

Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym

Mariola Puzio

Opiekun naukowy: dr hab. Ewa Stępień prof. UJ



Wstęp

Elektroforeza jest zjawiskiem elektrokinetycznym, w wyniku którego pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego dochodzi do przemieszczania się makrocząstek obdarzonych niezrównoważonym ładunkiem elektrycznym.

Cel

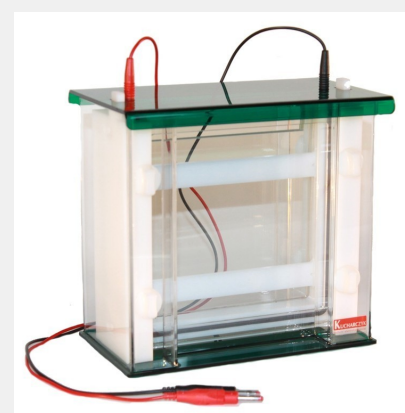
Celem ćwiczenia było wykonanie elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, zapoznanie się z technikami barwienia oraz analiza jakościowa otrzymanych

Podstawy fizyczne

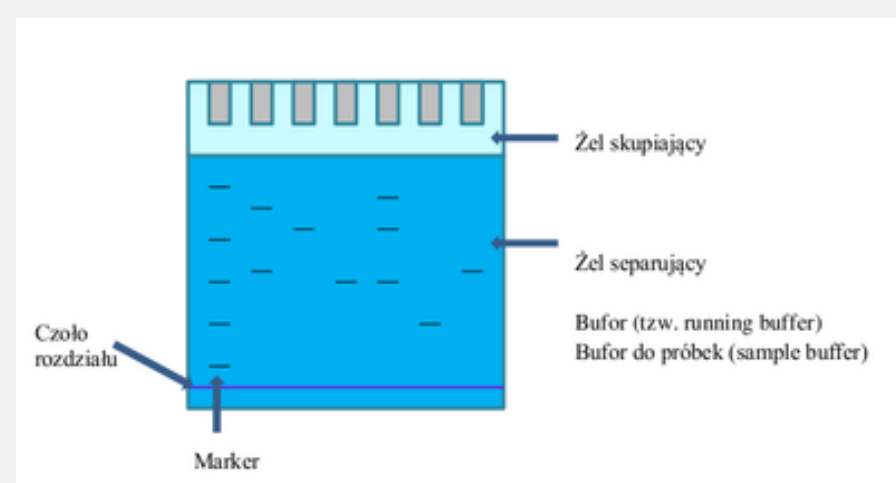
Na cząstkę o ładunku q znajdującą się w polu elektrycznym o natężeniu E działa siła: $F_e = qE$. Siła ta powoduje jednostajnie przyspieszony ruch cząstki, wynikający z II zasady dynamiki Newtona. Jednocześnie ruchowi temu przeciwstawia się siła lepkości środowiska. W przypadku cząstki kulistej można zastosować wzór Stokesa: $F_{lepkości} = 6\pi r\eta v$ (gdzie η - lepkość środowiska, r - promień cząstki). Przyrównując oba wzory otrzymujemy wzór na szybkość poruszania się cząstki: $v = \frac{qE}{6\pi r\eta}$ dla uproszczenia stosuje się wzór: $U = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r\eta}$

Przebieg elektroforezy:

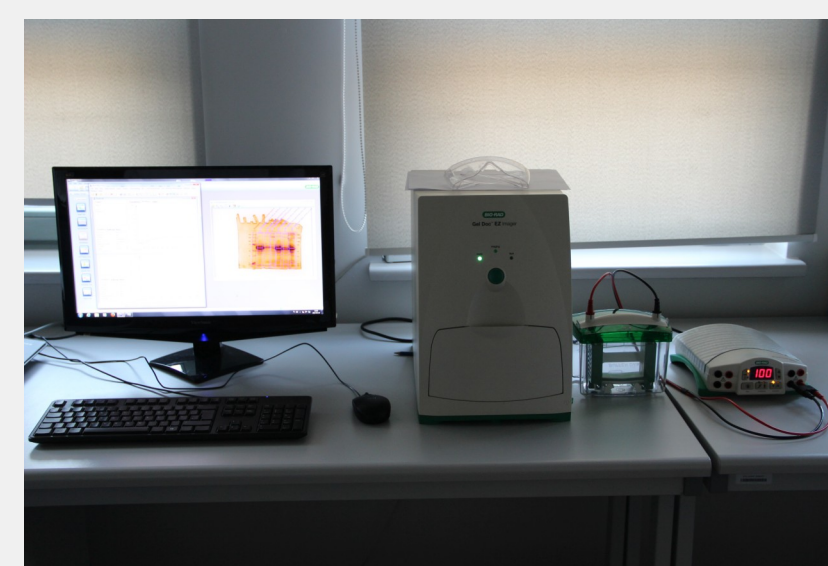
Pierwszym krokiem który był niezbędny do wykonania elektroforezy było przygotowanie dwóch żeli; górnego oraz dolnego. Następnie przygotowano próbki białek; trypsyny, albuminy, kazeiny i proteazy. W tym celu zostały odważone odpowiednie ilości białek, które zostały zdenaturowane (zaburzenie struktury cząsteczek białkowych wynikające z rozerwania wiązań chemicznych stabilizujących ich strukturę drugo-, trzecio- i czwartorzędową) w wodzie o temperaturze 100% oraz zmieszano z buforem w stosunku 1:1. Następnie wprowadzono do układu wykorzystywanego w ćwiczeniu białka i zaczęto przeprowadzać elektroforezę poprzez włączenie zasilacza oraz ustawienie stałego napięcia. Po wykonaniu pomiaru żel utrwalono oraz wybarwiono dwoma metodami: 1. Coomassie Blue 2. Azotan srebra



Komora do elektroforezy[4]

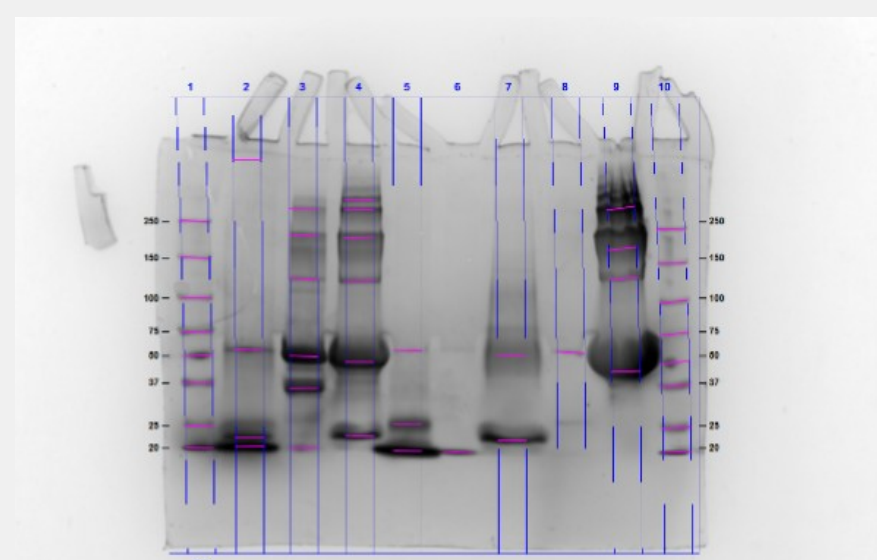


Schemat żelu do elektroforezy [5]

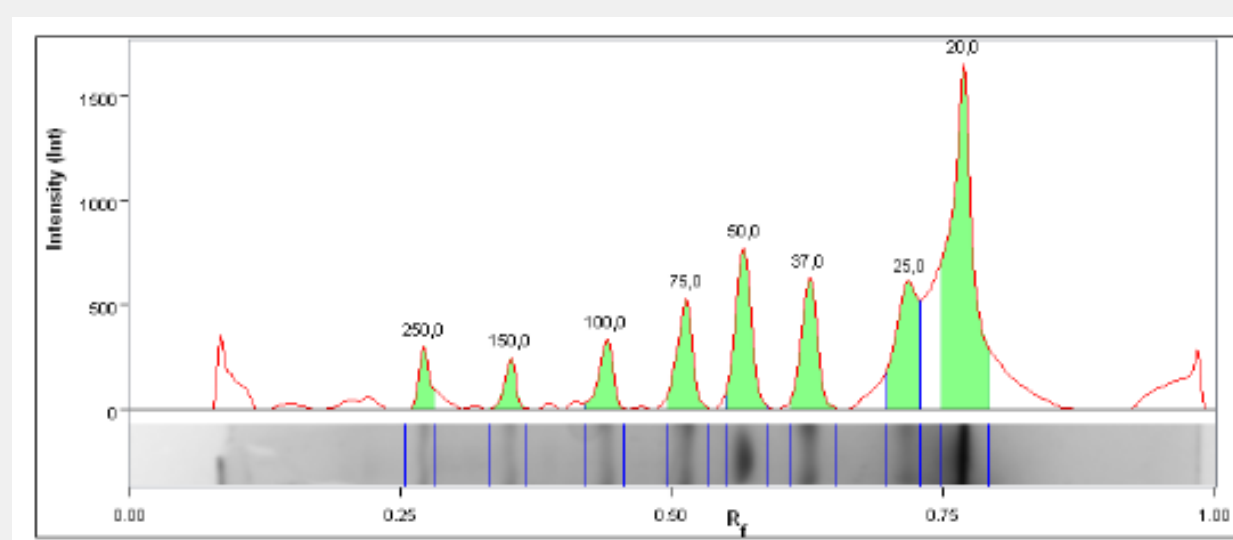


Układ wykorzystywany w doświadczeniu[1]

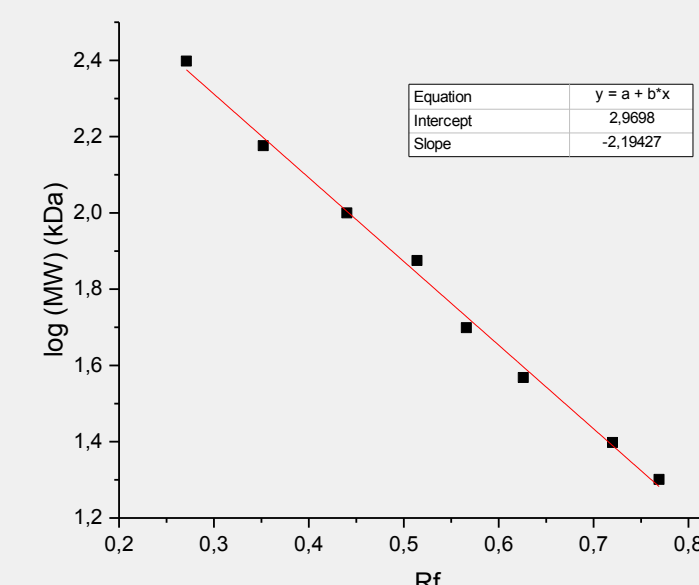
Wyniki



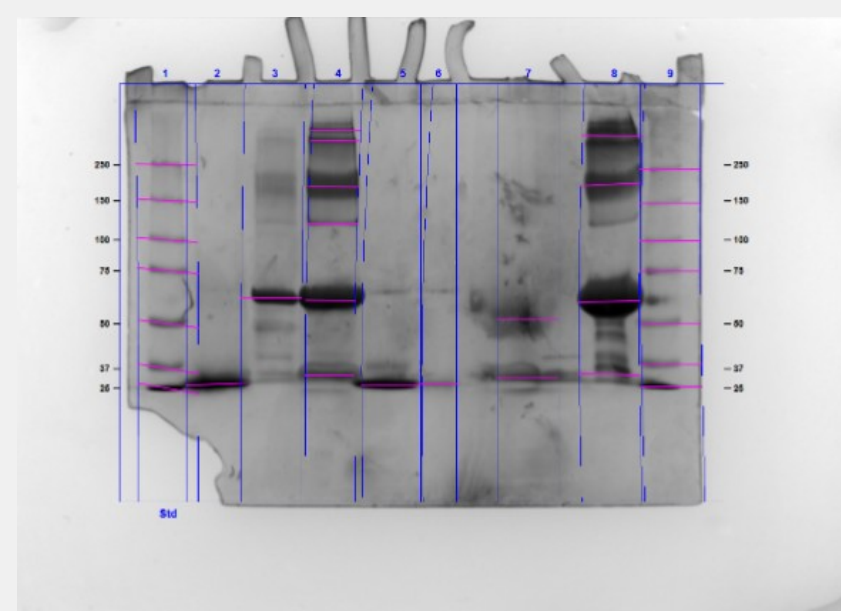
Zdjęcie żelu wybarwionego metodą Coomassie Blue



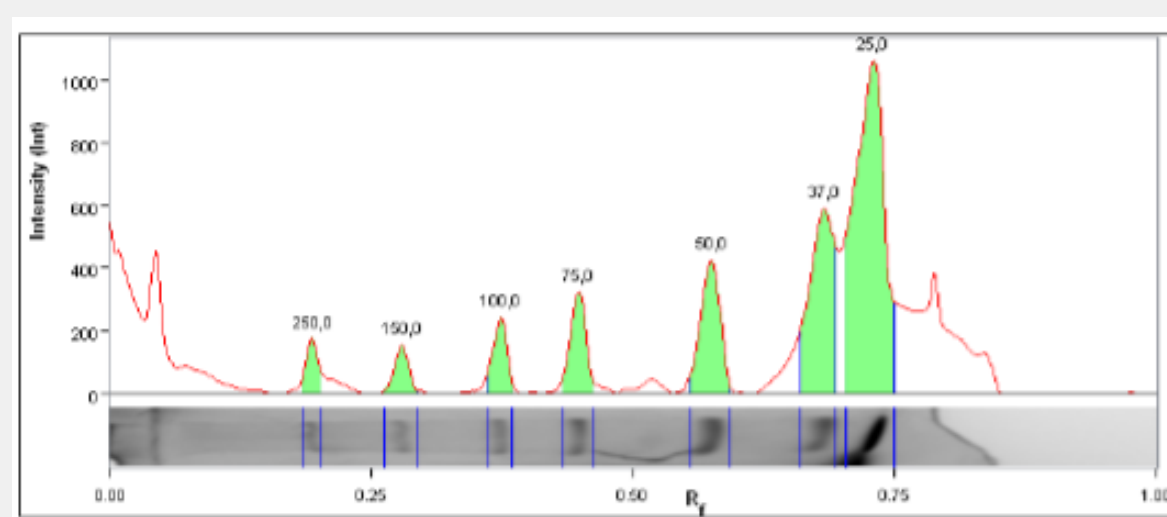
Densytogram dla standardu białkowego



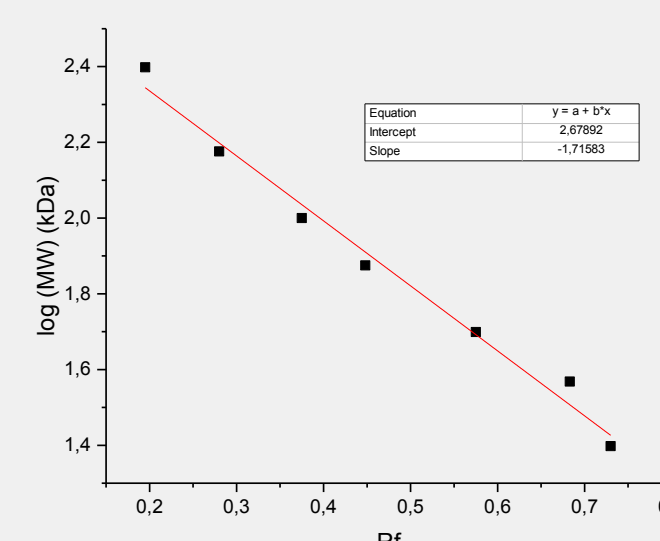
Wykres zależności logarytmu naturalnego masy cząsteczkowej od ruchliwości



Zdjęcie żelu wybarwionego azotanem srebra



Densytogram dla standardu białkowego



Wykres zależności logarytmu naturalnego masy cząsteczkowej od ruchliwości

Po oszacowaniu masy możliwe było stwierdzenie obecności badanych białek w roztworach. Niepewność wyznaczono ze wzoru na błąd względny: $\delta = \frac{\Delta}{a_0} = \frac{|a - a_0|}{a_0} \cdot 100\%$ (gdzie: a - masa wyznaczona doświadczalnie, a_0 - masa podana przez producenta). Wynik przeliczono na jednostkę kDa.

Białko	Masa wyliczona eksperymentalnie na podstawie elektroforezy (kDa)		Masa podana przez producenta (kDa)
	Coomassie Blue	Azotan srebra	
Kazeina	32,8±2,23	28,51±2,01	30,7
Albumina	60,1±5,35	56,13±9,9	66
Trypsyna	24,21±0,41	20,81±4,95	23,8
Trypsyna Inhibitor	18,33±0,70	20,9±0,84	20,1
Proteaza	25,9±0,29	21,3±3,83	26,2

Wnioski

Dokonano porównania mas zidentyfikowanych na ścieżkach białek wyliczonych przy użyciu dwóch metod: wyznaczonej krzywej kalibracyjnej oraz przy wykorzystaniu programu do analizy żeli ImageLab.

Wyznaczone masy nie są do końca zgodne. Wpływ na to mogły mieć różne zanieczyszczenia, oraz warunki przygotowania standardu białkowego. Przy użyciu metody Coomassie Blue wyznaczone wartości są bardziej zbliżone do wartości mas podanych przez producenta niż w przypadku użycia metody Coomassie Blue.

Literatura

1. <http://www.2pf.if.uj.edu.pl/web/ii-pracownia-fizyczna/z48>
2. <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Barwienie-bialek/>
3. <http://labor.zut.edu.pl/wfc1.html>
4. <http://www.kucharczyk.com.pl/produkty/elektroforeza-pionowa/>
5. https://brain.fuw.edu.pl/edu/index.phpMetody_Biofizyki_Molekularnej/Elektroforeza