

## **ĆWICZENIE III.**

### **ELEKTROFOREZA W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM**

#### **(ANG. POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS - PAGE)**

**ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM W WARUNKACH  
DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE) DETEKcja BIAŁEK W ŻELU  
POLIAKRYLAMIDOWYM**

#### **ELEKTROFOREZA POLIAKRYLAMIDOWA BIAŁEK W WARUNKACH NATYWNYCH (ELEKTROFOREZA NATYWNA)**

Elektroforeza pozwala na rozdzielanie białek ze względu na ich gęstość ładunku, w tym przypadku ruchliwość elektroforetyczna składników próbki zależy zarówno od ładunku molekuł, jak i ich masy. Bufory użyte podczas elektroforezy natywnej pozwalają na utrzymanie białek w stanie niedenaturowanym. Enzymy po elektroforezie zachowują swoją aktywność. Elektroforeza natywna jest używana głównie do określenia czystości białek – np. oznaczenia czystości preparatyki enzymów. W elektroforezie natywnej białek używa się nieciągnięgo systemu buforowego. Stosowane są dwa żele – zagęszczający o niższym stężeniu akrylamidów i niższym pH, oraz rozdzielający o mniejszych porach (wyższe stężenie akrylamidów) i wyższe pH. Rozwiązanie to, stosowane także w żelach denaturujących, umożliwia uzyskanie zagęszczenia preparatu na styku żeli i migracji białek w żelu rozdzielającym w postaci ostrych prążków.

#### **ELEKTROFOREZA POLIAKRYLAMIDOWA BIAŁEK W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE)**

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym jest użyteczną i powszechnie stosowaną metodą rozdzielania i charakterystyki białek. Jest to stosunkowo prosta i szybka technika. Na jednym żelu można przeprowadzić jednocześnie analizę wielu próbek, a rozdzielone białka można skutecznie wykrywać w żelu np. metodami barwienia, immunoprecypitacji czy autoradiografii. Można więc stosować tę technikę na przykład przy analizie białek we frakcjach zbieranych w trakcie rozdzielania na kolumnie chromatograficznej.

W SDS-PAGE stwarza się warunki, w których wszystkie składniki próbki mają ten sam ładunek; ich ruchliwość jest więc jedynie funkcją mas cząsteczkowych (SDS-PAGE). Użycie anionowego detergentu soli sodowej kwasu dodecylosiarkowego (SDS – ang. Sodium Dodecyl

Sulfate) pozwala na rozdzielanie elektroforetyczne białek zgodnie z ich masą cząsteczkową. Przed i w trakcie elektroforezy białka ulegają dysocjacji i denaturacji w obecności SDS, który łączy się z białkami specyficznym w stosunku masowym 4,1:1. Zapewnia to przejście przez białko ujemnego ładunku elektrycznego netto o stałej gęstości bez względu na jego długość. Dla całkowitego rozwinięcia polipeptydu i zapewnienia mu pierwszorzędowej struktury, niezbędne jest dodatkowo zniszczenie mostków dwusiarczkowych ( $\beta$ -merkaptotanol lub ditiotretiol). Opłaszczenie białka przez SDS oraz redukcja mostków dwusiarczkowych pozwalają na separację białek w żelu poliakrylamidowym ze względu na ich wielkość, a zatem pośrednio masę cząsteczkową. Szybkość migracji w SDS-PAGE nie jest determinowana przez ładunek elektryczny białka zależny od pH i konformacji białka.

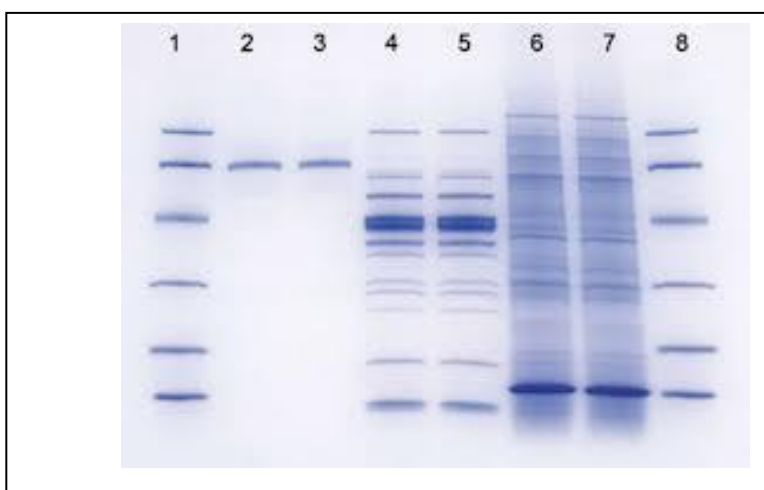
Dzięki możliwości rozdzielania białek na podstawie ich wielkości możemy oznaczyć masę cząsteczkową nieznanego białka, porównując jego położenie w żelu w stosunku do innych białek (tzw. białek wzorcowych) po zakończonej migracji i wybarwieniu.

## BARWIENIE I DOKUMENTACJA

Ukończenie rozdzielania elektroforetycznego nie kończy procedury. Większość białek i kwasów nukleinowych nie jest widoczna w świetle białym. Niezbędne jest ich wybarwienie (wizualizacja) w żelach lub na membranach, tak aby uzyskać informację o dystansie ich migracji i ich ilości w prążku.

Stosowanych jest wiele metod wizualizacji żeli i membran. Białka najczęściej wybarwia się stosując naturalne barwniki, takie jak błękit kumassi (ang. Coomassie Brilliant Blue) czy czerń amidową. Barwnik dodawany jest zwykle do roztworu utrwalającego położenie białka w żelu (denaturacja i unieruchomienie molekuł), po czym nadmiar barwnika jest wymywany. Pozostaje tylko barwnik związany z białkami. Czulość takiej detekcji białek jest stosunkowo dobra. Można w ten sposób znaleźć 1  $\mu$ g białka w prążku.

Znacznie bardziej czułą metodą jest barwienie srebrem. Metoda ta pozwala oznaczyć 10 ng białka w prążku. Przy pomocy srebra można również wybarwić kwasy nukleinowe oraz oligonukleotydy, a czulość detekcji zbliżona jest również do 10 ng DNA na prążek.



Rys. 4. Przykładowe rozdzielanie białek w żelu poliakrylamidowym przedstawiono na rysunku. Żel barwiono Coomassie Brilliant Blue R-250.

Najprostszą formą dokumentacji rozdzielonych w procesie elektroforezy w żelach poliakrylamidowych składników jest ich wysuszenie pomiędzy warstwą bibuły i celofanu lub pomiędzy dwoma warstwami celofanu. Wysuszony w ten sposób żel można przechowywać dowolnie długo bez widocznego uszczerbku w jakości tego dokumentu. Żele poliakrylamidowe przygotowane na folii można suszyć bez okrywania celofanem. Trudności pojawiają się wtedy, gdy trzeba wysuszyć żel o zawartości akrylamidu powyżej 15%. Odwodnienie żelu powoduje silne jego obkurczenie i w rezultacie pęknięcie. Można temu przeciwdziałać wypierając z żelu wodę przez dodanie glicerolu. Żele takie pozostają jednak nieco lepkie i muszą być okryte folią.

Żele agarozowe nie poddają się jednak tej formie dokumentowania. Najprostszym sposobem utrwalenia informacji zawartej w żelu agarozowym jest sporządzenie jego fotografii lub skanu. Technika tę można zastosować również do żeli poliakrylamidowych. Od kilku lat do dokumentacji rozdzielonych elektroforetycznych stosuje się z powodzeniem kamery cyfrowe, a uzyskany obraz przechowywany jest w formie elektronicznej w pamięci komputera lub na innych nośnikach pamięci. Kamery cyfrowe pozwalają na uzyskanie i przetworzenie obrazu żeli i membran wizualizowanych barwieniem, z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych.

## **CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA**

### **Materiały**

- Aparat do elektroforezy (moduł elektrody + ramka zewnętrzna + mini tank + pokrywa)
- Zasilacz prądu stałego
- Pipety automatyczne
- Probówki typu Eppendorff 0,5 ml
- Łopatka do usuwania żelu z płytki
- Naczynia do wybarwiania żeli

### **Odczynniki chemiczne**

- Marker białek firmy Life Technologies
- Próbki standardów białek
- Próbki mleka
- Bufor redukujący z SDS do barwienia i denaturacji próbek (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 25% glicerol; 2% SDS; 0,05% błękit bromofenylowy; 2-merkaptioetanol 5%)

- Bufor glicynowy do elektroforezy SDS-PAGE ( Tris-base; glicyna; SDS)

Roztwór barwiący (100 ml)

- 50 ml metanolu
- 10 ml lodowatego kwasu octowego
- 0.25 g Coomassie blue R-250
- 40 ml wody

Roztwór odbarwiający (1000 ml)

- 300 ml metanolu
- 100 ml lodowatego kwasu octowego
- 600 ml wody

Czułość: do 0.1  $\mu$ g

Zaletą metody jest prostota wykonania i niezawodność. Wadą jest niewielka relatywnie czułość.

### **Wymagane środki ostrożności**

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):  
2-merkaptoetanol - T, N Produkt toksyczny, Produkt niebezpieczny dla środowiska R23/24/25, R38, R41, R43, R48/22, R50/53
- ✓ Pierwsza pomoc:
  - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody.
  - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
  - jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze. Jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie. Zasięgnąć porady medycznej.
  - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
  - w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

## Wykonanie

Rozdzielanie elektroforetyczne białek w żelu poliakrylamidowym:

1. W celu wykonania rozdzielania elektroforetycznego należy umocować żel (znajdujący się pomiędzy szybkami) w ramce wewnętrznej z zaciskami, tak żeby okienko do wprowadzania próbek znajdowało się od wewnętrznej strony górnej części aparatu. Krawędź szybki z przekładkami powinna znajdować się na równi z krawędzią górnej części aparatu. Niestaranne przymocowanie szybki z żelem do aparatu może powodować przelewanie buforu elektroforetycznego z górnej części aparatu do dolnej oraz może być przyczyną nierównego rozdzielania elektroforetycznego.
2. Po przeciwnej stronie aparatu należy w analogiczny sposób zamontować drugi żel lub samą szybkę, stanowiącą w drugim przypadku zaporę dla buforu znajdującego się w górnej komorze. Górną część aparatu z przymocowanymi żelami należy umieścić w dolnej komorze (mini tank).
3. Następnie należy nalać bufor elektroforetyczny do obydwu komór, w taki sposób, aby bufor ten dochodził do górnej i dolnej krawędzi żelu, wypełnił studzienki, umożliwiając w ten sposób przepływ prądu (obwód zamknięty).
4. Stosowne ilości próbki należy mieszać z odpowiednią ilością buforu denaturującego do nanoszenia białek (najczęściej 4:1, czyli np. 40  $\mu$ l próbki i 10  $\mu$ l buforu do nanoszenia). Bufor ten powoduje denaturację białek, nadaje białkom wypadkowy ładunek ujemny, obciąża próbkę, dzięki czemu łatwo można ją nanieść do studzienek żelu oraz zawiera barwnik umożliwiający kontrolę postępu elektroforezy.
5. Podłączyć elektrody do zasilacza.
6. Włączyć zasilacz i ustawić napięcie o wartości 200 V w czasie 35 minut.
7. Po zakończonej elektroforezie białek, odłączyć aparat do elektroforezy od prądu i wyciągnąć ramkę wewnętrzną z żelami.
8. Wyciągnąć żele z ramki wewnętrznej.
9. Delikatnie odrzucić mniejszą szybkę.
10. Za pomocą łopatkę zsunąć żel z płytki szklanej i umieścić żel w roztworze barwiącym.
11. Żel w roztworze barwiącym inkubować przy delikatnym kołysaniu przez 30-60 min lub dłużej w celu zwiększenia czułości detekcji.
12. Zlać roztwór barwiący (można wykorzystać do kolejnych barwień), odmyć resztki roztworu barwiącego wodą destylowaną, zalać roztworem odbarwiającym.

13. Inkubować 2-16 h przy delikatnym kołysaniu. Wymiana roztworu odbarwiającego przyspiesza i poprawia jakość detekcji.
14. Umieścić żel w wodzie. Żele mogą być przechowywane przez czas praktycznie nieokreślony w wodzie bez utraty intensywności prążków, ale przy dłuższym przechowywaniu w wodzie pęcznieją. Aby zapobiec pęcznieniu można dolać 20 glicerolu. Przechowywanie w buforze odbarwiający prowadzi do osłabienia intensywności prążków.
15. W celu trwałej archiwizacji żel przełożyć do przezroczystej folii i zeskanować.

Przyspieszenie odbarwiania:

- częsta zmiana buforu
- inkubacja w temperaturze do 45°C
- dodanie kawałka gąbki pochłaniającego kumarynę.

## **Sprawozdanie**

W sprawozdaniu z wykonanych ćwiczeń należy umieścić krótki wstęp teoretyczny, zawierający informacje o podstawowej technice elektroforezy, jak również, informacje o innych modyfikacjach tej metody oraz o metodach barwienia białek w żelach poliakrylamidowych. Podać cel ćwiczenia i opisać poszczególne jego etapy. Przeprowadzić analizę żelu (umieścić zdjęcie żelu wraz z opisem). Zmierzyć drogę migracji poszczególnych białek wzorcowych. Wykonać wykres zależności drogi migracji od logarytmu masy cząsteczkowej białek wzorcowych. Odczytać wartość masy cząsteczkowej nieznanego białka.

Przeprowadzić dyskusję wyników i podać wnioski.

## **Literatura**

1. "Techniki elektromigracyjne - teoria i praktyka" [Red.] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M., Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, ISBN 978-83-925269-9-5.
2. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L. (2005) Biochemia. (według V wyd. amerykańskiego) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
3. Józwiak Z., Bartosz G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN (2007)
4. <http://www.kucharczyk.com.pl/> (Przepisy i porady)