



Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym

Aleksandra Banasik

Opiekun naukowy: dr hab. prof. UJ Ewa Stępień

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

ABSTRAKT

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym jest użyteczną i powszechnie stosowaną metodą rozdzielania i charakterystyki białek. Jest to stosunkowo prosta i szybka technika. Znajduje wiele zastosowań we współczesnych badaniach, celem ćwiczenia było przeprowadzenie elektroforezy białek na żelu poliakrylamidowym przy stałym napięciu. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzony był dla: albuminy, kazeiny oraz białek z bakterii Escherichia coli, a żele zostały wybarwione błękitem Coomassie. Dokonano porównania obliczenia mas molowych wykrytych białek dla metody z użyciem wyznaczonej krzywej kalibracyjnej oraz przy wykorzystaniu programu analizującego żele-ImageLab.

PODSTAWY FIZYCZNE

Elektroforeza jest procesem polegającym na migracji cząsteczek w polu elektrycznym w zależności od posiadanego ładunku. Prędkość przemieszczania się naładowanej cząsteczki zależy od jej ładunku, kształtu, masy, przyłożonego pola elektrycznego oraz właściwości nośnika. Na cząsteczkę w procesie elektroforezy działa siła pochodząca od pola elektrycznego:

$$F_E = qE,$$

gdzie: q – ładunek cząstki, E – natężenie pola elektrycznego

Siła ta powoduje ruch cząstki, któremu przeciwdziałła siła lepkości środowiska:

$$F_l = 6\pi r v \eta$$

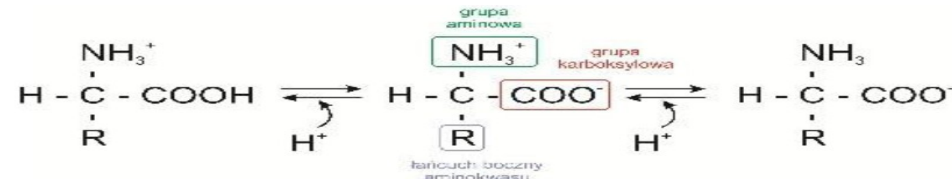
gdzie: r – promień cząstki, v – prędkość cząstki, η – współczynnik lepkości.

Cząstka porusza się ruchem jednostajnym z prędkością v . Często określa się wielkość zwaną ruchliwością elektroforetyczną cząstki. Wyraża się ona wzorem:

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

Ze wzoru wynika, że szybkość migracji jest proporcjonalna do ładunku cząstki, natomiast maleje wraz ze wzrostem wielkości cząstki oraz lepkości.

PODSTAWOWE INFORMACJE NA TEMAT BIAŁKA I NOŚNIKÓW ELEKTROFORETYCZNYCH



W doświadczeniu wykonywano elektroforezę białek. Występują one we wszystkich żywych organizmach. Zbudowane są z reszt aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi -CONH-. Każde białko zbudowane jest z 20 aminokwasów, posiada określoną masę, ładunek oraz kształt.

Rozdziały elektroforetyczne są prowadzone w nośniku elektroforetycznym wypełnionym odpowiednim elektrolitem. Od rodzaju

nośnika zależy wynik procesu elektroforezy. Nośnik stabilizuje elektrolit oraz dzięki porowatej strukturze powoduje lepszą separację cząstek.

Działa on analogicznie do sita, małe cząstki przechodzą przez pory żelu i poruszają się dalej natomiast duże cząstki nie mieszczą się w porach i zostają zatrzymane. Najczęściej stosuje się żele agarozowe i poliakrylamidowe ponieważ tworzą duże pory umożliwiające przechodzenie dużych cząstek. Ponadto żele poliakrylamidowe są trwalsze i łatwo się otrzymuje.

Rysunek 1: Budowa i stopień jonizacji aminokwasu w zależności od pH roztworu.
Źródło: <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/budowa-bialka>

APARATURA DO ELEKTROFOREZY

Układ doświadczalny składa się z komory elektroforetycznej do przeprowadzania rozdziału, płytek podstawowych i nakrywkowych, grzebieni formujących wpuklenia na próbki oraz z okienek stabilizujących płytki.



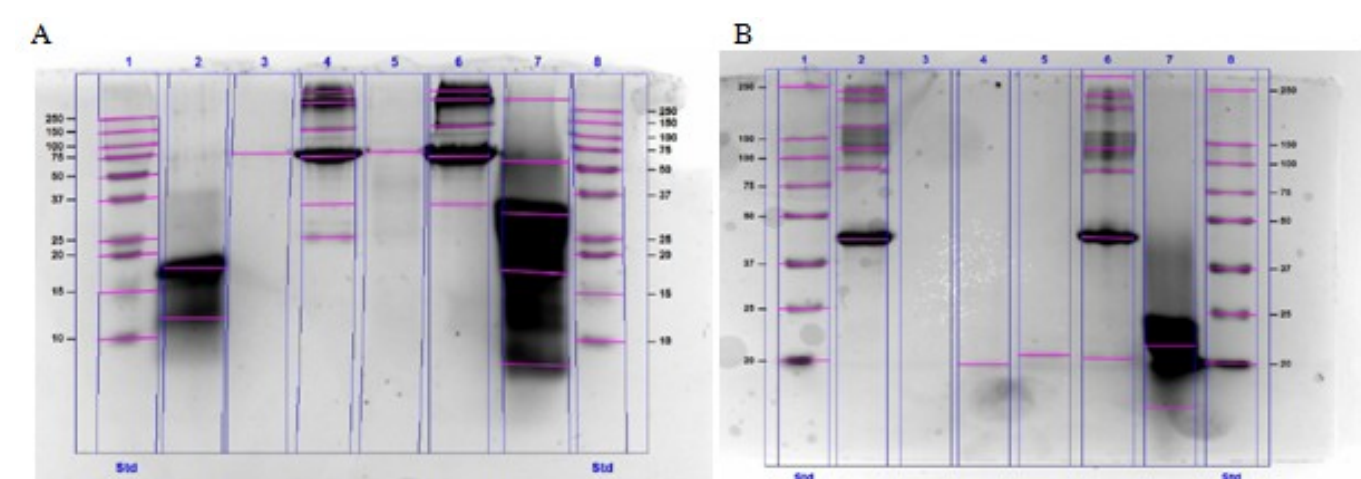
Rysunek 2. Aparatura do elektroforezy
Źródło: http://www.a-biotech.pl/tl_files/a-biotech/produkty/

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 różnią się od siebie. Przyczyną tego są najprawdopodobniej różne warunki przygotowywania standardu białkowego (na podstawie którego wyznaczono krzywą kalibracyjną) oraz białek, drugim znaczącą przyczyną różnic może być algorytm, według którego pracuje program do analizy. Na różnice wyznaczonych mas wpływ mogły mieć również obecne zanieczyszczenia

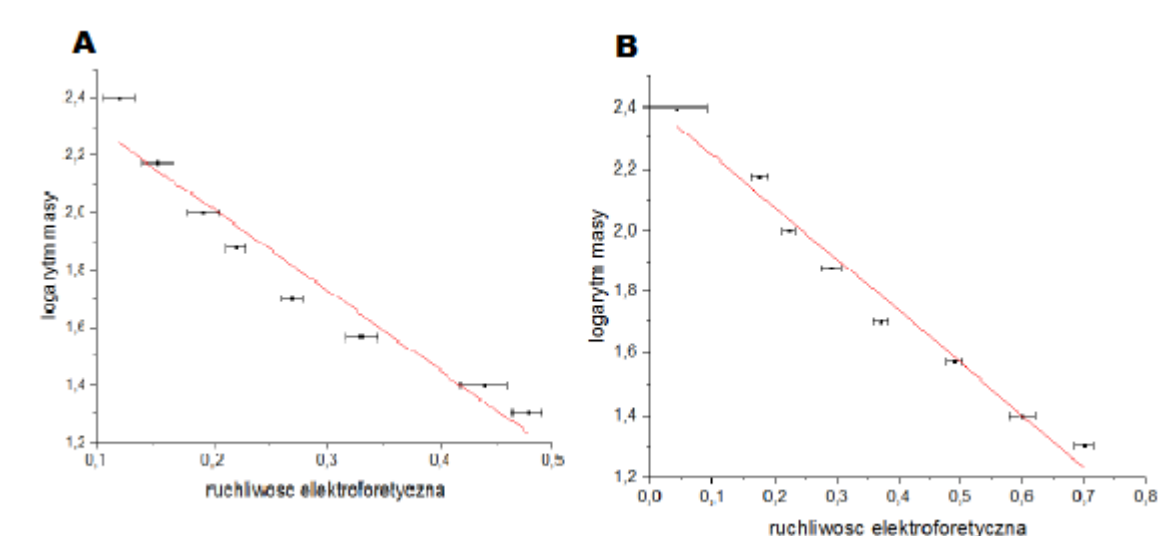
ANALIZA I WYNIKI

Analiza otrzymanych żeli polega na zmierzeniu odległości przebytych przez substancje rozdzielane oraz dystansu przebytego przez czoło elektroforezy. Stosunek tych dwóch wielkości definiowany jest ruchliwością elektroforetyczną R_f . Do analizy otrzymanych żeli użyto urządzenia Gel Doc System, który wykrył widoczne linie, zaznaczył je oraz wyliczył ich ruchliwość elektroforetyczną. Na podstawie wygenerowanych przez program danych utworzono wykres zależności $\ln(MW)$ (Molecular weight) od R_f dla próbki wzorcowej. Następnie dopasowano prostą, której parametry wykorzystano do obliczenia masy badanych białek.



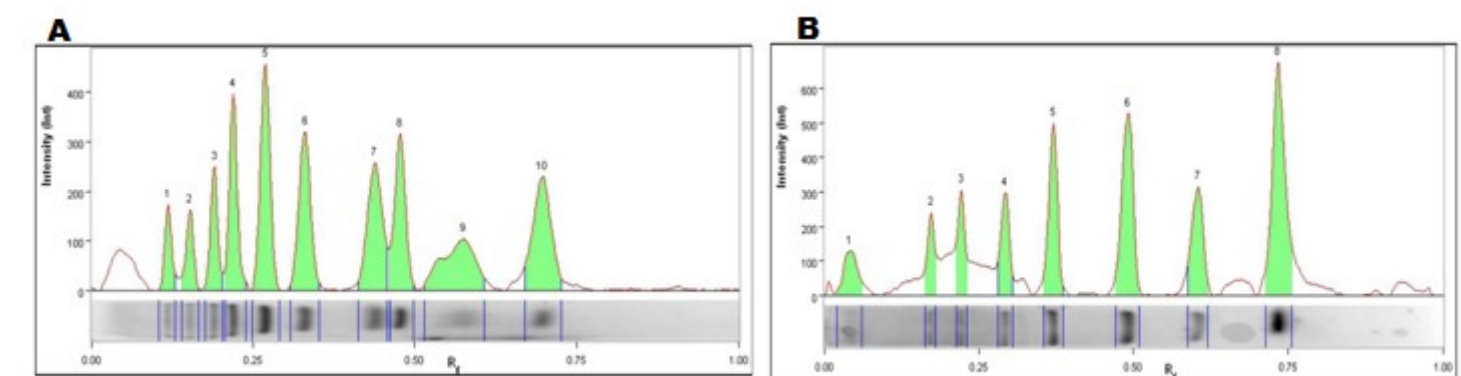
Rysunek 3. Wyniki pomiarów dla żelu A—15% , B—8% . Zdjęcia żeli wybarwionych Coomassie Blue.

Sporządzono zależność względnej ruchliwości od logarytmu masy białek markerowych. Do punktów pomiarowych dopasowano prostą, której parametry wykorzystano do obliczenia masy badanych białek.



Rysunek 4. Wykresy logarytmu masy molowej białek w zależności od ruchliwości dla standardu białkowego wraz z dopasowaną krzywą: A - żel 15%, B - żel 8%.

Z uzyskanego wykresu lub równania regresji odczytano m.c. badanego białka. Krzywej kalibracyjnej masy nie jest idealnie prostoliniowa. Może to być spowodowany tym, że prążki są praktycznie niewidoczne a zaznaczone przez program obszary równie dobrze mogą być zanieczyszczeniem a nie próbka białka



Rysunek 5. Densytogram dla standardu białkowego (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards): A - żel 15% , B - żel 8%

Wyznaczone równanie krzywej pozwala na obliczenie mas molowych pozostałych białek, a co za tym idzie na ich identyfikację.

Nazwa białka	Masa teoretyczna wyliczona na podstawie elektroforezy [kDa]		Masa podana przez producenta próbek [kDa]
	Żel 15 %	Żel 8 %	
Trypsyna	-	21,7	24
	-	20,1	
E. coli	43,8	31,4	30
Proteaza	-	-	18
Albumina	71,4	69,4	66
	74,3	75,6	

Tabela 1. Wyniki przeprowadzonej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym

LITERATURA

- [1] instrukcja ćwiczenia Z48, II Pracownia Fizyczna Uniwersytet Jagielloński
- [2] <http://dolinabiotechnologiczna.pl/przydatnosc-diagnostyczna-elektroforezy->