

Z48 - ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

II Pracownia Fizyczna

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński

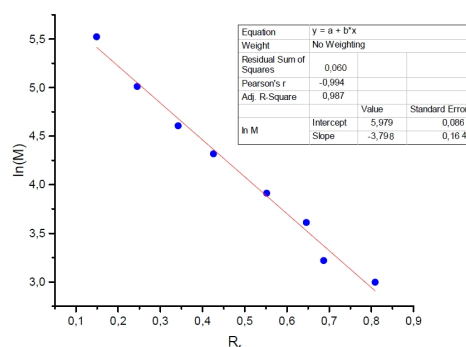
Ćwiczenie jest przykładem wykorzystania jednej z najpopularniejszych metod stosowanych w biologii molekularnej do analizy jakościowej i ilościowej białek. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym (PAGE) w warunkach denaturujących, w obecności siarczianu dodecylu sodu (SDS) została po raz pierwszy zastosowana przez Urlicha K. Laemmliego w latach 70 XX wieku jako metoda rozdzielania białek bakteriofaga T4 do wykrycia nowych białek i analizy ich wielkości. Do tej pory praca ta została zacytowana ponad 330 tys. razy, a metoda SDS-PAGE w wielu wariantach jest wykorzystywana do wstępnej oceny profilu białek izolowanych z różnych próbek biologicznych, a także w celu oczyszczenia białek do późniejszej analizy metodami spektroskopii masowej (MS).

Zagadnienia do przestudiowania

1. Definicja lepkości, od czego zależy współczynnik lepkości η i jakimi jednostkami jest wyrażony? [1]
2. Pomiar współczynnika lepkości i wzór Stockesa [2]
3. Opór elektryczny i pierwsze prawo Ohma.
4. Opisz równaniem ruch cząstki o ładunku elektrycznym q znajdującej się w polu elektrycznym o natężeniu E .
5. Co to są elektrolity? Przykłady elektrolitów nieorganicznych i organicznych [3].
6. W jakich warunkach dochodzi do elektrolizy związków organicznych?
7. Wzór strukturalny aminokwasu [4].
8. Równanie elektrolizy grup aminowych i karboksylowych aminokwasów w środowisku wodnym.
9. Podaj przykłady polimerów stosowanych jako nośniki w elektroforezie związków organicznych.
10. Co to jest ruchliwość elektroforetyczna (R_f) i od czego zależy?

Zadania obliczeniowe

Na podstawie wyznaczenia ruchliwości elektroforetycznej (R_f) oblicz masy cząsteczkowe (kDa) poszczególnych białek z próbek poddanych elektroforezie w różnych warunkach elektroforezy: żel 10%, 2% i 15%. Do obliczeń posłuż się krzywą standardową dla standardu białkowego Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad) oraz programem Image Lab (BioRad) oraz programem Origin (Rys. 1).



Rysunek 1: Przykładowa krzywa standardowa dla ruchliwości elektroforetycznej standardu w 10% żelu poliakrylamidowym (wg. Irena Rodzoń, Biofizyka III rok - sprawozdanie z 2015)

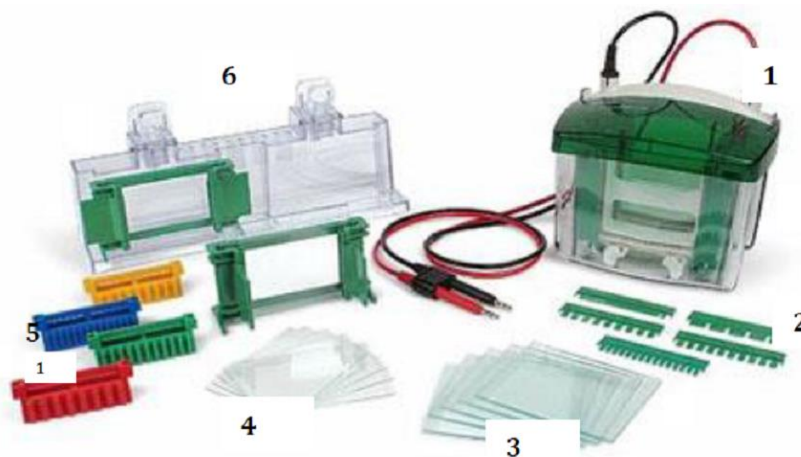
Aparatura i materiały

W ślad zestawu do elektroforezy wertykalnej wchodzi:

- Komora do przeprowadzania rozdzielania elektroforetycznego wraz z kablami zasilającymi,
- Grzebienie, które służą do utworzenia dołków w żelu poliakrylamidowym,
- Płytki podstawowe z przerwą 1mm,
- Płytki nakrywkowe,
- Przegrody ułatwiające wprowadzanie białek do studzienek,
- Stojak i „okienka” do przygotowywania żeli.

Odczynniki:

- Woda demineralizowana i destylowana
- 96% Alkohol etylowy skażony (Linegal Chemicals, nr kat. LL-00012)



Rysunek 2: Zestaw do elektroforezy wertykalnej (Bio-Rad, Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell Systems).

- 40% Akrylamid (Bio-Rad, nr kat. 1610140)
 - 2% Bisakrylamid (Bio-Rad, nr kat. 1610142)
 - 10% SDS (Bio-Rad, nr kat. 1610416)
 - TEMED (Bio-Rad, nr kat. 1610800)
 - 10% Nadsiarczan amonu (APS) (Bio-Rad, nr kat. 161-0700)
 - 1,5 M Bufor Tris-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad, nr kat. 1610798)
 - 0,5 M Bufor Tris-HCl, pH 6,8 (Bio-Rad, nr kat. 1610799)
 - Laemmli bufor obciążający do próbek (Bio-Rad, nr kat. 161-0737)
 - β -merkaptoetanol (Bio-Rad, nr kat. 161-0710)
 - Bufor do elektroforezy - 10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad, nr kat. 161-0732)
 - Standard masowy białek (tzw. drabinka) - Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards (Bio-Rad, nr kat. 1610374).
5. Przygotowanie, denaturacja próbek i nakładanie ich na żel.
 6. Wykonanie elektroforezy
 7. Utrwalanie żelu
 8. Barwienie żelu
 9. Analiza rozdziału białek przy pomocy programu Image lab.

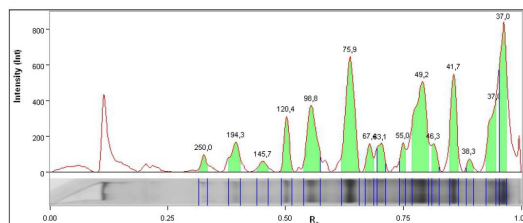
Opracowanie wyników

1. Porównaj masy cząsteczkowe wyliczone za pomocą krzywej standardowej opracowanej na podstawie dopasowania regresji linowej dla standardów białkowych w programie Origin i Image Lab.
2. Dokonaj analizy densytometrycznej dla poszczególnych próbek w zapisem mas cząsteczkowych białek (kDa) (Rys. 3)
3. Dokonaj analizy niepewności pomiarowych dla różnych stężeń żelu poliakrylamidowego i tych samych próbek białek.

Pipety automatyczne, końcówki do pipet, próbówki typu eppendorf poj. 1,5 mL, próbówki typu Falcon poj. 15 mL i 50 mL

Program ćwiczenia

1. Przygotowanie odczynników do elektroforezy SDS-PAGE.
2. Przygotowanie aparatury do elektroforezy SDS-PAGE
3. Wylewania żelu dolnego (rozdzielającego)
4. Wylewanie żelu górnego (zagęszczającego)



Rysunek 3: Przykładowa analiza densytometryczna próbki izolacji białek z mikropęcherzyków osocza w 10% żelu poliakrylamidowym.

Zasady BHP

1. Noś odzież ochronną: fartuch, rękawiczki ochronne i okulary ochronne, przy wykonywaniu wszystkich czynności laboratoryjnych.
2. Nie dotykaj aparatu do elektroforezy w trakcie przeprowadzania rozdzału i podłączenia do zasilacza.

Literatura

- [1] Instrukcja do ćwiczeń z I Pracowni Fizycznej - *Wiskozymetr rotacyjny (M17)*
- [2] Instrukcja do ćwiczeń z I Pracowni Fizycznej - *Pomiar współczynnika lepkości cieczy metodą Stokesa (M16)*
- [3] *Elektroforeza – przykłady zastosowań*, praca zbiorowa pod redakcją Bogdana Walkowiaka i Violetty Kochmańskiej, s. 3-24, <http://www.biofizyka.p.lodz.pl/elektroforeza.pdf>
- [4] Lubert Stryer, Tymoczko John L., Berg Jeremy M., *Biochemia. Krótki kurs*. PWM. 2013