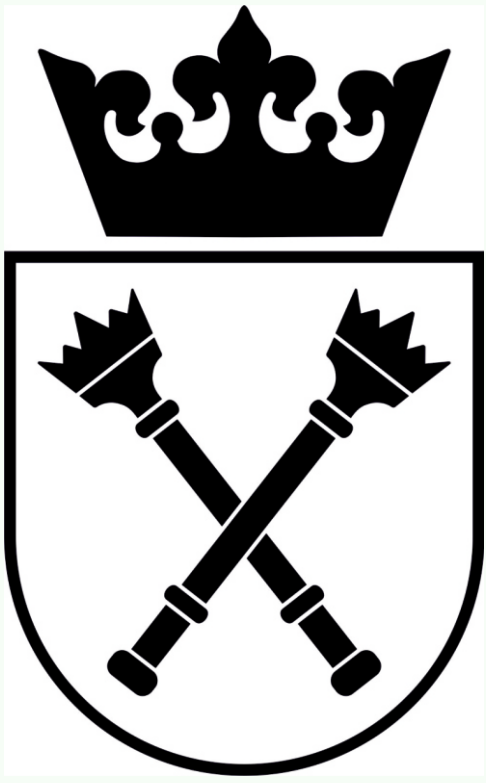




ELEKTROFOREZA BIAŁEK NA ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

Magdalena Czajka
Opiekun projektu: dr hab. Ewa Stępień prof. UJ



Wprowadzenie

ELEKTROFOREZA - jest to technika analityczna, stosowana w chemii i biologii molekularnej. Jej istotą jest rozdzielenie mieszaniny związków chemicznych na możliwie jednorodne frakcje przez wymuszanie wędrówki ich cząsteczek w polu elektrycznym. Siła elektrostatyczna działająca na te cząsteczki opisana jest wzorem:

$$F_e = qE$$

Cząsteczki różnych substancji różnią się zwykle ruchliwością elektroforetyczną (U). Parametr ten jest w przybliżeniu wprost proporcjonalny do ładunku elektrycznego cząsteczki odwrotnie proporcjonalny do jej wielkości - zależy od jego ładunku q , promienia r , oraz lepkości ośrodka η :

$$U = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Cel ćwiczenia

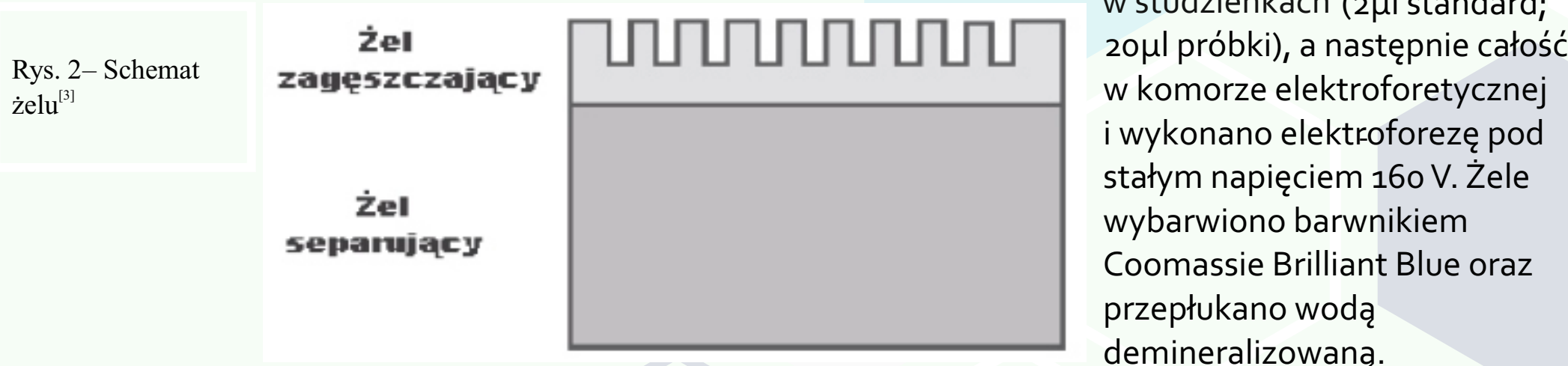
Celem ćwiczenia Z48 była analiza jakościowa białek, możliwa dzięki przeprowadzeniu ich rozdziału podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym po wcześniejszej denaturacji określonych próbek białek przy użyciu dodecylsiarczanu sodu oraz porównanie ich mas cząsteczkowych wyznaczonych eksperymentalnie, z masą podaną przez producenta.

Elektroforeza żelowa

W elektroforezie żelowej ośrodkiem, w którym przemieszczają się badane substancje jest żel elektroforetyczny sporządzony z poliakrylamidu lub agarozy. Kroplę analizowanej mieszaniny białek nanosi się do tak zwanej studzienki, czyli zagłębienia w żelu. Jeśli zależy nam na ograniczeniu wpływu kształtu cząsteczek na szybkość ich migracji elektroforetycznej i ściślejszym powiązaniu ich ruchliwości z masą cząsteczkową, można badane substancje poddać denaturacji. W zależności od techniki, cały żel lub jego końce zanurzone są w przewodzącym prąd roztworze buforowym. Wzdłuż krawędzi żelu, zwykle na dwóch przeciwnych bokach płytki, biegną elektrody, do których przykładają się stałe lub asymetryczne pulsujące napięcie elektryczne. Ze względu na zróżnicowaną U ruchliwsze (zazwyczaj mniejsze) cząsteczki oddalają się szybciej od miejsca naniesienia próbki. Przebieg elektroforezy można monitorować, nanosząc (na osobnych ścieżkach lub razem z preparatem) specjalne barwniki (tak zwane markery) o znanej mobilności elektroforetycznej oraz standardy. Standardy wielkości są mieszaniną kilku lub kilkunastu białek o znanej masie. Po ich równoległym rozdziale razem z analizowaną próbką możliwe jest oszacowanie masy badanych białek. Dla większości białek błąd w szacowaniu wielkości mieści się w granicach 5-10%^[7]. Po zakończeniu procesu żel wydobywa się z aparatu i analizuje przez wybarwienie lub obserwację absorpcji światła (zwykle nadfioletowego) przez żel.

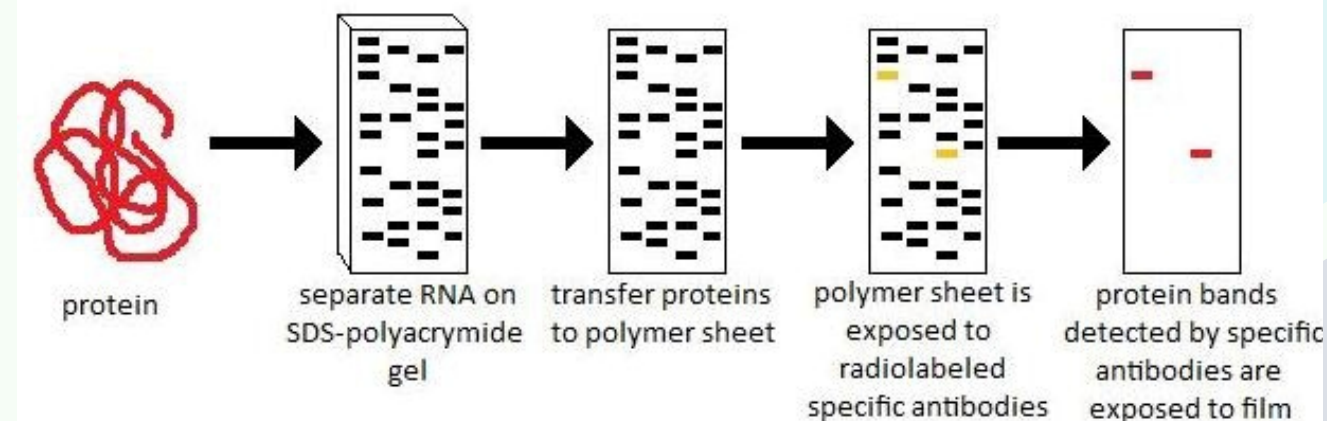
Materiały i metody

Ćwiczenie polegało na wykonaniu żeli, przygotowaniu próbek oraz przeprowadzeniu elektroforezy. Przygotowane żele: górny - zagęszczający oraz dolny - separujący (w dwóch stężeniach, jeden 8%, drugi 15%). Przygotowano roztwory białek: albuminy i proteazy (5; 2,5; 1 mg/ml) które umieszczono



Zastosowanie

Technologia Western-Blot jest metodą stosowaną w biologii molekularnej do detekcji różnego rodzaju białek. Stosuje się tu elektroforetyczny rozdział białek zdenaturowanych według ich mas cząsteczkowych lub natywnych (niezdenaturowanych) zgodnie z ich strukturą trzeciorzędową, po czym żel się wybarwia lub mieszaninę rozdzielonych białek transferuje się na membrany nitrocelulozowe lub PVDF. Obecność białek w badanym materiale jest potwierdzana za pomocą swoistych przeciwciał, monoklonalnych lub poliklonalnych. Przed dodaniem przeciwciał membrana musi zostać „zablokowana” w celu uniemożliwienia niespecyficznego łączenia się przeciwciał z membraną^[2]. Do blokowania membran najczęściej używa się odtłuszczonego mleka lub albuminy z surowicy cielęcej^[6]. Przeciwciała są zwykle wyznakowane enzymem lub izotopem radioaktywnym. Znakowanie enzymem daje barwny, nierozpuszczalny produkt osadzający się na membranie lub



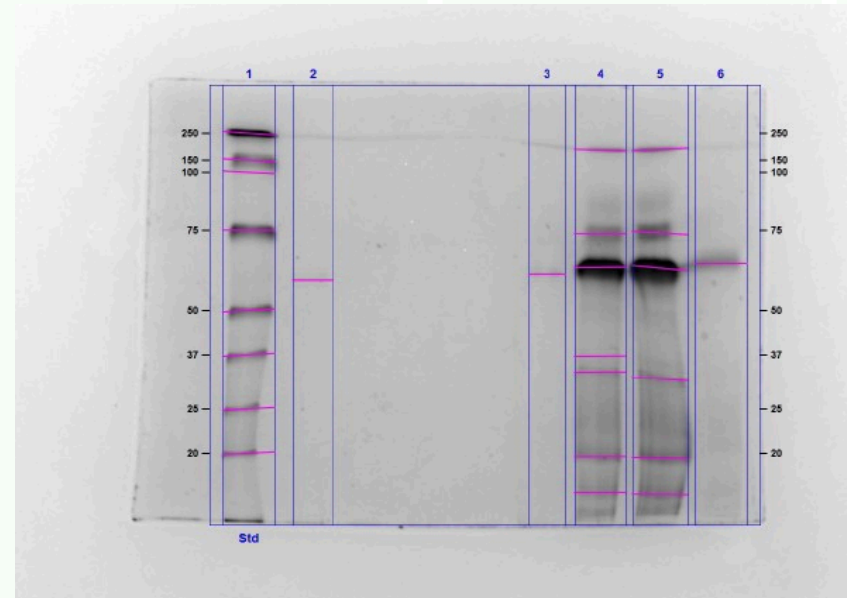
Rys. 2 Diagram przedstawiający metodę Western-Blot^[5]. chemiluminescencję. W przypadku stosowania techniki chemiluminescencji obraz otrzymuje się, podobnie jak przy zastosowaniu radioizotopów, poprzez przyłożenie do membrany kliszy fotograficznej^[2].

Inne zastosowania w biologii molekularnej to: badanie detekcji fosforylacji białek powierzchniowych błon komórek śródbłonna^[8], ocena poziomu fosforylacji białek płytek krwi u chorych na przewlekłą niewydolność nerek^[2], badanie składu białkowego oraz immunobloting mięsa^[9,10], badanie białek z generatywnych części roślin^[11], ocena fenotypów np. α_1 -trypsyny^[12], analiza białek zakażonych wirusem^[13], diagnostyka wirusów^[14], oczyszczanie białek z nadekspresji^[15].

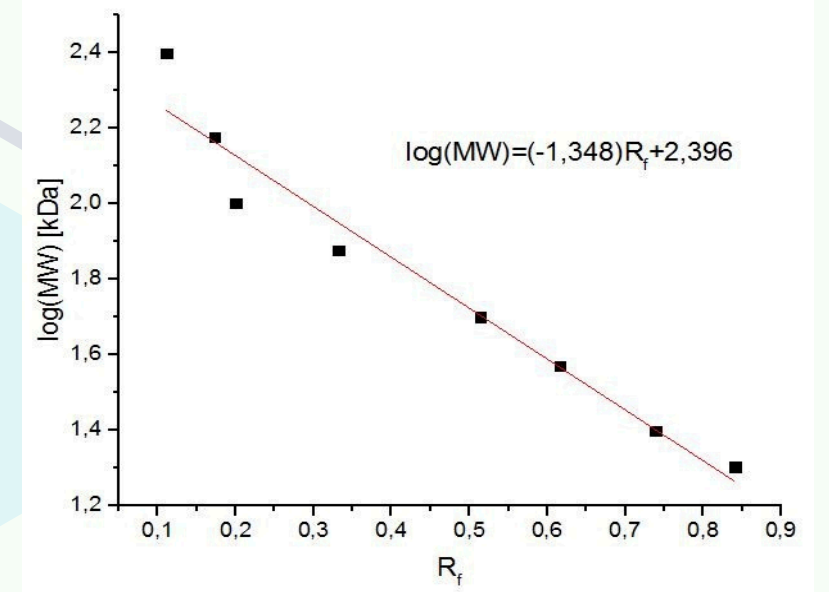
Wnioski

- Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym pozwala na wyznaczenie mas molekularnych białek użytych w eksperymencie proteazy oraz albuminy.
- Wyniki pokazują że żel o wyższym stężeniu charakteryzuje się wyższą porowatością, a co za tym idzie, nieco lepiej rozdziela białka.
- Wartość mas molekularnych białek, szczególnie proteazy, różnią się od wartości wyznaczonych eksperymentalnie.
- Przyczyną rozbieżności w wynikach oraz stosunkowo dużych błędów względnych może być niejednorodność pola elektrycznego, zanieczyszczenie żeli lub białek, różna ilość białek wprowadzanych do studzienek oraz ręcznie wykonywana obróbka i analiza żeli w programie komputerowym.
- Powodem uzyskania dużych mas dla proteazy w stosunku do masy podanej przez producenta może być agregacja białek

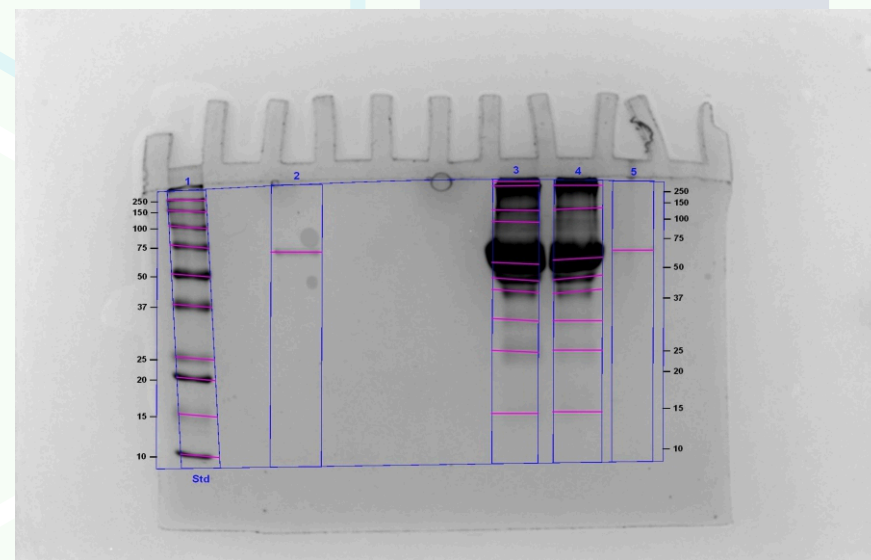
Analiza wyników



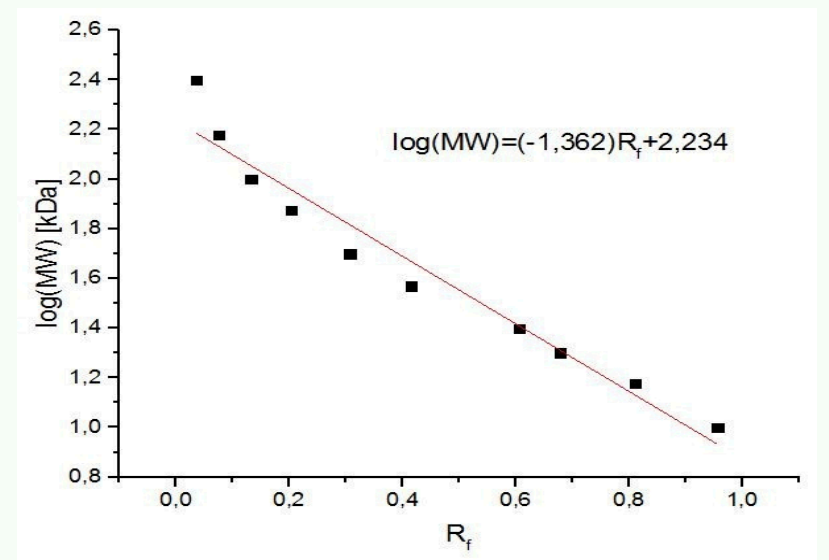
Zdjęcie żelu 8% wybarwionego barwnikiem Coomassie Brilliant Blue



Wykres zależności logarytmu masy cząsteczkowej od względnej ruchliwości



Zdjęcie żelu 15% wybarwionego barwnikiem Coomassie Brilliant Blue



Wykres zależności logarytmu masy cząsteczkowej od względnej ruchliwości

Analiza żeli polegała na obliczeniu wartości ruchliwości elektroforetycznej (U) opisanej przez stosunek odległości przebytej przez substancje rozdzielane do odległości przebytej przez czoło elektroforezy. Następnie wykonano wykresy zależności logarytmu masy cząsteczkowej użytych standardów od U oraz dopasowano prostą metodą regresji liniowej co przedstawione jest w wykresach powyżej.

Na podstawie uzyskanego równania prostej wyznaczono masy badanych białek.

Nazwa białka	Masa wyznaczona na podstawie elektroforezy [kDa]		Masa podana przez producenta próbek [kDa]
	Żel 8%	Żel 15%	
Albumina	61,3±4,4	57±7,8	66
Proteaza	48,2±80,9	53,3±104,5	18

Tabela 1 Wyniki otrzymane po przeprowadzeniu elektroforezy białek oraz porównanie otrzymanych mas z danymi producenta.

Niepewność pomiaru została obliczona na podstawie błędu względnego, po przekształceniu wartości procentowej na wartość w jednostce kDa.

Błąd względny obliczono ze wzoru:

$$\Delta M = \frac{M_p - M_e}{M_p} * 100\%$$

gdzie M_p - masa podana przez producenta; M_e - masa wyznaczona na podstawie elektroforezy.

Literatura

- [1] Ocena poziomu fosforylacji białek płytek krwi aktywowanych ADP u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek - Walkowiak B., Tański W., Koziółkiewicz W.
- [2] <http://biotechnologia.pl/archiwum/detekcja-bialek-przy-uzyciu-technologiei-western-blot>
- [3] http://www.fizyka.uj.edu.pl/II_pracownia/PDF/Z48.pdf
- [4] biorad.com/en-mx/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-mul
- [5] https://pl.wikipedia.org/wiki/Western_blot
- [6] <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Western-Blot>
- [7] <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/SDS-PAGE/>
- [8] Detekcja fosforylacji białek powierzchniowych błon komórek śródbłonna z udziałem ektokinaz białkowych - Pawłowska Z.
- [9] Elektroforeza białek mięsa o masie powyżej 200K w żelu agarozowym - Greaser ML., Kumazawa Y., Pospiech E.
- [10] Immunobloting białek mięsa - Greaser ML., Pospiech E., Fritz J., Swartz DR.
- [11] Elektroforetyczne rozdziły białek generatywnych części roślin - Kalinowski A., Radłowski M.
- [12] Ocena fenotypów α_1 -antytrypsyny - Piłak B.
- [13] Zastosowanie elektroforezy dwukierunkowej w analizie białek komórek MDCK zakażonych wirusem grypy - Rożek W.
- [14] Diagnostyka wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVD) - Niedbalski W., Kęsy A.
- [15] Elektroforetyczne oczyszczanie białek z nadekspresji w komórkach E.Coli - Szalata M., Kalak R., Lipiński D., Pławski A., Słomski R.