

ZAGADNIENIA DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH Z ENZYMOLOGII I CHEMII BIAŁEK DLA STUDENTÓW III ROKU BIOTECHNOLOGII MEDYCZNEJ I st.

Ćwiczenie 2. JEDNOKIERUNKOWA ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE)

Zagadnienia do ćwiczenia

- Poziomy organizacji łańcucha polipeptydowego w białkach (wiązania chemiczne stabilizujące struktury) – struktura I-, II-, III- i IV-rzędowa.
- Elektroforetyczne metody rozdziału białek (elektroforeza natywna, elektroforeza w warunkach denaturujących, ogniskowanie izoelektryczne, immunoelektroforeza, rodzaje podłoży, metody detekcji rozdzielonych białek)

Zasada metody

Elektroforeza jest metodą rozdziału w polu elektrycznym cząsteczek obdarzonych ładunkiem. Prędkość poruszania się w polu elektrycznym zależy od ładunku, masy i kształtu cząsteczki. Technika elektroforezy w obecności SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu) może być wykorzystana do określania mas cząsteczkowych białek. Ujemnie naładowane cząsteczki SDS wiążą się z białkiem w stałym stosunku wagowym i maskują ich ładunek. SDS powoduje rozfałdowanie łańcucha polipeptydowego, kompleksy SDS–białko posiadają zbliżony kształt. Ruchliwość kompleksów w żelu uzależniona jest tylko od masy cząsteczkowej. Stosując elektroforezę w obecności SDS, można wyznaczyć masę cząsteczkową nieznanego białka, porównując jego ruchliwość z szybkością migracji białek wzorcowych o znanych masach cząsteczkowych.

Jednym ze stosowanych podłoży, na których prowadzi się rozdział białek techniką elektroforezy są żele poliakrylamidowe. Żel poliakrylamidowy jest bezbarwny, pozbawiony ładunków i charakteryzuje się dużą wytrzymałością mechaniczną. Żel poliakrylamidowy to łańcuchy akrylamidu ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) połączone wiązaniami poprzecznymi za pomocą N,N'-metyleno-bis-akrylamidu ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). W ten sposób tworzy się sieć, przez którą poruszają się rozdzielane związki. Wielkość usieciowania żelu zależy od stężeń akrylamidu i bisakrylamidu. Polimeryzacja żelu odbywa się w obecności nadsiarczanu amonu (APS) oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED).

Odczynniki do przygotowania żelu poliakrylamidowego (PAA)

1. 30% roztwór akrylamidu + 0,8% roztwór bisakrylamidu
2. 5× stężony bufor TGS (Tris – Glicyna – SDS)
5. nadsiarczan amonu
6. TEMED

Uwaga! Pracę z akrylamidem wykonywać w rękawicach ochronnych. TEMED – inicjator polimeryzacji, dodawać jako ostatni składnik, bezpośrednio przed wylaniem mieszaniny między płytki !

Wykonanie

A. Przygotowanie 10% PAA

- Dwie umyte i odtłuszczone szklane płytki przedzielić przekładką, spiąć klamerkami i ustawić pionowo.
- 10% żel PAA przygotować w probówce o objętości 30 ml: odmierzyć 6,6 ml 30% PAA, 2 ml 5× stężonego buforu TGS, dodać 15 mg nadsiarczanu amonu, a następnie uzupełnić wodą destylowaną do objętości 20 ml;
- Przygotowanie korka stabilizującego żel: do probówki o objętości 2 ml odpipetować 1,5 ml sporządzonego roztworu 10% PAA oraz 20 µl odczynnika TEMED, uzyskany roztwór wylać pomiędzy przygotowane płytki i pozostawić do polimeryzacji;
- Do pozostałego roztworu PAA dodać 20 µl odczynnika TEMED, wymieszać i roztwór wlać między płytki na powstały korek. Aby utworzyć studzienki, pomiędzy płytki włożyć grzebień i pozostawić do polimeryzacji na około 30 minut;
- Płytki z żelem PAA umieścić w aparacie do elektroforezy i zalać 1× buforem TGS;

B. Przygotowanie prób

W probówce o objętości 1,5 ml mieszać 6 µl próby z 2 µl roztworu do nanoszenia białek, a następnie całość inkubować w temperaturze 90°C przez 5 minut.

C. Nakładanie prób na żel

Nałożyć przygotowane próby do poszczególnych studzienek. Do jednej ze studzienek nałożyć 5 µl wzorca (wzorzec masy molekularnej białek). Podłączyć aparat do zasilacza.

Uwaga! Kabel czerwony należy podłączyć do bieguna dodatniego (+), kabel czarny do bieguna ujemnego (-). Elektroforezę prowadzi przez 60 minut przy napięciu 140 V w temperaturze 4°C. Po zakończeniu elektroforezy żele wyjąć z aparatu i barwić solami srebra.

D. Barwienie żelu PAA srebrem

W metodzie barwienia solami srebra srebrowej większość białek ulega zabarwieniu na kolor czarny lub brązowy. Lipoproteiny wybarwiają się na niebiesko, a glikoproteiny na brązowo lub czerwono.

Odczynniki do barwienia żelu

1. Roztwór A (40 ml metanolu, 13,5 ml 37% formaldehydu, 46,5 ml H₂O)
2. Roztwór B - 0,02% Na₂S₂O₃ (0,02 g Na₂S₂O₃ w 100 ml H₂O)
3. Roztwór C - 0,1% AgNO₃ (100 mg AgNO₃ w 100 ml H₂O)
4. Roztwór D (98 ml 3% Na₂CO₃ + 50 ml 37% HCHO + 2 ml 0,02% Na₂S₂O₃)
5. Roztwór E - 20% kwas cytrynowy (10 g kw. cytrynowego w 50 ml H₂O)

Uwaga! Roztwory A, B, C, D przygotować bezpośrednio przed użyciem. Barwienie wykonywać w przeznaczony do tego celu waniec.

Barwienie żelu

1. Po elektroforezie żel poliakrylamidowy utrwalić przez 10 min. w roztworu A.
2. Płukać 2 x 5 min. w wodzie destylowanej.
3. Płukać żel w roztworze B przez 2 min.
4. Płukać żel 2 x 20 sek. w wodzie destylowanej.
5. Barwić żel w roztworze C przez 10 min.
6. Płukać 3 x 15 sek. w wodzie destylowanej.
7. Płukać żel 20 sek. w 10 ml roztworu D.
8. Płukać żel w 90 ml roztworu D (wywoływacza barwy) i mieszać do momentu pojawienia się wyraźnych prążków białkowych.
9. Płukać żel 3 x 20 sek. w wodzie destylowanej.
10. Płukać żel 10 min. w roztworze E (zatrzymanie barwienia).
11. Przepłukać żel wodą i zeskanować lub wysuszyć.

Opracowanie wyników

Narysować schemat żelu z wzorcem mas cząsteczkowych i próbkami badanymi. Białko badane i jego masę należy zidentyfikować na podstawie drogi rozdziału wzorca masy molekularnej białek.