

AUTOR:
Ewa ZygmuntOPIEKUN:
prof. dr hab. Ewa Stępień

35

Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym

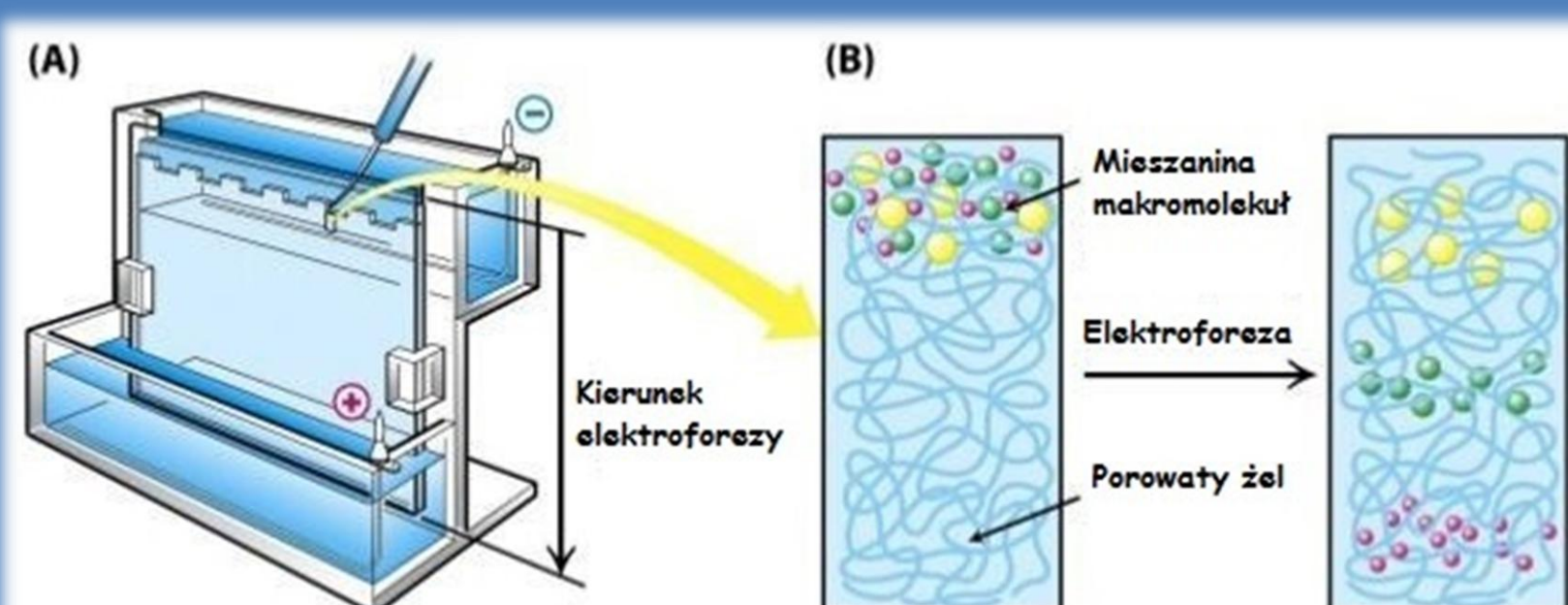
Elektroforeza białek

W technice laboratoryjnej jest to popularnie stosowana metoda badawcza. Stosuje się ją m. in. do rozdzielania biomolekuł, ocenienia, czy w składzie badanej mieszaniny znajdują się konkretne białka, do sprawdzania składu jakościowego badanych próbek oraz do badania ich czystości.

Elektroforeza - mechanizm

Elektroforeza to zjawisko polegające na ruchu obdarzonych ładunkiem molekuł w polu elektrycznym. Prędkość przemieszczania się zależy od ich wypadkowego ładunku, kształtu, masy, natężenie pola elektrycznego oraz lepkość środowiska - właściwość nośnika elektroforetycznego.

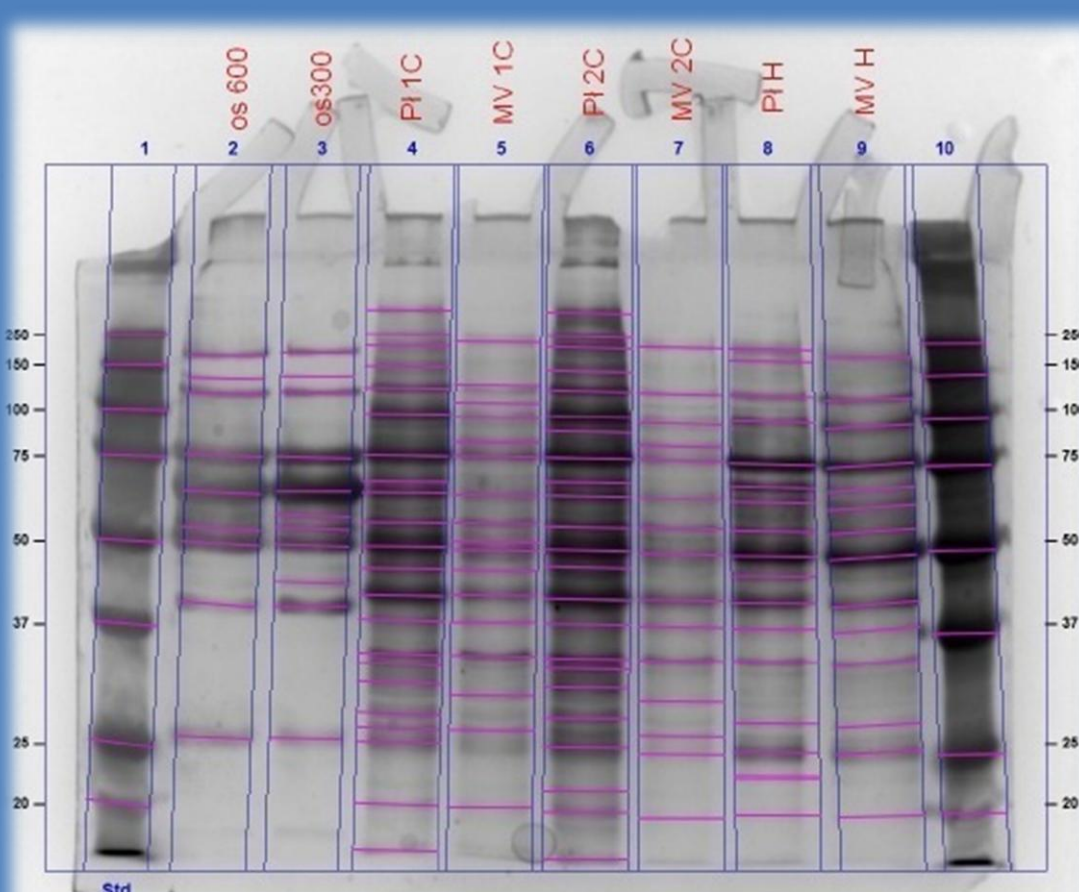
Żel poliakrylamidowy do elektroforezy białek wytwarza się poprzez polimeryzację akrylamidu i bisakrylamidu. Nośnik ten stabilizuje elektrolit oraz przez swoją porowatość pełni rolę „sita molekularnego” - mniejsze molekuły posiadające w żelu większą swobodę ruchu przemieszczają się szybciej, większe zaś migrują wolniej. Od proporcji składników żelu zależy jego gęstość oraz wymiary porów



Rysunek 1: Elektroforeza SDS-PAGE
Źródło: <https://docplayer.pl/51787200-Zastosowanie-chromatografii-do-preparacji-bialek.html>

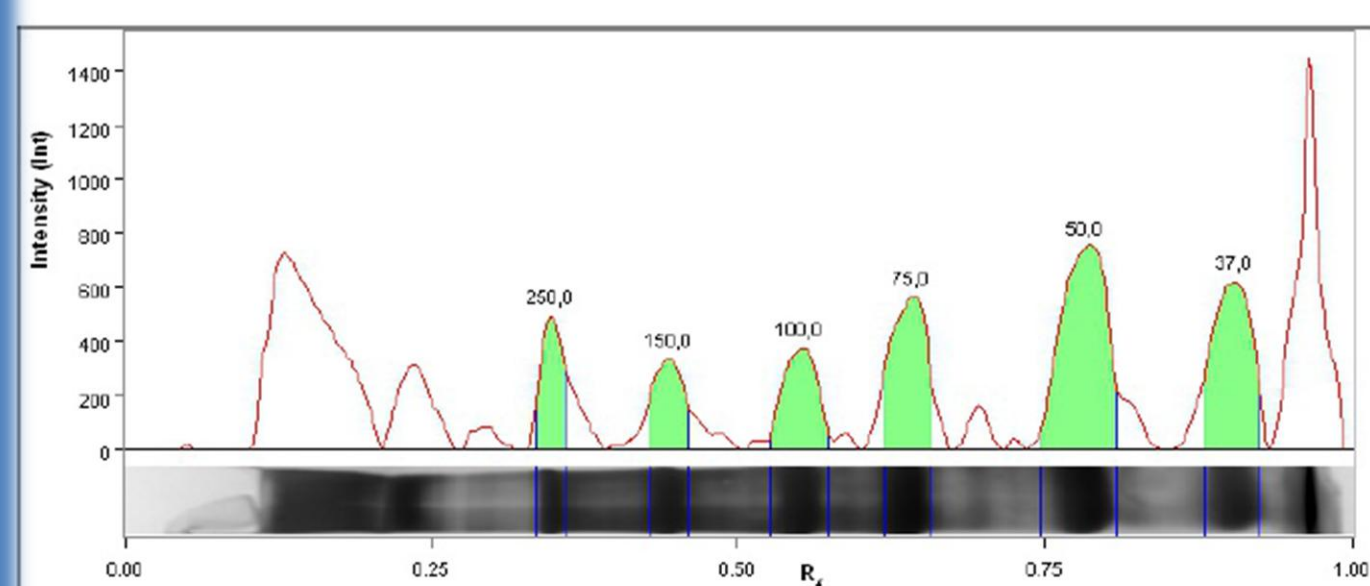
SDS - PAGE

Powszechnie stosowaną techniką do analizy białek ze względu na masę jest SDS-PAGE (SDS - poliacrylamide gel electrophoresis) w warunkach denaturujących (denaturacja termiczna). Dodecylsulfian sodu (SDS) niszczy wiązania decydujące o przestrzennej strukturze molekuły białka oraz wiąże się z jego łańcuchami głównymi w sposób proporcjonalny do masy, dzięki czemu ładunek elektryczny oraz kształt białka nie wpływają na otrzymane wyniki.

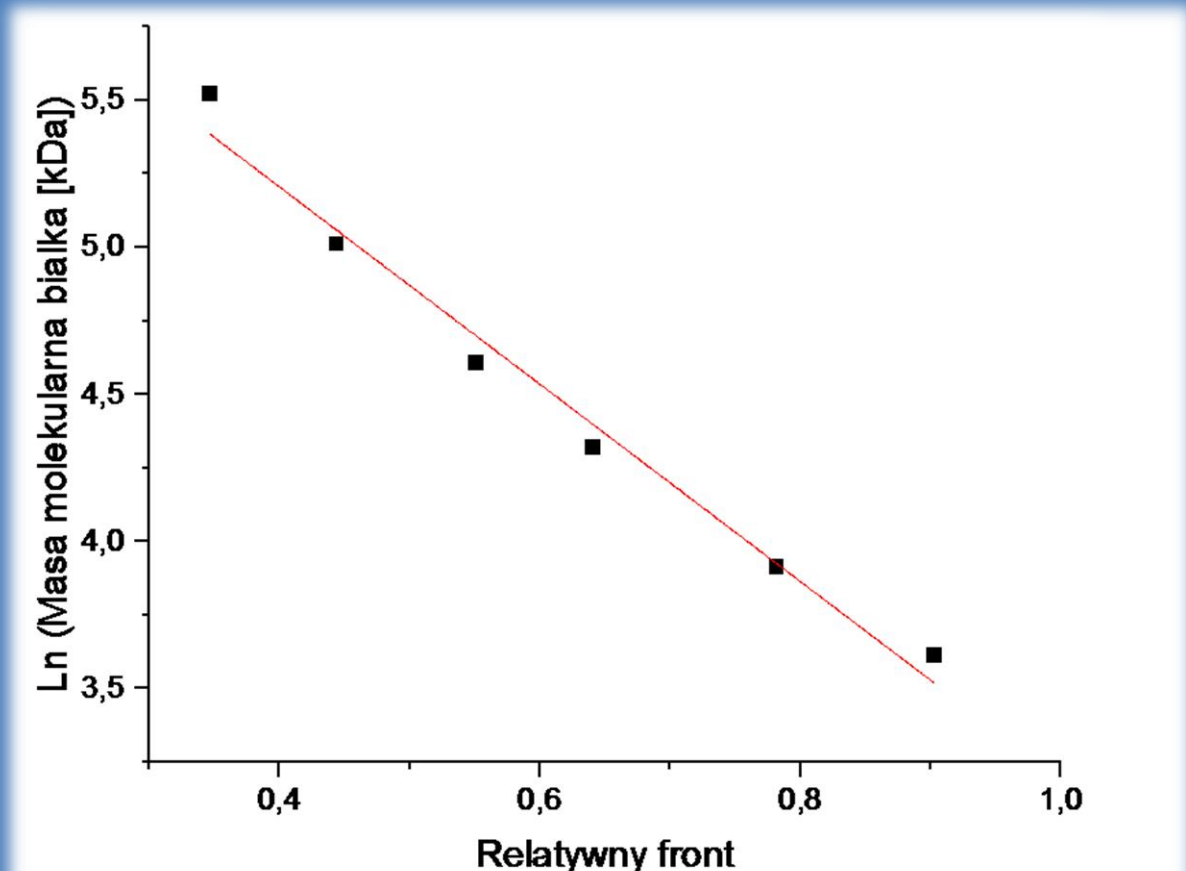


Rysunek 2: Zdjęcie żelu 8% wybarwionego metodą Coomassie Blue.
Źródło: Materiały udostępnione przez p. prof. dr hab. Ewę Stępień

Lane 1 - Bio-Rad Precision Plus



Rysunek 3: Przykładowa analiza densytometryczna (dla standardu białkowego)
Źródło: Materiały udostępnione przez p. prof. dr hab. Ewę Stępień



Rysunek 4: Przykładowa krzywa standardowa dla ruchliwości elektroforetycznej standardu

Wyniki eksperymentu

Otrzymany żel po procesie elektroforezy poddaje się barwieniu, następnie analizie (np. w programie ImageLab). Wyniki uzyskane za pomocą powyższej techniki są dość proste do interpretacji. Dodatkowym białkiem poddanym elektroforezie jest standard białkowy („Precision Plus Protein standards”), na podstawie którego przy pomocy programu identyfikowane są masy białek. Na podstawie analizy krzywej standardowej dla ruchliwości elektroforetycznej standardu białkowego identyfikuje się badane próbki.

Literatura

- [1] Szczegółowa instrukcja ćwiczenia Z48, II Pracownia Fizyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego
- [2] <http://labolatoria.net/arttykul/15601.html>