

В.О. Шляховенко
О.А. Самойленко

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

ФОТОПОЛІМЕРИЗАЦІЯ АКРИЛАМІДУ ДЛЯ АНАЛІТИЧНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Ключові слова:

біомаркери, електрофорез,
фотополімеризація, ЕДТА,
рибофлавін, розділення білків.

Мета: створити малотоксичну каталітичну систему для фотополімеризації поліакриламідних гелів. Вивчити придатність запропонованої системи для електрофоретичного розділення білків крові. **Об'єкт і методи:** у дослідженні використовували зразки периферичної крові донорів. Виготовлення поліакриламідних гелів проводили шляхом фотополімеризації водних розчинів акриламід/*N,N'*-метиленбісакриламід і освітлення штучним денним світлом (у діапазоні довжин хвиль $\lambda = 400\text{--}700$ нм) з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти (каталізатор) та рибофлавіну (фотоініціатор). **Результати:** створено нову каталітичну систему для фотополімеризації поліакриламідних гелів. Показано придатність запропонованого методу для електрофоретичного розділення білків крові. **Висновки:** використання запропонованого методу є особливо доцільним під час вивчення молекулярної гетерогенності ферментів, що може дати додаткові дані про перебіг та прогноз онкологічних захворювань.

Гель-електрофорез широко використовується для розділення суміші наночастинок та біомолекул (ДНК, РНК, білки, полісахариди і т.ін.) [1–5]. Електрофоретичні системи у поліакриламідних гелях (ПААГ) широко використовуються для фракціонування білків з різних типів клітин (наприклад тканини пухлин та біологічних рідин) [6]. Застосування цих систем дозволило ізолювати та дослідити десятки тисяч білкових молекул і створило потенціал для розробки надійних біомаркерів багатьох захворювань, у тому числі онкологічних [7, 8]. Для кращої кількісної оцінки та фракціонування білків у денатуруючих умовах потужні детергенти, такі як додецилсульфат натрію (ДДС) або саркозил використовують у поєднанні з електрофорезом у ПААГ [2, 3]. Ефективність розділення білкових сумішей значно підвищується у разі застосування градієнтного гелю зі зростаючою концентрацією ПААГ. Для виявлення білків в електрофореграмах застосовують барвники, специфічні до білкових молекул, наприклад, амідочорний [9], кумасі яскраво блакитний [10], кристал віолет [11] та ін. Метод електрофорезу в ПААГ дозволяє виявляти ферментативну активність багатьох білків, що є важливим підходом до вивчення молекулярної гетерогенності і генетичного різноманіття ферментів.

ПААГ готуються шляхом кополімеризації між акриламідом (АМ) та *N,N'*-метиленбісакриламідом (Біс). Співполімеризація каталізується *N,N,N',N'*-тетраметил-етилендіаміном (ТЕМЕД) та персульфатом амонію (ПСА) [12]. Радикали персульфату перетворюють мономер АМ на вільні радикали, які реагують з неактивованими мономерами.

Фотополімеризація широко використовується для приготування гідрогелів та везикул, зокрема у медичній галузі [13]. Процес фотополімеризації АМ та Біс за допомогою рибофлавіну (РФ) вперше було описано в 1964 р. [14]. На жаль, гель з невеликими порами для зони розділення в умовах високої концентрації АМ (12–20% і більше) не може бути отримано у разі використання відомого методу фотополімеризації, і тому такі гелі готують шляхом хімічної полімеризації за допомогою системи ТЕМЕД/ПСА [14]. Для підвищення ефективності розділення зон в умовах одно- та двовимірного електрофорезу гелі, отримані за допомогою системи РФ/сульфінат/йодоній, використовували замість стандартної системи ТЕМЕД/ПСА [15].

Однак наявні системи фотополімеризації АМ мають ряд недоліків, які роблять їх менш придатними для використання на практиці [16]. Зазвичай їх підготовка вимагає тривалого часу полімеризації (протягом 1 год або більше), потужного ультрафіолетового опромінення та використання нестабільних реагентів [1]. Більше того, такі гелі складні для приготування, кожен експеримент вимагає підготовки нових реагентів, і відтворюваність електрофоретичного аналізу може бути сумнівною. Наприклад, нестабільність каталітичних реагентів призводить до проблем з контролем полімеризації [17]. Неполімеризований мономер може реагувати з білками [18], що зумовлює появу некоректної картини в електрофореграмах [19]. Наявність ТЕМЕД здатна викликати підвищення рН [12] та впливати на ефективний заряд молекул білка [20]. Запропоновані системи фотополімеризації ПААГ на основі катіонного барвника метиленового синього потребують вико-

ристання тонких шарів полімеризованого розчину (1–2 мм) через недостатню прозорість метиленового синього [21]. Більше того, каталізатор ТЕМЕД та ініціатор ПСА є надзвичайно агресивними та токсичними реагентами і здатні впливати на перебіг ферментативної реакції при застосуванні методу ензимогам. Крім того, їх використання може спричинити подразнення шкіри, алергічні реакції, сильні опіки та пошкодження очей [22]. Тому каталізатор ТЕМЕД та ініціатор ПСА у багатьох випадках є небажаними або токсичними реагентами і для приготування ПААГ необхідний інший, «зелений» підхід [23].

У цьому дослідженні вперше перевірено новий метод фотополімеризації ПААГ, заснований на використанні каталізатора етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) та фотоініціатора РФ (АМ/Біс + ЕДТА/РФ). При опроміненні денним світлом реакція полімеризації реалізується без застосування ТЕМЕД та ПСА. Малотоксичні ЕДТА і РФ [24] входять до фармакопей більшості країн світу. ЕДТА широко використовують для лікування пацієнтів з отруєннями важкими металами, надмірним відкладенням кальцію в органах, розладами осифікації скелету при гіперкальцифікації, склеродермією, дерматоміозитом та іншими станами [25]. РФ також використовують при захворюваннях очей, печінки, променевої хвороби, дефіциті вітамінів тощо; він потрібен організму для клітинного дихання [26]. Структура РФ складається з ізоалоксазинового кільця та бічного ланцюга рибіту. Опромінення РФ ультрафіолетом або видимим світлом може призвести до утворення кількох активних форм кисню, відповідальних за механізм зшивання гелю. Нещодавно було повідомлено про приготування подвійно зшитих альгінатних гідрогелів за допомогою РФ як фотоініціатора [27]. При цьому важливо, що фотополімеризація відбувалася за наявності йонів кальцію [28].

Про використання реагентів ЕДТА і РФ для отримання ПААГ (АМ/Біс + ЕДТА/РФ гель) раніше не повідомлялося. Для одержання роздільних гелів ми запропонували каталітичну систему на основі РФ-ЕДТА. Така методика дозволяє своєчасно (за 10–15 хв) виготовити роздільні гелі з різною концентрацією АМ (12–20% і вища). Методика підходить для одержання роздільного гелю для виділення та аналізу складних білкових сумішей, ферментів та інших органічних речовин і має низку переваг перед відомою технікою застосування каталізатора. Наведено приклади виготовлення гелів та застосування ПААГ-тестів для аналізу білків крові донорів.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Хімічні речовини та матеріали. У процедурах синтезу використано реагенти АМ, Біс, ЕДТА, гліцин, РФ, Трис, ДДС, Coomassie Brilliant Blue R-250, PMSF, оцтову кислоту ($\geq 99\%$), етанол ($\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, США). Деіонізовану воду (18,2 М Ω)

отримували за допомогою системи Ultrapure water від Millipore (Мілфорд, МА). У наших експериментах досліджували білки крові донорів.

2. Експериментальна частина. Процедура синтезу високозшитої гелевої матриці включала розчинення АМ та Біс у буферному розчині гелю, додавання ЕДТА та РФ з наступним опроміненням суміші видимим світлом. У цій суміші ЕДТА слугувала каталізатором, а РФ — фотоініціатором фотополімеризації молекул АМ і Біс. У нашій процедурі гелевий буферний розчин готували за 22 °С шляхом розчинення Трис (0,46 М) у воді (50 мл), додавання ЕДТА ($2,69 \cdot 10^{-3}$ М), за допомогою НСІ доводили рН до 8,9. Потім до гелевого буферного розчину додавали АМ до концентрації $C_{\text{АМ}} = 20\%$, після його розчинення додавали Біс ($C_{\text{Біс}} = 1,2\%$), після чого додавали РФ ($C_{\text{РФ}} = 0,005\%$) за тьмяного освітлення. Кінцевий об'єм розчину гелю становив 5 мл. Суміш поміщали в електрофоретичну камеру між двома скляними пластинами і освітлювали світлодіодним випромінювачем видимого світла (LED) ($\lambda = 400\text{--}700$ нм) Philips E27 (потужність 11 Вт, еквівалентна потужність 95 Вт, світловий потік 1100 Лм). Відстань між джерелом світла та електрофоретичною камерою становила 10 см. Під час фотополімеризації цієї суміші протягом 10–20 хв утворювалися високозшиті блоки АМ/Біс, і гель залишався повністю прозорим. У загальному випадку необхідний час фотополімеризації залежить від товщини гелевих блоків, h та концентрації компонентів. Аналогічні процедури можна використовувати для приготування гелів з $h = 0,1\text{--}40,0$ мм, $C_{\text{АМ}} = 15\text{--}40\%$ і $C_{\text{Біс}} = 0,12\text{--}2,00\%$.

Електрофоретичні експерименти проводили з використанням вертикальної електрофоретичної буферної системи ДДС-ПААГ з розміщенням гелю між двома скляними пластинами (45×75 мм, з товщиною спейсерів 1 мм і гребінцем з 8 зубцями). Отримані зразки крові донорів для завантаження на гель розчиняли в 0,4 М Трис-НСІ (рН 6,8) буфері, що містив гліцерин (5,0%), ДДС (0,1%) і бромфеноловий синій (0,001%). Застосування системи ДДС-ПААГ дозволяє розділяти різні білки винятково на основі відмінностей у їх молекулярній масі [29, 30]. Використовувався електродний буфер (водна суміш гліцину) (1,4%), Трис (0,46 М) і ДДС (0,1%).

Прикладена напруга становила 100 В. Типовий час розділення — приблизно 1,5 год. Гель фіксували за допомогою водного фіксувального розчину (40% — етанол, 10% — оцтова кислота) протягом 16 год. Для візуалізації білків, розділених за допомогою ДДС-ПААГ, застосовували забарвлювання гелів протягом 60 хв у розчині 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 [10]. Гель знебарвлювали у фіксувальному розчині протягом 90 хв.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Білки крові відіграють важливу роль у метаболізмі, і зміни в їх електрофоретичних спектрах можуть відображати особливості перебігу захворювання.

Проведено перевірку ефективності запропонованої системи електрофорезу в ДДС-ПААГ із застосуванням фотополімеризованих блоків гелю АМ/Біс + ЕДТА/РФ для електрофоретичного розділення білків крові донорів.

На рисунку представлено отримані результати електрофоретичної міграції білків крові донорів.

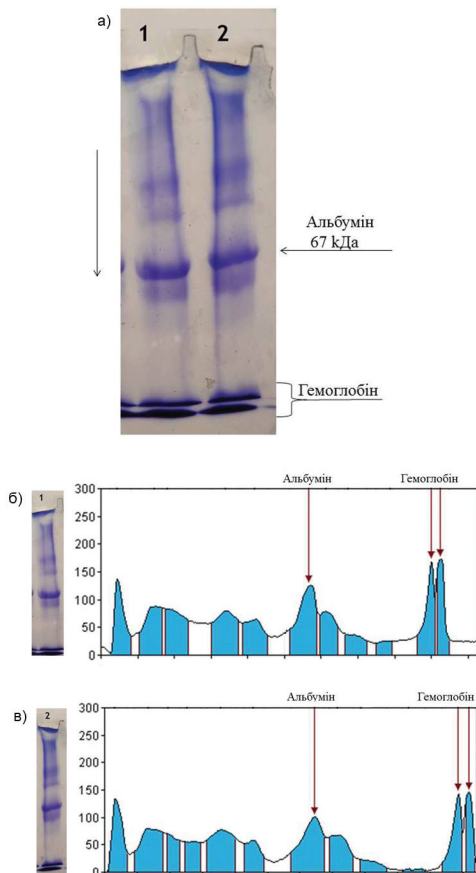


Рисунок. Електрофорез лізату крові двох донорів у 20% ПААГ, виготовленому методом фотополімеризації із застосуванням каталітичної системи на основі ЕДТА і РФ: *a* — електрофореграма білків периферичної крові донорів (стрілка показує напрямок електрофоретичної міграції — від катоду до аноду); *б* та *в* — денситометричний аналіз електрофореграми

Отримані картини були подібними до електрофореграм, представлених іншими авторами із застосуванням гелю ДДС-ПААГ, забарвленого кумасі [31]. Використання запропонованого методу є особливо доцільним під час вивчення молекулярної гетерогенності ферментів, що може дати додаткові дані про перебіг та прогноз онкологічних захворювань. Можна припустити, що в цілому положення ідентифікованих піків електрофоретичної міграції білків певною мірою залежить від умов освітлення, концентрації реагентів, зокрема C_{AM} і C_{Bis} , і пористості гелів. Для з'ясування цих питань у майбутньому потрібні подальші дослідження.

Метод приготування зшитих гелів АМ/Біс + ЕДТА/РФ може бути корисним для медичної діагностики, виробництва градієнтних гідрогелів, систем цілеспрямованої доставки ліків, бар'єрних мате-

ріалів і малотоксичних гелів із застосуванням у парфумерній та харчовій промисловості [32, 33]. Однак у таких мікропористих системах ДДС-ПААГ можуть виникнути деякі обмеження у застосуванні техніки електроблотингу, що особливо важливо для гідрофобних білків [34, 35]. Тому необхідні подальші дослідження з метою отримання остаточних доказів ефективності запропонованої системи полімеризації ПААГ у різних біомедичних застосуваннях.

ВИСНОВКИ

1. Продемонстровано можливість приготування гелю ДДС-ПААГ без використання ТЕМЕД та ПСА із застосуванням методу фотополімеризації АМ шляхом використання каталізатора ЕДТА та фотоініціатора РФ.

2. Описано каталітичну систему, засновану на використанні малотоксичних речовин, її легко і швидко виготовляти, методику можна застосовувати як у кислому, так і в лужному середовищі, вона є дешевшою у порівнянні із системою хімічної полімеризації.

3. Запропонована техніка дозволяє створювати градієнтні гелеві системи, час утворення гелю можна точно контролювати умовами освітлення.

4. Система полімеризації ДДС-ПААГ продемонструвала високу ефективність для електрофоретичного розділення білків крові.

Роботу виконано за підтримки відомчої тематики «Дослідити особливості дисфункціонального стану жирової тканини, які формують метастатичний потенціал та визначають перебіг пухлинного процесу», № 0120U105603.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Magdeldin S. Gel electrophoresis: Principles and basics. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. doi:10.5772/2205
- Kurien BT, Scofield RH. Electrophoretic Separation of Proteins. New York: Springer, 2019. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4939-8793-1>.
- Westermeyer R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. Freiburg, Germany: John Wiley & Sons, 2016. 406p.
- Lledias F, Hernández F, Rivas V, *et al.* A rapid and reliable method for total protein extraction from succulent plants for proteomic analysis. *Protein J* 2017; 36 (4): 308–321. 10.1007/s10930-017-9739-5.
- Iwashita K, Inoue N, Handa A, *et al.* Thermal aggregation of hen egg white proteins in the presence of salts. *Protein J* 2015; 34 (3): 212–219. doi.org/10.1007/s10930-015-9612-3
- Sharma N, Sharma R, Rajput YS, *et al.* Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. *Int Dairy J* 2020; 104920. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104920
- Corbo C, Cevenini A, Salvatore F. Biomarker discovery by proteomics-based approaches for early detection and personalized medicine in colorectal cancer. *Proteomics — Clin Appl* 2017; 11 (5-6): 1600072. doi:10.1002/prca.201600072
- Sobsey CA, Ibrahim S, Richard VR, *et al.* Targeted and untargeted proteomics approaches in biomarker development. *Proteomics* 2020; 20 (9): 1900029. doi:10.1002/pmic.201900029

9. Kapitany RA, Zebrowski EJ. A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1973; **56** (2): 361–369. doi.org/10.1016/0003-2697(73)90202-9
10. Brunelle JL, Green R. Coomassie blue staining. In: *Methods in enzymology*. Elsevier, 2014: 161–167. doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00013-6
11. Krause RGE, Goldring JPD. Crystal violet stains proteins in SDS-PAGE gels and zymograms. *Anal Biochem* 2019; **566**: 107–115. doi:10.1016/j.ab.2018.11.015
12. Sennakesavan G, Mostakhdemin M, Dkhar LK, *et al.* Acrylic acid/acrylamide based hydrogels and its properties — A review. *Polym Degrad Stab* 2020; **180**: 109308. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109308
13. Righetti PG, Sebastiano R, Citterio A. Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis. *Proteomics* 2013; **13** (2): 325–340. doi:10.1002/pmic.201200378
14. Davis BJ. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964; **121** (2): 404–427.
15. Rabilloud T, Vincon M, Garin J. Micropreparative one- and two-dimensional electrophoresis: Improvement with new photopolymerization systems. *Electrophoresis* 1995; **16** (1): 1414–1422. doi:10.1002/elps.11501601234
16. Sheth S, Jain E, Karadaghy A, *et al.* UV dose governs UV-polymerized polyacrylamide hydrogel modulus. *Int J Polym Sci* 2017; **2017**: ID 5147482. doi:10.1155/2017/5147482
17. Mane S, Ponrathnam S, Chavan N. Effect of chemical cross-linking on properties of polymer microbeads: A review. *Can Chem Trans* 2015; **3** (4): 473–485. doi:10.13179/canchemtrans.2015.03.04.0245
18. Zarei M, Zarei M, Ghasemabadi M. Nanoparticle improved separations: From capillary to slab gel electrophoresis. *TrAC Trends Anal Chem* 2017; **86**: 56–74. doi:10.1016/j.trac.2016.11.004
19. Green MR, Sambrook J. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc* 2020; **2020** (12): 525–532. doi:10.1101/pdb.prot100412
20. Allison JH, Agrawal HC, Moore BW. Effect of N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine on the migration of proteins in SDS polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1974; **58** (2): 592–601. doi.org/10.1016/0003-2697(74)90228-0
21. Lyubimova T, Caglio S, Gelfi C, *et al.* Photopolymerization of polyacrylamide gels with methylene blue. *Electrophoresis* 1993; **14** (1): 40–50. doi:10.1002/elps.1150140108
22. Papavassiliou AG. Footprinting DNA-protein interactions in native polyacrylamide gels by chemical nucleolytic activity of 1, 10-phenanthroline-copper. *Methods Mol Biol* 2009; **543**: 163–99. doi: 10.1007/978-1-60327-015-1_13.
23. Carbonara K, Coorsen JR. A 'green' approach to fixing polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 2020; **605**: 113853. doi:10.1016/j.ab.2020.113853
24. Lanigan RS, Yamarik TA. Final report on the safety assessment of EDTA, calcium disodium EDTA, diammonium EDTA, dipotassium EDTA, disodium EDTA, TEA-EDTA, tetrasodium EDTA, tripotassium EDTA, trisodium EDTA, HEDTA, and trisodium HEDTA. *Int J Toxicol* 2002; **21**: 95–142. doi: 10.1080/10915810290096522
25. Ferrero ME. Rationale for the successful management of EDTA chelation therapy in human burden by toxic metals. *Biomed Res Int* 2016; **2016**: ID 8274504. doi:10.1155/2016/8274504
26. Suwannasom N, Kao I, Pruḡḡ A, *et al.* Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *Int J Mol Sci* 2020; **21** (3): 950. doi:10.3390/ijms21030950
27. Kim E, Kim MH, Song JH, *et al.* Dual crosslinked alginate hydrogels by riboflavin as photoinitiator. *Int J Biol Macromol* 2020; **154**: 989–98. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.134
28. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S, *et al.* Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J Org Chem* 2014; **10**: 1999–2012. doi:10.3762/bjoc.10.208
29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–685. doi:10.1038/227680a0
30. Aoki T. A comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. *Membranes (Basel)* 2017; **7** (4): 56. doi:10.3390/membranes7040056
31. Ryu KE, Rhim H, Park CW, *et al.* Plasma protein adsorption to anion substituted poly (vinyl alcohol) membranes. *Macromol Res* 2003; **11** (6): 451–457. doi.org/10.1007/BF03218975
32. Lavrentieva A. Gradient Hydrogels. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2021;178:227-251. doi: 10.1007/10_2020_155.
33. Majcher MJ, Hoare T. Applications of Hydrogels 14. In: Mazumder MAJ, Sheardown H, Al-Ahmed A, editors. *Functional biopolymers*. Springer Nature Switzerland, 2019: 453–90. doi:10.1007/978-3-319-95990-0_17
34. Vandekerckhove J, Bauw G, Van Den Bulcke M, *et al.* Laboratory Methodology in Biochemistry. In: Fini C, Floridi A, Finelli VN, Wittman-Liebold B, editors. *CRC Press*, 2019: 217–238. doi:10.1201/9781351073929
35. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006; **1** (1): 16–22. doi.org/10.1038/nprot.2006.4

ACRYLAMIDE PHOTOPOLYMERIZATION FOR ANALYTICAL ELECTROPHORESIS

V.O. Shlyakhovenko, O.A. Samoylenko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: To create a low-toxicity catalytic system for the photopolymerization of polyacrylamide gels. To study the suitability of the proposed system for electrophoretic separation of blood proteins. **Object and methods:** The samples of donors peripheral blood has been studied. Photopolymerization of acrylamide/N,N'-methylenebisacrylamide was assisted with combination of ethylenediaminetetraacetic acid disodium dihydrate catalyst, riboflavin photoinitiator, and artificial daylight (wavelength range of $\lambda=400-700$ nm). **Results:** a new catalytic system for photopolymerization of polyacrylamide gels was created. The suitability of the proposed method for electrophoretic separation of blood proteins is shown. **Conclusions:** the use of the proposed method can be particularly appropriate for the study of molecular heterogeneity of enzymes, which can provide additional data on the course and prognosis of cancer.

Key Words: biomarkers, electrophoresis, photopolymerization, EDTA, riboflavin, protein separation.

Адреса для листування:

Шляховенко В.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. П.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: doctorvlad38@gmail.com

Одержано: 13.10.2022