

ELEKTROFOREZA BIAŁEK NA ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

1 Wprowadzenie

Elektroforeza jest techniką pozwalającą na rozdział białek w zależności od ich ruchliwości elektroforetycznej. Do rozdziału cząsteczek w elektroforezie używa się pola elektrycznego. Na każdą cząsteczkę o ładunku elektrycznym q działa siła elektrostatyczna F równa:

$$F = qE$$

Gdzie: E - pole elektryczne.

Cząsteczka, na którą działa siła z początku przez moment porusza się ruchem przyspieszonym. W chwili gdy siła oporu będzie równa sile elektrostatycznej, wtedy obie siły będą się równoważyć, a cząsteczka zacznie poruszać się ruchem jednostajnym prostoliniowym. Wartość siły oporu zmienia się zgodnie z prawem Stokes'a:

$$F = -6\pi r n v$$

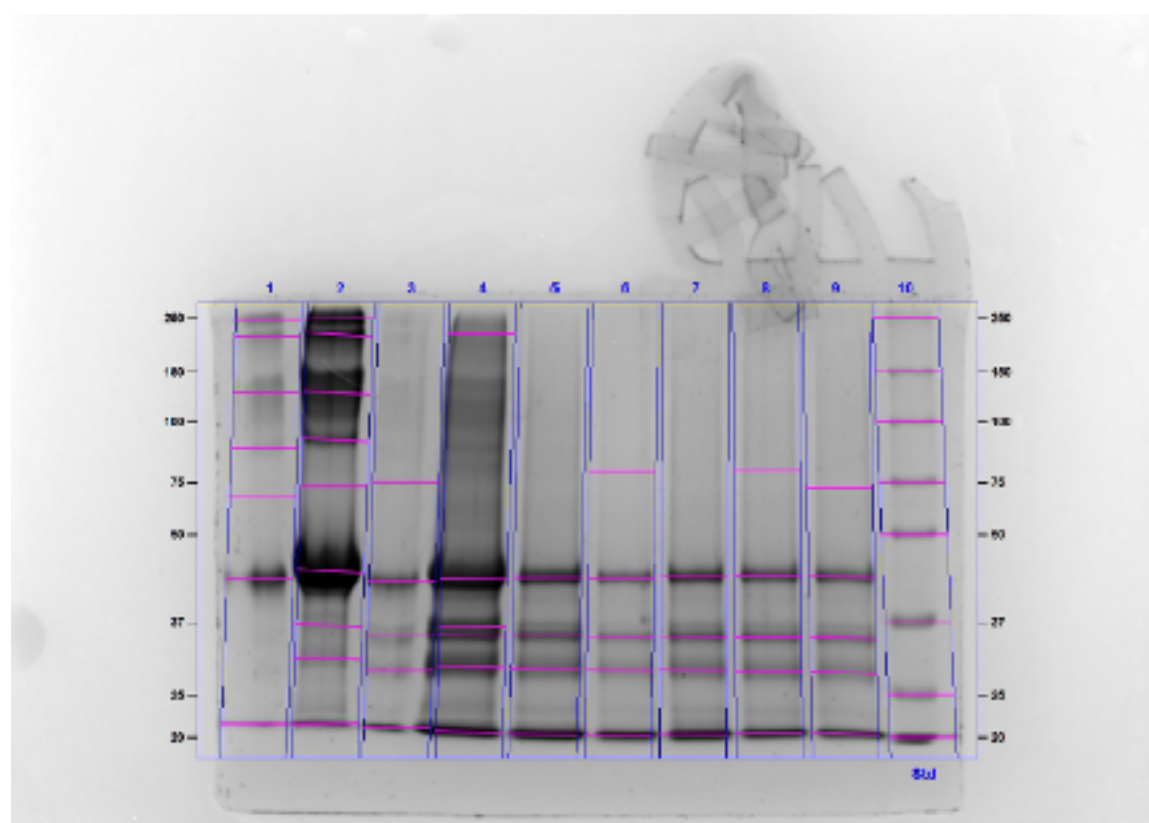
Gdzie: r - promień cząsteczki, n - lepkość, v - prędkość cząsteczki

W momencie, w którym obie siły się równoważą zachodzi równość, z której wydzielić można czynnik U , zwany ruchliwością elektroforetyczną:

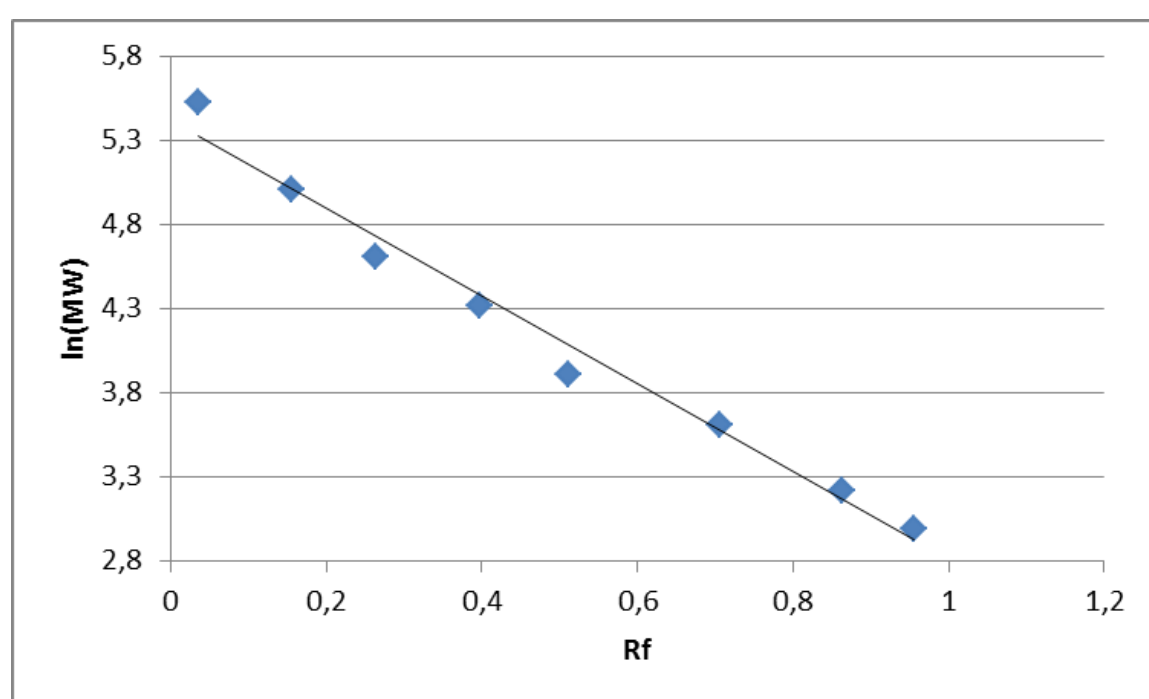
$$U = q/6\pi r n$$

W wykonanym ćwiczeniu przeprowadzono elektroforezę białek. Białka są podstawowymi składnikami pełniącymi różne role w funkcjonowaniu organizmów żywych. Aby wykonać elektroforezę ze względu na masę konieczne jest zastosowanie denaturacji białka. Polega ona na rozerwaniu słabych wiązań struktur, nie niszcząc jednocześnie struktury pierwszorzędowej (wiązań peptydowych). W wyniku tego białko przypomina nić, dla którego siła lepkości jest niezależna od długości łańcucha, ani od aminokwasów w nim występujących.

3 Analiza wyników



Zdjęcie żelu po wykonaniu elektroforezy wraz z naniesionymi oznaczeniami frakcji białek.



Wykres przedstawiający krzywą kalibracyjną dla badanego żelu.

Analiza otrzymanych wyników (żeli) polegała na wyznaczeniu ruchliwości elektroforetycznej U to znaczy, oznaczono jaką odległość pokonały frakcje białka. Oznaczenie to jest możliwe ponieważ, po uprzednim wybarwieniu próbek barwnikiem Coomassie Blue można było obserwować różną odległość jaką przebyły kolejne frakcje białka w stosunku do "czoła" elektroforezy. Dzięki temu można gołym okiem zobaczyć na żelach różnicę ruchliwości dla różnych frakcji. W ostatniej kolumnie po prawej (zdjęcie z lewej) jako badana próbka umieszczony był standard białkowy.

Następnie wykonano wykres krzywej kalibracyjnej w oparciu o wyznaczone wyniki oraz o użyty standard. Na podstawie tej krzywej wyznaczono masy MW badanych białek korzystając ze wzoru:

$$\ln(MW) = R_f \cdot a + b$$

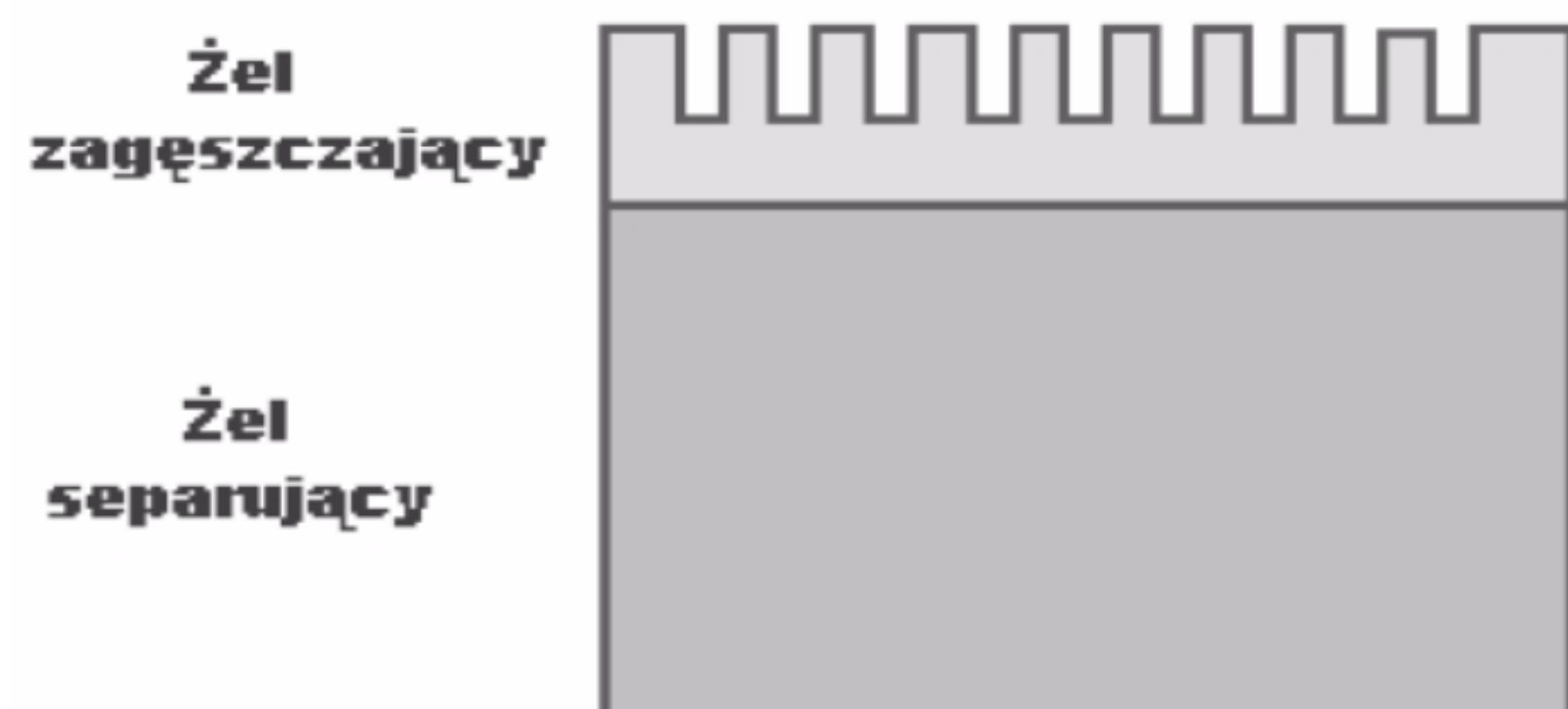
Gdzie: R_f - odległość względna, a i b - współl. regresji liniowej

2 Metoda

Ćwiczenie polegało na wykonaniu żeli, przygotowaniu próbek, umieszczeniu próbek w odpowiednich dołeczkach w żelach oraz przeprowadzeniu elektroforezy. Przygotowane żele składały się z 2 warstw: górnej - zagęszczającej oraz dolnej - separującej. Przygotowano żele w 2 stężeniach: 8% i 15%.

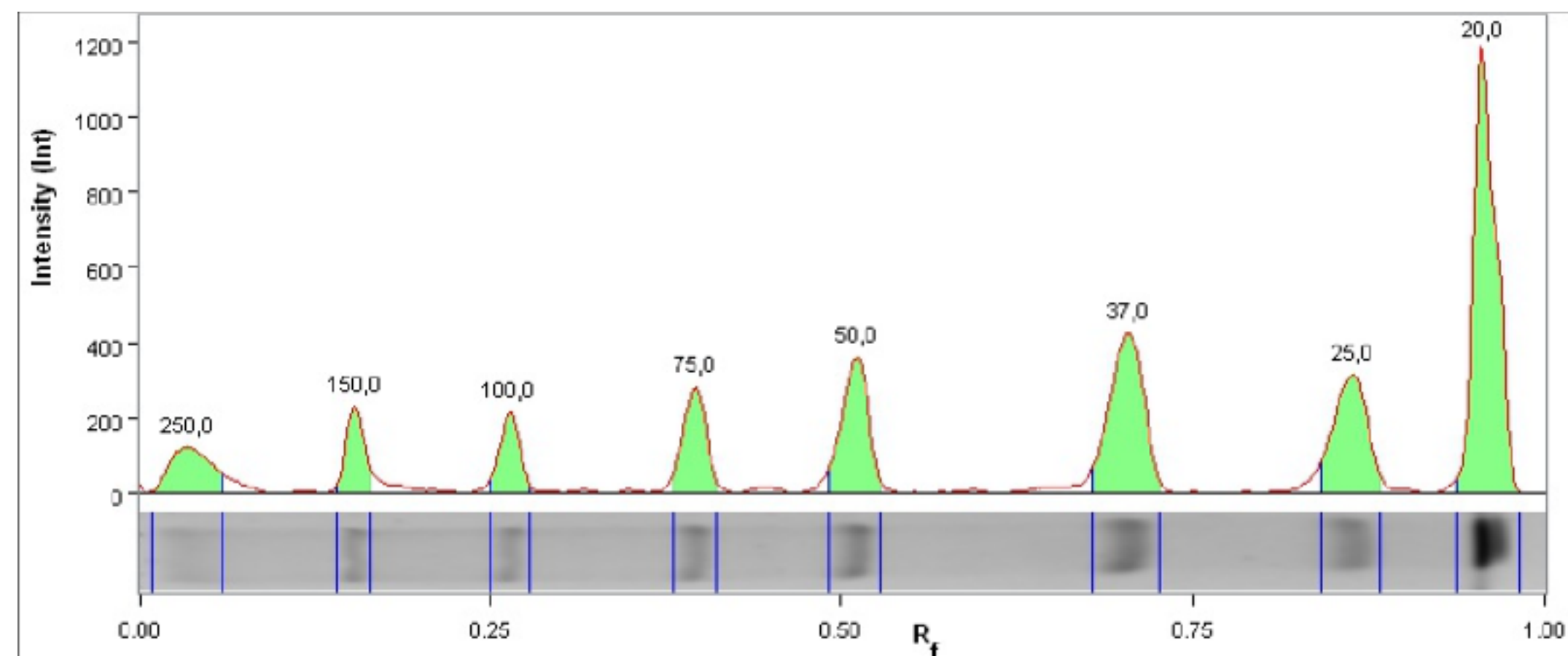
Żel powstaje w wyniku polimeryzacji akrylamidu, tworząc sieć elastycznych łańcuchów polimerowych, w którym migrują makromolekuły w polu elektrycznym. To właśnie ta cecha pozwala na przeprowadzenie rozdziału molekuł na długości żelu separującego.

Próbkami przygotowanymi na potrzeby doświadczenia były mieszaniny wody i białek: albuminy, proteazy, kazeiny oraz trypsyny. W przypadku albuminy były to roztwory. W przypadku kazeiny z racji na to że jest substancją trudno rozpuszczalną w wodzie można mówić o zawiesinie. Roztwory te zostały przygotowane w różnych stężeniach. Przygotowane zostały również mieszanki 2 różnych białek z wodą. Denaturację białka przeprowadzono poprzez trzymanie ependorfów wypełnionych próbkami przez 15 minut w gorącej wodzie. Następnie za pomocą pipety próbki roztworów umieszczono w dołeczkach, które powstały w warstwie zagęszczającej żelu po uprzednim włożeniu do niego grzebienia.



Schemat przedstawiający w jaki sposób użyto przygotowanych żeli. Rysunek przedstawia rozmieszczenie żeli w okienkach do elektroforezy.

4 Wnioski



Wykres analizy densytometrycznej - zobrazowanie jaka ilość białka znajduje się w danym paśmie dla standardu białkowego.

Przeprowadzenie elektroforezy umożliwiło rozpoznanie i rozdzielenie różnych frakcji białek znajdujących się w próbkach. Zabrudzenia i smugi widoczne na wykonanym zdjęciu żelu prawdopodobnie wynikają z zanieczyszczeń znajdujących się w białkach. 2 ciemniejsze pasma na zdjęciu pokazują że użycie wyższych stężeń badanych próbek powoduje powstanie intensywnego tła. Większość wyników jest zbliżona do wyników dla roztworu albuminy co sugeruje że to białko daje najlepsze rezultaty. Aby metoda dawała dobre wyniki należy włożyć dużo wysiłku i skrupulatnej pracy podczas dobierania odpowiednich stężeń badanych substancji.

Literatura:

[1] Instrukcja i materiały do ćwiczenia Z48 - Strona internetowa PMFB

[2] <https://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis>