

ПРИМЕНЕНИЕ КОММЕРЧЕСКОГО ФИРМЕННОГО ПРИБОРА DUAL GEL MODULE ДЛЯ ДВУХМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПААГ

© *И. Н. Евтеева,¹ Т. Ю. Старкова, А. В. Артемов, Н. А. Барлев²*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 190064;
электронный адрес: ¹ evtin@mail.cytspb.rssi.ru, ² nick.a.barlev@gmail.com*

Двухмерный электрофорез продолжает оставаться одним из основных методов при изучении биологического разнообразия белков. Описанный еще в 1975 г., он включает в себя два последовательных этапа: изоэлектрофокусирование в первом направлении и распределение белков в полиакриламидном геле по молекулярной массе — во втором. В настоящей работе мы хотим обратить внимание читателей на некоторые технические параметры фирменного прибора Dual Gel Module, благодаря которым можно электрофоретически разделять полипептиды в обоих направлениях. На примере высокоочищенных коммерческих белков показана идентичность их распределения в системе детекции, выполненной на приборе Dual Gel Module (США) и выполненной с использованием готовых стрипов и оборудования GE Healthcare (США).

Ключевые слова: изоэлектрофокусирование, двухмерный электрофорез, амфолины, стрипы, коммерческий модуль.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, ДТТ — дитиотреитол, ПААГ — полиакриламидный гель, ТЕМЕД — N,N,N-тетраэтилметилэтилендиамин, DSNa — додецилсульфат натрия.

Последнее десятилетие характеризуется бурным развитием исследований в области протеомики. Современные методы протеомного анализа позволяют выявлять изменения в содержании множества белков, а в сочетании с некоторыми вариантами масс-спектрометрии идентифицировать и посттрансляционные модификации пептидов (Говорун, Арчаков, 2002).

В основе метода разделения белков двухмерным (2D) электрофорезом лежит методический прием, описанный еще в 1975 г. О'Фарреллом (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977). Принцип, который использовал автор, включает в себя разделение белков по двум не коррелирующим между собой признакам — изоэлектрической точке и молекулярной массе белка (O'Farrell, 1975; Малыгин, 1993).

Изоэлектрофокусирование (первое направление) проводили в стеклянных трубочках, а разделение белковых цепей по молекулярной массе (второе направление) — в плоском полиакриламидном геле. Описанный О'Фарреллом метод разделения белков был революционным, но процедура приготовления гелей в обоих направлениях — несколько громоздкой и трудоемкой. Именно по этой причине, несмотря на многочисленные усовершенствования, 2D-электрофорез долгое время оставался своего рода искусством, а его внедрение в лабораторную практику было затруднено (Малыгин, 1993; Говорун и др., 2002).

Развитие современных технологий привело к тому, что для целей изоэлектрофокусирования стали использо-

вать стрипы, т. е. гелевые полоски с иммобилизованными на них амфолинами разного диапазона pH. Применение готовых (коммерческих) стрипов — это безусловно шаг вперед в развитии методической базы протеомики. Однако высокая стоимость стрипов и необходимость использования дорогостоящего оборудования являются определенными сдерживающими факторами в распространении этой технологии в широком масштабе. Следует также подчеркнуть, что конечный результат, полученный при разделении пептидов методом 2D-электрофореза, часто зависит не только от способа разделения, но и от предварительной подготовки пробы и качества экспериментального образца (Rabilloud, 1996).

Учитывая эти обстоятельства и те методические задачи, которые нам предстояло решать, мы сосредоточили наше внимание на фирменном (коммерческом) устройстве Dual Gel Module (см. каталог: Electrophoresis, ICN, 2001—2002). Мы использовали это современное и сравнительно недорогое лабораторное оборудование, дополнив его некоторыми рабочими деталями, в ставшем уже классическим методе разделения белков по О'Фарреллу (O'Farrell, 1975). Мы также продемонстрировали на примере высокоочищенных (коммерческих) белков отсутствие принципиальной разницы в их профилировании в системе детекции, выполненной на приборе Dual Gel Module, и в системе, использующей технологию коммерческих стрипов и оборудование GE Healthcare (США).

Материал и методика

Описание коммерческого устройства Dual Gel Module. Устройство представляет собой компактную и небольшую по объему камеру для проведения электрофореза. Внешний вид этой камеры представлен в каталоге (Electrophoresis, ICN, 2001—2002). На рис. 1 схематично представлены три основных элемента прибора: *а* — основная камера вместимостью около 1 л, *б* — крышка, *в* — маленькая внутренняя камера для верхнего буфера. Электрод для верхней камеры расположен на внутренней поверхности крышки. Нижний электрод проходит по дну большой камеры.

Особенностью данного устройства является то, что в нем можно проводить разделение белков сразу на двух гелях при условии одинаковой буферной системы. При разгонке одного геля в системе предусмотрено использование блокирующего устройства (платы). Она изготовлена из инертного материала и имеет закругленные углы. Для фиксации плоских гелей (кассет) не требуется ни зажимов, ни винтов. На дне камеры для верхнего буфера имеется два продольных отверстия, окаймленные плотными резиновыми прокладками. В эти прорезы и вставляются гелевые кассеты, а с помощью специальных пазов на внутренних стойках они удерживаются в строго вертикальном положении. На фронтальной части камеры есть отметки для уровня заливки буфера в нижнюю и верхнюю камеры. Система (модуль) является полностью герметичной, не склонной к протеканию. Фронтальная поверхность прибора абсолютно прозрачна, и это создает определенное удобство для экспериментатора при нанесении образцов на гель и при отслеживании движения фронта.

С помощью камеры для верхнего буфера можно проводить разделение белков в гелях как во втором направлении для 2D-электрофореза, так и при одномерном электрофорезе по Ляммли (Laemmly, 1970).

Описание сконструированной верхней камеры для изоэлектрофокусирования. Процедура изоэлектрофокусирования белков по методу Фаррелла предполагает использование для первого направления стеклянных трубочек. О них речь пойдет ниже. А сейчас мы кратко остановимся на описании предлагаемой нами верхней камеры для первого направления. Это устройство было сконструировано в мастерских нашего института. Камера для изоэлектрофокусирования по аналогии с коммерческой верхней камерой представляет собой небольшой резервуар для жидкости, имеющий прямоугольную форму (рис. 2). Прибор выполнен из плексигласа, а его габариты и форма повторяют коммерческий аналог. По дну камеры просверлены круглые отверстия, диаметр которых соответствует внешнему диаметру используемых трубочек.

Сконструированная камера для первого направления по аналогии с фирменной выполняет двойную функцию: является одновременно резервуаром для буфера и держателем для стеклянных трубочек. Круглые отверстия на дне камеры окаймлены уплотнительными резиновыми прокладками, так называемыми шайбами. Чтобы избежать их смещения и нежелательного протекания жидкости, изготовлена дополнительная пластина из плексигласа с отверстиями, которая покрывает дно и фиксирует всю конструкцию с помощью двух пластмассовых винтов. Вся конструкция изготовлена из материалов, устойчивых к используемым в работе растворам.

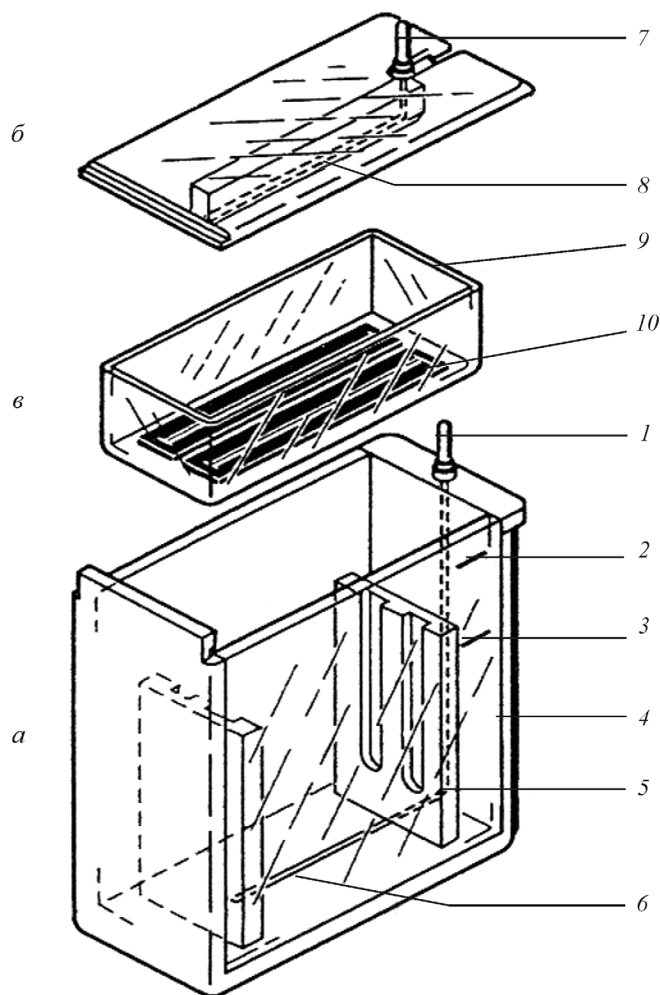


Рис. 1. Схематическое изображение устройства для электрофореза Dual Gel Module.

а — основная камера; *б* — крышка; *в* — камера для верхнего буфера. 1 — вилок для нижнего электрода, 2, 3 — уровни для заливки буфера в верхней и нижней камерах соответственно, 4 — фронтальная стенка нижней камеры, 5 — внутренние стойки с пазами, 6 — нижний электрод, 7 — вилок для верхнего электрода, 8 — верхний электрод, 9 — камера для верхнего буфера, 10 — резиновые прокладки на дне верхней камеры.

Как показал наш опыт, система оказалась весьма надежной и удобной в эксплуатации.

Изготовление стеклянных трубочек для изоэлектрофокусирования. Трубки для первого направления были изготовлены из обычных стеклянных лабораторных пипеток с внутренним диаметром 1.5—2.0 и внешним 4—5 мм. Торцы трубочек оплавливали, чтобы притупить острые края и свести к минимуму повреждение резиновых прокладок. Длина трубочек составляла 13 см. Это позволяло заполнить трубки раствором для полимеризации до отметки 10 см и нанести на поверхность геля исследуемую пробу. Мы не будем подробно останавливаться на технических деталях заливки геля и способах извлечения гелевых столбиков по окончании изофокусирования. Эти процедуры уже подробно описаны (O'Farrell, 1975; Малыгин, 1993), и каждый исследователь может выбрать для себя подходящий вариант.

Изготовление стекол для второго направления. Процедура разделения белков по молекулярной массе во втором направлении предусматривает

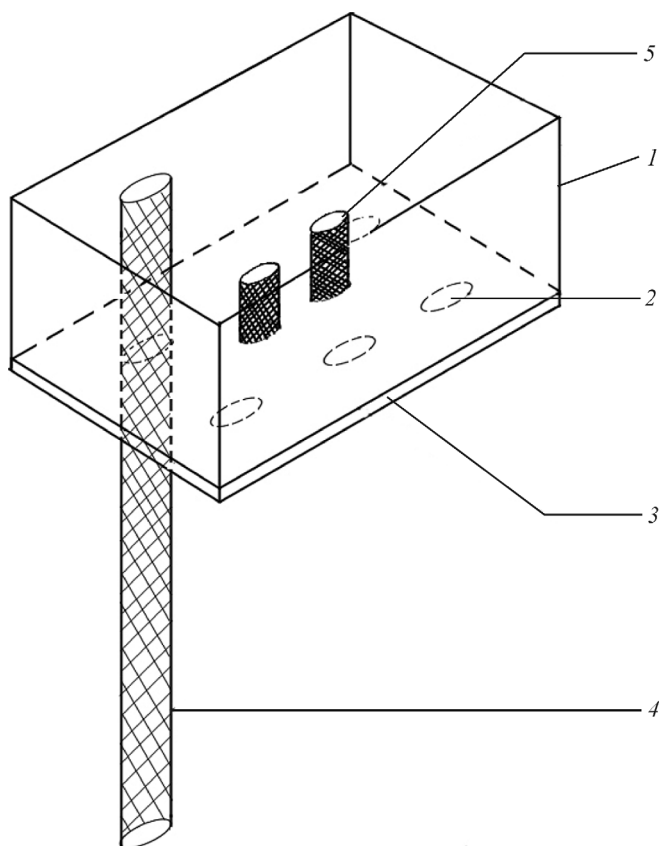


Рис. 2. Схематическое изображение сконструированной верхней камеры для изофокусирования.

1 — верхняя камера, 2 — отверстия, окаймленные резиновыми «шайбами», 3 — дополнительная пластина из плексигласа, 4 — схематическое изображение вставленной трубочки, 5 — пластмассовый винт.

использование плоских гелей. Чтобы проводить разделение белков одновременно на двух гелях, надо иметь в своем распоряжении как минимум две пары стекол. Для иммобилизации столбика геля, извлеченного из трубки, с полиакриламидным плоским гелем необходимо собрать конструкцию из стекол разной толщины. Толщина первого стекла составляет 1.0—1.5, толщина второго — 3—4 мм. Так как для заливки геля используют спейсеры толщиной 1 мм, суммарная толщина гелевой кассеты бу-

дет составлять 6—7 мм. Это та оптимальная величина, которая позволила нам многократно использовать верхнюю камеру без повреждения и износа окаймляющей резиновой прокладки. При этом острые края вырезанных стекол должны быть, естественно, затуплены.

Рис. 3 отражает размеры и показывает особенности обоих стекол для второго направления. Первое (с толщиной боковой стенки 1 мм) представляет собой квадрат размером 10×10 см (стекло I). Другое стекло (толщиной 3—4 мм) — прямоугольник размером 10.0—9.5 см (стекло II). В верхней части стекла II в области, обозначенной звездочками (на рис. 3 она заштрихована), сделан спил стекла под углом на глубину 0.5 см. Боковое сечение такого стекла в области спила будет иметь вид, изображенный на рис. 3 (II, бс). При этом угол 1 будет острым, а угол 2 — тупым. Заметим, что спил занимает область только в середине стекла, а боковые края, ширина которых составляет 1 см с обеих сторон, остаются в первоначальном виде.

Перед заливкой геля стекло II накладывают на тонкое стекло I сверху, спилом вовнутрь. После застывания геля между стеклами образуется некоторое углубление (рис. 3, гк). В эту нишу и помещается гелевый столбик. В этом положении два геля — трубчатый и плоский — теперь легко можно скрепить расплавленным раствором агарозы и проводить последующее разделение белков во втором направлении.

В работе использовали следующие реактивы: мочевины, акриламид, бисакриламид, Тритон X-100, амфолины с диапазоном pH 3.5—10, персульфат аммония, ТЕ-МЕД, Трис, глицин, DSNa, β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий, NaOH, уксусная кислота, агароза, глицерин и ДТТ. В работе использовали реактивы отечественного производства квалификации хч или закупленные в фирме ICN.

Материалом для исследования служили высокоочищенные (коммерческие) белки фирмы Sigma: БСА (5-я фракция, мол. масса 66.2 кДа), овальбумин (мол. масса 45.0 кДа) и карбоангидраза (мол. масса 29.0 кДа). Белки растворяли в свежей деионизированной воде до концентрации 1 мкг/мкл и наносили на один гель в количестве 1—2 мкг каждого белка.

Двухмерный электрофорез с использованием прибора Dual Gel Module (США) по методу О'Фаррелла (O'Farrell, 1975). Для первого направления использовали стеклянные трубочки, для второго —

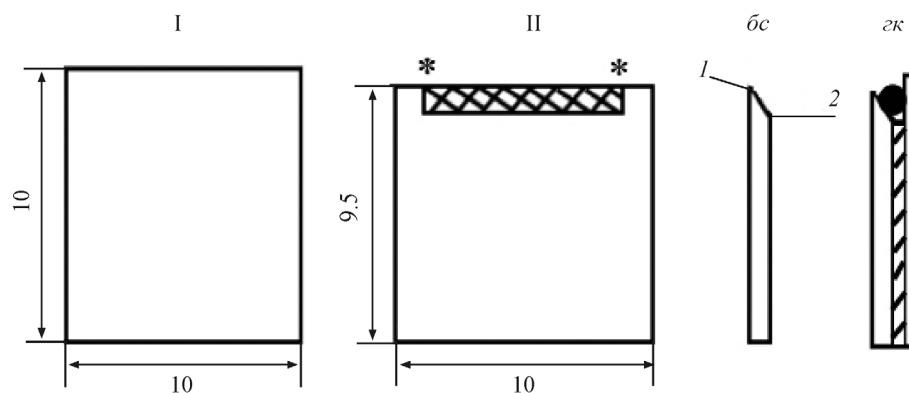


Рис. 3. Схематическое изображение стекол, используемых во втором направлении для 2D-электрофореза.

I — тонкое стекло; II — стекло толщиной 3—4 мм со спилом в заштрихованной области. бс — боковые сечения стекла II, гк — гелевая кассета, образованная обоими стеклами и двумя гелями, черный кружок — трубчатый гель, косая штриховка — плоский гель.

специальным образом подготовленные стекла. Пробы и гели для первого направления готовили следующим образом. Пробу белка (3—6 мкг) растворяли в 50 мкл лизирующего буфера (9 М мочевины, 2 % Тритона X-100, 2 % амфолинов, pH 3.5—10, 0.05 М ДТГ и 0.25 % бромфенолового синего) и наносили на гель. Раствор для полимеризации геля первого направления содержал 8 М мочевины, 3.75 % акриламида, 0.2 % бисакриламида, 2 % Тритона X-100, 2 % амфолинов, 0.013 % персульфата аммония и 0.001 % TEMED. На пробу, нанесенную на гель, наслаивали кэп-раствор для предотвращения контакта пробы с электродным буфером. Кэп-раствор содержал 3 М мочевины и 2 % амфолинов. В качестве электродных буферов использовали 0.02 М раствор NaOH (катодный буфер) и раствор 0.1 М уксусной кислоты (анодный буфер).

Процедуру по нанесению проб и изоэлектрофокусирование вели при 4 °С, напряжении 300 В и силе тока 0.5—1 мА на трубочку в течение 16 ч. После изоэлектрофокусирования гелевые столбики осторожно извлекали из трубок и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере следующего состава: 10 % глицерина, 2 % D₂SNa, 5 % (по объему) β-меркаптоэтанола, 0.06 М Трис-HCl, pH 6.8. По окончании процедуры гели замораживали и хранили при -70 °С. Гель-электрофорез во втором направлении проводили в 5%-ном (концентрирующем) и 12%-ном (разделяющем) ПААГ в стандартной системе Ляммли (Laemmly, 1970). Разделение проводили при постоянном токе при 50—70 мА.

После окончания электрофореза в ПААГ гели фиксировали в растворе 40%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты в течение ночи. Далее окрашивали раствором кумасси G-250 в течение 40—50 мин и отмывали в растворе 7%-ной уксусной кислоты.

Двухмерный электрофорез с использованием коммерческих стрипов и оборудования GE Healthcare (США) проводили согласно инструкции фирмы-изготовителя (GE Healthcare, США) с использованием стрипов с диапазоном pH 3—10. Двухмерный электрофорез во втором направлении и проводили в 12%-ном ПААГ по стандартному протоколу Ляммли (Laemmly, 1970). Белки визуализировали при помощи окрашивания раствором Кумасси G-250.

Результаты

Методическая часть нашей работы заключалась в том, чтобы разделить высокоочищенные (коммерческие) белки двухмерным электрофорезом двумя способами и сравнить полученные результаты. В первом случае проводили разделение белков на приборе Dual Gel Module (США), во втором — с помощью коммерческих стрипов и оборудования GE Healthcare (США). Для анализа использовали образцы высокоочищенных белков бычьего сывороточного альбумина (БСА), овальбумина и карбоангидразы. Эти белки имеют разные изоэлектрические точки и разные молекулярные массы, и мы предполагали наглядно проследить за их распределением на геле.

На рис. 4, а представлена электрофореграмма трех белков, проанализированных с помощью прибора Dual Gel Module. Как видно на рисунке, каждый из трех белков

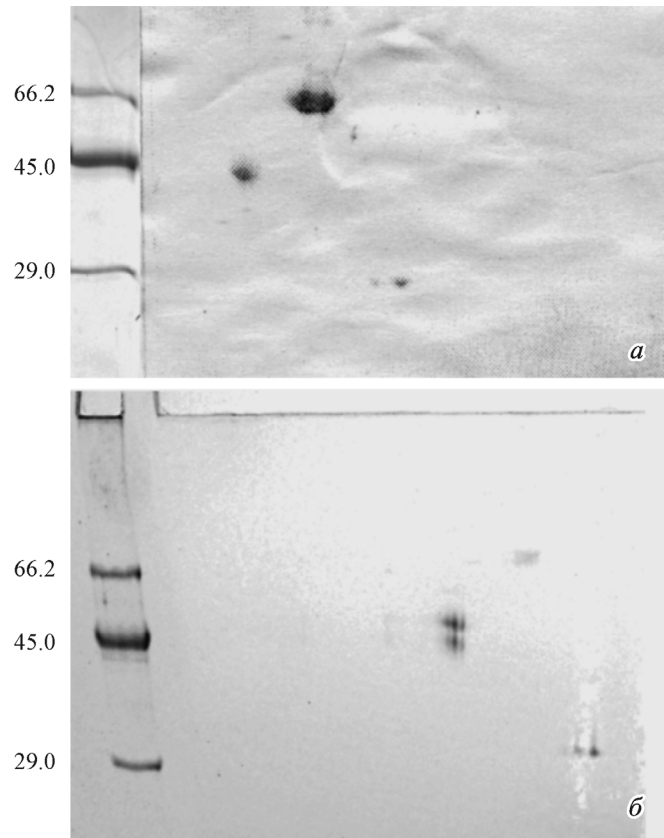


Рис. 4. 2D-электрофореграммы трех белков, выполненные с помощью прибора Dual Gel Module (США; а) и оборудования GE Healthcare (США; б).

Числа по вертикали — молекулярные массы белков. Нанесено по 1—2 мг каждого белка: БСА (66.2 кДа), овальбумина (45.0 кДа) и карбоангидразы (29.0 кДа).

занимает свое определенное положение, сигналы полипептидных пятен четкие, а фон слабый. Экспериментальная картина, полученная в наших условиях на этом приборе по двум белкам (овальбумину и карбоангидразе), в точности соответствует картине, представленной в каталоге Proteomics and Protein Expression фирмы Sigma (2004).

Результат разделения этих же белков двухмерным электрофорезом на коммерческих стрипах с использованием оборудования GE Healthcare (США) представлен на рис. 4, б. Как видно на электрофореграмме, расположение белков аналогично расположению на предыдущей электрофореграмме (рис. 4, а). Небольшая разница заключается в интенсивности пятна, соответствующего БСА, и в наличии двойного бэнда в случае овальбумина (рис. 4, б). Мы объясняем эту разницу незначительным протеолизом данных белков, так как эксперименты были выполнены с одними и теми же препаратами, но в разное время. На наш взгляд, этот момент не является столь принципиальным, а разрешение метода позволяет четко визуализировать каждый из белков.

Полученные результаты могут свидетельствовать о пригодности системы Dual Gel Module для разделения белков и о возможности проведения экспериментов с более сложными биологическими образцами.

Обсуждение

Протеомика как новое научное направление, появившееся в последнее время, занимается изучением качественного и количественного состава белков, синтезируемых клеткой. Сравнение протеомов различных клеток в норме и патологии, установление взаимосвязи между структурой белка и его функцией, изучение протеома отдельных клеточных структур — вот некоторые из вопросов, которыми и занимается протеомика. Несмотря на очевидный прогресс, достигнутый в развитии альтернативных методов разделения белков (например, многомерная хроматография в комбинации с тандемной масс-спектрометрией), 2D-электрофорез до сих пор остается наиболее мощным аналитическим методом исследования экспрессии белков (Dunn, Corbett, 1996; Fedorova et al., 2011; Moiseeva et al., 2011).

Разделение белковых молекул методом 2D-электрофореза проводится по двум параметрам: электрическому заряду молекул, определяемому по изоэлектрической точке (направление I), и по молекулярной массе (направление II). Развитие современных технологий позволило использовать для разделения белков в I направлении гелевые полоски с иммобилизованными на них амфолинами. Эти готовые гели (стрипы) очень удобны для анализа, но довольно дорогостоящи, как и оборудование для проведения изоэлектрофокусирования.

Мы предложили использовать для разделения белков методом 2D-электрофореза сравнительно недорогой коммерческий прибор Dual Gel Module с набором дополнительных конструкций в виде верхней камеры и системы трубочек для первого направления, а также системы специальных стекол для второго направления. Как показал наш опыт, при достаточной степени очистки анализируемых белков система дает хорошее разрешение и воспроизводимые результаты (Евтеева и др., 2013; Миттенберг и др., 2014). Предложенный нами подход для выполнения работ с помощью 2D-электрофореза является гораздо менее затратным. Система проста, надежна, удобна в эксплуатации и, на наш взгляд, целесообразна в проведении поисковых работ по разделению белковых смесей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда для развития института (проект 14-50-00068).

Список литературы

- Говорун В. М., Арчаков А. И. 2002. Протеомные технологии в современной биомедицинской науке. Биохимия. 67 (10) : 1341—1359.
- Евтеева И. Н., Старкова Т. Ю., Артемов А. В., Зайкова Ю. Я., Барлев Н. А. 2013. Сравнительный анализ очистки и концентрирования 26S протеасом из печени крыс. Цитология. 55 (12) : 893—900. (Evteeva I. N., Starkova T. Yu., Artemov A. V., Zaikova Yu. Ya., Barlev N. A. 2013. Comparative analysis of methods for purification and concentration of 26S proteasomes isolated from rat liver. Tsitologiya. 55 (12) : 893—900.)
- Малыгин А. Г. 1993. Метод двумерного электрофореза белков в полиакриламидном геле: состояние, перспективы и технология. Успехи биол. химии. 33 : 173—213.
- Миттенберг А. Г., Моисеева Т. Н., Кузык В. О., Подольская Е. П., Евтеева И. Н., Барлев Н. А. 2014. Масс-спектрометрический анализ субъединиц протеасом, обладающих эндорибонуклеазной активностью. Цитология. 56 (4) : 300—315. (Mittenberg A. G., Moiseeva T. N., Kuzyk V. O., Podolskaya E. P., Evteeva I. N., Barlev N. A. 2014. Mass-spectrometric analysis of proteasomal subunits processing endoribonuclease activity. Tsitologiya. 56 (4) : 300—315.)
- Dunn M. J., Corbett J. M. 1996. 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Methods Enzymol. 271 : 177—203.
- Electrophoresis, ICN, 2001—2002. Catalogue (www.icnbiomed.com).
- Fedorova O. A., Moiseeva T. N., Nikiforov A. A., Tsimo-kha A. S., Livinskaya V. A., Hodson M., Bottrill A., Evteeva I. N., Ermolaeva J. B., Kuznezova I. M., Turoverov K. K., Eperon I., Barlev N. A. 2011. Proteomic analysis of the 20S proteasome (PSMA3)-interacting proteins reveals a functional link between the proteasome and mRNA metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 416 (3—4) : 258—265.
- Laemmly U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Moiseeva T. N., Bottrill A., Melino G., Barlev N. A. 2013. DNA damage-induced ubiquitylation of proteasome controls its proteolytic activity. Oncotarget. 4 : 1338—1348.
- O'Farrell P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007—4021.
- O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell. 12 : 1133—1142.
- Proteomics and Protein Expression, Sigma, 2004. Catalogue (sigma-aldrich.com).
- Rabilloud T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. Electrophoresis. 17 : 813—829.

Поступила 24 VIII 2015

THE USE OF THE COMMERCIAL APPARATUS DUAL GEL MODULE
FOR THE TWO-DIMENSIONAL POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

I. N. Evteeva,¹ T. Yu. Starkova, A. V. Artemov, N. A. Barlev²

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064; e-mail: ¹ evtin@mail.cytspb.rssi.ru, ² nick.a.barlev@gmail.com

Two-dimensional gel electrophoresis, continues to be one of the fundamental methods to study the biological protein diversity. This method described by O'Farrell in 1975 includes two following steps: isoelectric focusing in the first dimension and polyacrylamide gel electrophoretic fractionation of proteins according to their molecular weight in the second dimension. In this manuscript we described several technical parameters of the commercial apparatus Dual Gel Module for the gel electrophoresis by means of which it is possible to accomplish the electrophoretic protein fractionation in both dimensions. The distribution of the highly purified commercial proteins used as molecular standards in the detection system of the apparatus Dual Gel Module was identical to the commercial strips of the device GE Healthcare, USA.

Key words: two-dimensional gel electrophoresis, isoelectric focusing, strips, commercial modul, ampholines.