду, а также поддерживают их растворимость во время электрофореза. На примере разделения и специфической окраски митохондриальных комплексов I—V непосредственно в геле, количественного определения в геле белков с эндогенной флуоресценцией или белков, меченных реактивными флуоресцентными красками, было убедительно показано преимущество метода hrCN-PAGE над CN- и BN-PAGE (Wittig et al., 2007). Первый опыт применения этого метода для изучения мембранного белка родопсина также продемонстрировал возможность выявления тонкой локализации флуоресцирующего N-ретинилопсина в геле и антител к родопсину на мембранных блотах (Shukolyukov, 2010). В этой же работе (Shukolyukov, 2010) было показано, что в условиях hrCN-PAGE белки-маркеры овальбумин и β -лактоглобулин в отличие от бычьего сывороточного альбумина усиленно олигомеризуются, хотя, по представлениям авторов этого метода (Wittig et al., 2007), смешанные мицеллы детергентов должны препятствовать агрегации любых белков, в том числе и растворимых. Надо надеяться, что широкое применение этого метода в будущих исследованиях по протеомике приведет к объяснению этого факта.

Заключение

Приведенные в обзоре факты показывают, что BN-PAGE, несмотря на существование ряда недостатков (не может быть использован для регистрации флуоресценции белков в геле, приводит к ингибированию активности некоторых ферментов и к диссоциации ряда мультиферментных комплексов, краситель СВВ трудно удалить с белковых полос и др.), является мощным инструментом для изучения протеома клеток бактерий, растений и животных и активно используется в самых разнообразных разделах биологии и медицины. Этот метод легко и просто сочетается с другими биохимическими или биофизическими методами (изоэлектрофокусирование, эксклюзионная хроматография, динамическое светорассеяние, гель-фильтрация и масс-спектрометрия, денатурирующий электрофорез и др.) и успешно подвергается различным модификациям, касающимся пористости носителя, буферной системы и др. Метод CN-PAGE дает возможность регистрировать флуоресценцию и ферментативную активность непосредственно в геле, но страдает низким разрешением (размазывание белковых полос) и может быть применен только для кислых белков, имеющих высокий уровень эндогенного суммарного отрицательного заряда. Достоинства методов BN-PAGE и CN-PAGE были сохранены в методе hrCN-PAGE благодаря удалению СВВ и введению в катодный буфер вместо него смеси анионного детергента ДОХ и неионного детергента ДДМ (или ТХ), которые создают на белках искусственный отрицательный заряд, так как это делает СВВ при BN-PAGE. Благодаря такой модификации в условиях hrCN-PAGE можно разделять любые щелочные и нейтральные белки при $pH 7.0$ в нативном состоянии и определять их флуоресценцию и ферментативную активность непосредственно в геле, что открывает широкие возможности для применения этого метода.

Хочется верить, что приведенная информация не оставит отечественного читателя равнодушным и будет стимулировать его к использованию перечисленных методов нативного электрофореза для решения самых разнообразных задач по протеомике клетки.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00691-а) и программы Отделения биологических наук РАН (проект 1Б-05).

Список литературы

- Altenhofer P., Schierhorn A., Fricke B. 2006. Agarose isoelectric focusing can improve resolution of membrane proteins in the two-dimensional electrophoresis of bacterial proteins. *Electrophoresis*. 27 : 4096—4111.
- Andringa K., King A., Bailey S. 2009. Blue native gel electrophoresis proteomics. *Methods Mol. Biol.* 519 : 241—258.
- Bailey S. M., Andringa K. K., Landar A., Darley-Usmar V. M. 2008. Proteomic approaches to identify and characterize alterations to the mitochondrial proteome in alcoholic liver disease. *Methods Mol. Biol.* 447 : 369—380.
- Becker J. S., Mounicou S., Zoriv M. V., Becker J. S., Lobinski R. 2008. Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*. 76 : 1183—1188.
- Blough E. R., Rice K. M., Desai D. H., Wehner P., Wright G. L. 2007. Aging alters mechanical and contractile properties of the Fisher 344/Nnia X Norway/Binia rat aorta. *Biogerontology*. 8 : 303—313.
- Braun R. J., Kinkl N., Beer M., Ueffing M. 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 : 1033—1045.
- Braz V. A., Howard K. J. 2009. Separation of protein oligomers by blue native gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 388 : 170—172.
- Burré J., Wittig I., Schägger H. 2009. Non-classical 2-D electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 564 : 33—57.
- Carrozzo R., Wittig I., Santorelli F. M., Bertini E., Hofmann S., Brandt U., Schägger H. 2006. Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Ann. Neurol.* 59 : 265—275.
- D'Amici G.M., Timperio A.M., Zolla L. 2008. Coupling of native liquid phase isoelectrofocusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation. *J. Proteome Res.* 7 : 1326—1340.
- Dani D., Shimokawa I., Komatsu T., Higami Y., Warnken U., Schokraie E., Schnolzer M., Krause F., Sugawa M.D., Dencher N. A. 2010. Modulation of oxidative phosphorylation machinery signifies a prime mode of anti-ageing mechanism of calorie restriction in male rat liver mitochondria. *Biogerontology*. 11 : 321—334.
- Distler A. M., Kerner J., Hoppel C. L. 2008. Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes. *Proteomics*. 8 : 4066—4082.
- Dresler J., Klimentova J., Stulik J. 2010. Bacterial protein complexes investigation using blue native PAGE. *Microbiol. Res.* doi:10.1016/j.micres.2010.01.005.
- Eubel H., Braun H.P., Millar A.H. 2005. Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions. *Plant Methods* 1 : 1—13.
- Huang K. Y., Filarsky M., Padula M. P., Raftery M. J., Herbert B. R., Wilkins M. R. 2009. Micropreparative fractionation of the complexome by blue native continuous elution electrophoresis. *Proteomics*. 9 : 2494—2502.
- James P. 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quart. Rev. Biophys.* 30 : 279—331.
- Jiménez M. S., Rodríguez L., Gomez M. T., Castillo J. R. 2010. Metal-protein binding losses in proteomic studies by PAGE-LA-ICP-MS. *Talanta*. 81 : 241—247.
- Kim H., Eliuk S., Deshane J., Meleth S., Sanderson T., Pinner A., Robinson G., Wilson L., Kirk M., Barnes S. 2007. 2D gel proteomics: an approach to study age-related differences in protein abundance or isoform complexity in biological samples. *Methods Mol. Biol.* 371 : 349—391.
- Klepsch M., Schlegel S., Wickstrom D., Friso G., van Wijk K. J., Persson J. O., de Gier J. W., Wagner S. 2008. Immobilization of the first dimension in 2D blue native/SDS-PAGE allows the relative quantification of membrane proteomes. *Methods*. 46 : 48—53.
- Krause F. 2006. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*. 27 : 2759—2781.
- Krause F., Seelert H. 2008. Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr. Protocol Protein Sci.* Chapter 14 : Unit 14.11.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Liang J., Niu Q., Xu X., Luo Y., Zhou X., Deng Z., Wang Z. 2009. Effective elimination of nucleic acids from bacterial protein samples for optimized blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 30 : 2454—2459.
- Ludwig J., Kerscher S., Brandt U., Pfeiffer K., Getlawi F., Apps D. K., Schägger H. 1998. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 273 : 10 939—10 947.
- Ma J., Xia D. 2008. The use of blue native PAGE in the evaluation of membrane protein aggregation states for crystallization. *J. Appl. Crystallogr.* 41 : 1150—1160.
- Mailloux R. J., Darwich R., Lemire J., Appanna V. 2008. The monitoring of nucleotide diphosphate kinase activity by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 7 : 1484—1489.
- Marzoa J., Abel A., Sánchez S., Chan H., Feavers I., Criado M. T., Ferreirós C. M. 2009. Analysis of outer membrane porin complexes of *Neisseria meningitidis* in wild-type and specific knock-out mutant strains. *Proteomics*. 3 : 648—656.
- Murayama K., Nagasaka H., Tsuruoka T., Omata Y., Horie H., Tregoning S., Thorburn D. R., Takayanagi M., Ohtake A. 2009. Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 168 : 297—302.
- Neff D., Dencher N. A. 1999. Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, CFo and CF1 by blue native electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259 : 569—575.
- Niepmann M., Zheng J. 2006. Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 27 : 3949—3951.
- Nováková Z., Man P., Novák P., Hozák P., Hodný Z. 2006. Separation of nuclear protein complexes by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 27 : 1277—1287.
- Peltier J. B., Cai Y., Sun Q., Zabrouskov V., Giacomelli L., Rudella A., Ytterberg A. J., Rutschow H., van Wijk K. J. 2006. The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol. Cell. Proteomics*. 5 : 114—133.
- Pfeiffer K., Gohil V., Stuart R. A., Hunte C., Brandt U., Greenberg M. L., Schägger H. 2003. Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 278 : 52 873—52 880.
- Reisinger V., Eichacker L. A. 2007. How to analyze protein complexes by 2D blue native SDS-PAGE. *Proteomics*. 7 : 6—16.
- Reisinger V., Eichacker L. A. 2008. Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J. Proteomics*. 71 : 277—283.
- Remmerie N., Roef L., Van De Slijke E., Van Leene J., Persiau G., Eeckhout D., Stals H., Laukens K., Lemièrre F., Esmans E., Van Onckelen H., Inzé D., De Jaeger G., Witters E. 2009. A bioanalytical method for the proteome wide display and analysis of protein complexes from whole plant cell lysates. *Proteomics*. 9 : 598—609.
- Sabar M., Balk J., Leaver C. J. 2005. Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant J.* 44 : 893—901.
- Schägger H. 1995. Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol.* 260 : 190—202.

- Schägger H. 2001. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol.* 65 : 231—244.
- Schägger H., von Jagow G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199 : 223—231.
- Schägger H., Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19 : 1777—1783.
- Schägger H., Cramer W. A., von Jagow G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217 : 220—230.
- Schägger H., Bentlage H., Ruitenbeek W., Pfeiffer K., Rother S., Rother C., Böttcher-Purkl A., Lodemann E. 1996. Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation. *Electrophoresis* 17 : 709—714.
- Schägger H., de Coo R., Bauer M. F., Hofmann S., Godinot C., Brandt U. 2004. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 279 (35) : 36 349—36 353.
- Schamel W. W. 2008. Two-dimensional blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Curr. Protocol Cell Biol.* Chapter 6 : Unit 6.10.
- Shukolyukov S. A. 2009. Aggregation of frog rhodopsin to oligomers and their dissociation to monomer: application of BN- and SDS-PAGE. *Biochemistry (Mosc.)*. 74 : 599—604.
- Shukolyukov S. A. 2010. Proof of oligomeric state of frog rhodopsin: visualization of dimer and oligomers on gels after BN- and HRCN-PAGE with the help of antibodies to rhodopsin and by retinopsin fluorescence. *Biochemistry (Mosc.)*. 75 : 1157—1165.
- Singh R., Chénier D., Bériault R., Mailloux R., Hamel R. D., Appanna V. D. 2005. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis and the monitoring of malate- and oxaloacetate-producing enzymes. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 64 : 189—199.
- Sokolova L., Wittig I., Barth H. D., Schägger H., Brutschy B., Brandt U. 2010. Laser-induced liquid bead ion desorption-MS of protein complexes from blue-native gels, a sensitive top-down proteomic approach. *Proteomics.* 10 : 1401—1407.
- Srivastava K., Chaves J. M., Srivastava O. P., Kirk M. 2008. Multi-crystallin complexes exist in the water-soluble high molecular weight protein fractions of aging normal and cataractous human lenses. *Exp. Eye Res.* 87 : 356—366.
- Sunderhaus S., Eubel H., Braun H.P. 2007. Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes. *Methods Mol. Biol.* 372 : 315—324.
- Swamy M., Molnar E., Bock T., Bausch-Fluck D., Wollscheid B., Schamel W. W. 2009. Detection of protein complex interactions via a Blue Native-PAGE retardation assay. *Anal. Biochem.* 392 : 177—179.
- Vahsen N., Candé C., Brière J. J., Bénit P., Joza N., Larochette N., Mastroberardino P. G., Pequignot M. O., Casares N., Lazar V., Feraud O., Debili N., Wissing S., Engelhardt S., Madeo F., Piacentini M., Penninger J.M., Schägger H., Rustin P., Kroemer G. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23 : 4679—4689.
- Valentijn A. J., Upton J. P., Gilmore A. P. 2008. Analysis of endogenous Bax complexes during apoptosis using blue native PAGE: implications for Bax activation and oligomerization. *Biochem. J.* 2 : 347—357.
- Wessels H. J., Vogel R. O., van den Heuvel L., Smeitink J. A., Rodenburg R. J., Nijtmans L. G., Farhoud M.H. 2009. LC-MS/MS as an alternative for SDS-PAGE in blue native analysis of protein complexes. *Proteomics.* 9 : 4221—4228.
- Wilkins M. R., Pasquali C., Appel R. D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.-C., Yan J. X., Gooley A. A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K. L., Hochstrasser D. F. 1996. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology.* 14 : 61—65.
- Wittig I., Schägger H. 2005. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics.* 5 : 4338—4346.
- Wittig I., Schägger H. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics.* 8 : 3974—3990.
- Wittig I., Schägger H. 2009. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics.* 9 : 5214—5223.
- Wittig I., Braun H.-P., Schägger H. 2006. Blue native PAGE. *Nature Protocols.* 1 : 418—428.
- Wittig I., Karas M., Schägger H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics.* 6 : 1215—1225.
- Wumaier Z., Nübel E., Wittig I., Schägger H. 2009. Two-dimensional native electrophoresis for fluorescent and functional assays of mitochondrial complexes. *Methods Enzymol.* 456 : 153—168.
- Yan L. J., Forster M. 2009. Resolving mitochondrial protein complexes using nongradient blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 389 : 143—149.
- Yan L. J., Yang S. H., Shu H., Prokai L., Forster M. J. 2007. Histochemical staining and quantification of dihydroipoamide dehydrogenase diaphorase activity using blue native PAGE. *Electrophoresis.* 28 : 1036—1045.
- Zickermann V., Wumaier Z., Wrzesniewska B., Hunte C., Schägger H. 2010. Native immunoblotting of blue native gels to identify conformation-specific antibodies. *Proteomics.* 10 : 159—163.

Поступила 2 VIII 2010

NATIVE ELECTROPHORESIS IN CELL PROTEOMICS: BN-PAGE AND CN-PAGE

S. A. Shukolyukov

I. M. Sechenov Institute for Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg; e-mail: tinycapers@mail.ru

The presented mini-review aims to attract the attention of domestic researchers for rapid, cheap and easily reproducible method of native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), which for some reason has not yet found application in our country. The review collected the most interesting examples of the use of three types of native electrophoresis (BN-PAGE, CN-PAGE and hrCN-PAGE) to study the peculiarities of proteomes of various animal, plant and bacterial cells. The references to fundamental reviews, basic protocols, modifications of the initial methods and the examples of the combination of native electrophoresis with other chemical or physical methods are presented. Particular attention to the principles of BN-, CN- and hrCN-PAGE as well as to their advantages and disadvantages is paid.

Key words: native electrophoresis, BN-PAGE, CN-PAGE, hrCN-PAGE, detergents, Comassie G-250.