

ELEKTROFOREZA BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM

Spis treści

1.	Wprowadzenie teoretyczne	2
1.1.	Co to jest elektroforeza	2
1.2.	Parametry elektryczne	2
1.3.	Podstawowe informacje na temat białek	3
1.4.	Rodzaje nośników elektroforetycznych	3
1.5.	Przykładowe obrazy żeli PAGE	4
2.	Układ doświadczalny	5
2.1.	Opis aparatury do elektroforezy	5
2.2.	Odczynniki zużywalne	6
2.3.	Materiały zużywalne	7
2.4.	Sprzęt laboratoryjny	7
3.	Wykonanie elektroforezy:	7
3.1.	Przygotowanie odczynników do elektroforezy	7
3.2.	Przygotowanie żelu dolnego	8
3.3.	Przygotowanie żelu górnego	8
3.4.	Przygotowanie buforu do próbek	8
3.5.	Przygotowanie próbek	9
3.6.	Montowanie zestawu do elektroforezy	9
3.7.	Wykonanie rozdziału elektroforetycznego białek	9
4.	Barwienie żel poliakrylamidowych azotanem srebra	10
4.1.	Materiały zużywalne	10
4.2.	Odczynniki zużywalne	10
4.3.	Sprzęt laboratoryjny	10
4.4.	Naczynia laboratoryjne	10
4.5.	Wykonanie barwienia	10
4.6.	Problemy-rozwiązanie przy barwieniu azotanem srebra	11
5.	Barwienie żeli poliakrylamidowych Coomassie Blue	12
5.1.	Materiały zużywalne	12
5.2.	Odczynniki zużywalne	12
5.3.	Sprzęt laboratoryjny	13
5.4.	Naczynia laboratoryjne	13
5.5.	Wykonanie barwienia	13
6.	Załączniki	13
7.	Literatura	14

Spis ilustracji

Rysunek 1: Budowa i stopień jonizacji aminokwasu w zależności od pH roztworu. Źródło: http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/budowa-bialek	3
Rysunek 2. Przykład elektroforezy białek osocza w żelu poliakrylamidowym (PAGE-SDS). Żele barwione metoda srebrową	4
Rysunek 3. Zestaw do elektroforezy wertykalnej (Bio-Rad, Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems).....	5
Rysunek 4 Kasetka z komory do umieszczania żeli.....	5
Rysunek 5. Elementy stojaka do wylewania żeli na płytkach do elektroforezy.	6
Rysunek 6. Zasilacz do zestawu do elektroforezy.	6
Rysunek 7. Schemat żelu do elektroforezy (1)	8
Rysunek 8. Schemat numerowania studzienek w żelu.....	9

1. Wprowadzenie teoretyczne

1.1. Co to jest elektroforeza

Terminem elektroforeza określa się zjawisko migracji cząstek lub cząsteczek w polu elektrycznym w zależności od posiadanego ładunku. Elektroforeza jako technika rozdzielania substancji została zainicjowana przez Arne Tiseliusa w 1937 roku. Po umieszczeniu w rurce między roztworem buforów mieszaniny białek surowicy i po przyłożeniu pola elektrycznego zaobserwował, że składniki próbki migrują w kierunku i z szybkością jaka zależała od ich ładunku oraz właściwości jakie nazwał ruchliwością. Za tę pracę A. Tiselius dostał nagrodę Nobla w 1948 roku z Chemii *"for his research on electrophoresis and adsorption analysis, especially for his discoveries concerning the complex nature of the serum proteins"*.

Na cząstkę o ładunku elektrycznym q znajdującą się w polu elektrycznym o natężeniu E działa siła $F_e = qE$. Siła ta powoduje ruch cząstki (zgodnie z II ZDN – jednostajnie przyspieszony). Jednak ruchowi temu przeciwdziała siła lepkości środowiska (oporu), która dla cząstki kulistej może być opisana wzorem Stokesa: $F_{op} = 6\pi r v \eta$. W związku z tym, po chwili cząstka zaczyna

poruszać się ruchem jednostajnym z prędkością $v = \frac{qE}{6\pi r \eta}$. W praktyce laboratoryjnej stosuje się jednak zazwyczaj wielkość zwaną ruchliwością elektroforetyczną U , tj. $U = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r \eta}$

Łatwo zauważyć, iż ruch cząsteczki zależy od parametrów środowiska oraz parametrów cząsteczki. Do parametrów środowiska zaliczamy: różnicę potencjałów, natężenie prądu, pH środowiska, temperaturę oraz przewodnictwo i lepkość roztworu. Najczęściej podczas elektroforezy staramy się zachować je wszystkie stałe. Wówczas ruch cząsteczki zależy tylko od jej ładunku oraz jej rozmiaru i geometrii, a także masy (w przypadku elektroforezy żelowej).

Elektroforezę możemy podzielić ze względu na:

- rodzaj nośnika (np. bibułowa, żelowa, gradientowa, kapilarna)
- rodzaj stosowanego prądu (np. pulsacyjna, stałonapięciowa)
- ze względu na rozdzielną materiał (związki drobnocząsteczkowe: aminy, amidy, barwniki, makromolekuły: białka, RNA, DNA). Dokładny opis i przykłady zastosowań znajdują się w materiałach uzupełniających [1].

W naszym doświadczeniu będziemy wykonywać elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym przy stałym napięciu.

1.2. Parametry elektryczne

Zjawisko elektroforezy zachodzi dzięki obecności pola elektrycznego. Siła, z jaką pole to oddziałuje na ładunek elektryczny jonu jest proporcjonalna do natężenia tego pola (E [V/m]), a ta

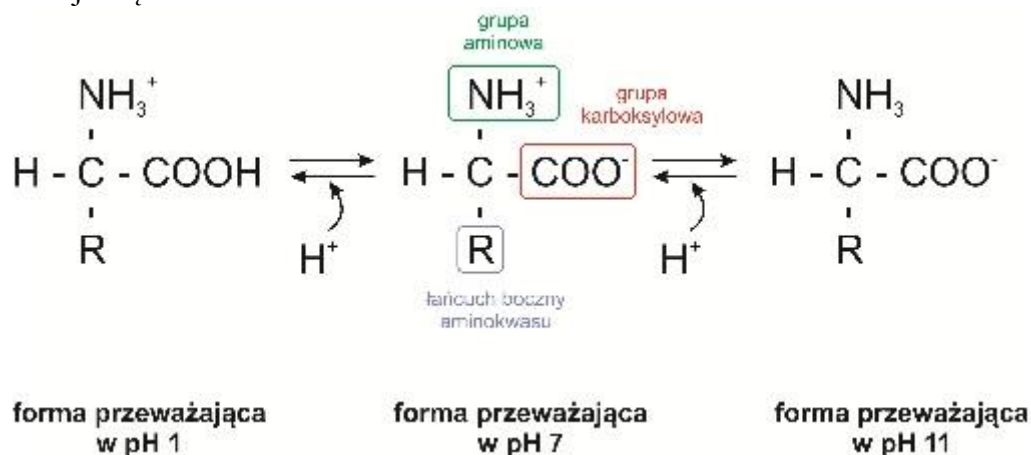
wielkość jest z kolei proporcjonalna do napięcia U [V] przyłożonego do elektrod. W zakresie niskich sił jonowych istnieje prosta relacja wynikająca z prawa Ohma regulująca zależność pomiędzy przyłożonym napięciem U , a płynącym w wyniku tego prądem I [A] oraz oporem elektrycznym (rezystancją) R [Ω] elektrolitu: $V = I \cdot R$.

Podczas przepływu prądu elektrycznego, w wyniku wykonywania pracy przeniesienia ładunku elektrycznego przez pole, na opornościach obwodu tracona jest moc P [W]. Pracy tej towarzyszy wydzielanie się ciepła, zwanego ciepłem Joule'a. Ilość wydzielonego ciepła Q [J] można obliczyć korzystając z równania: $Q = U \cdot I \cdot t$. Oczywiście ciepło to jest wydzielane na wszystkich oporach obwodu, ale największy udział w tym zjawisku posiada elektrolit. Zasilacze stosowane do elektroforezy zwykle mogą utrzymywać stałą wartość jednego z parametrów: prądu I , napięcia U lub mocy P . Dla pozostałych parametrów ustala się tylko górny limit wartości.

W ciągu trwania elektroforezy oporność elektrolitu ulega zmianom - zwykle obniża się ze wzrostem temperatury wynikającym z ciepła Joule'a. W zależności od składu elektrolitu oraz wyboru stabilizowanego parametru obserwuje się wzrost lub spadek ilości wydzielanego ciepła. I tak przy stałym prądzie wzrasta oporność układu i wraz z tym wzrasta ilość wydzielanego ciepła. Układ wymaga aktywnego odprowadzania ciepła. Z drugiej strony, gdy stabilizowane jest napięcie, ze wzrostem oporu następuje ograniczenie prądu, a w ślad za tym spadek ilości oddawanego ciepła. Układ nie wymaga termostatowania, ale znacznie wydłuża się czas trwania elektroforezy.

1.3. Podstawowe informacje na temat białek

Białka są podstawowym składnikiem organizmów żywych i pełnią rolę budulcową oraz funkcjonalną. Są one zbudowane z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi. Pojedynczy aminokwas jest zbudowany z grupy karboksylowej, aminowej, atomów wodoru oraz charakterystycznej dla danego aminokwasu grupy R , zwanej łańcuchem bocznym. Wszystkie powyższe wiążą się kowalencyjnie z pierwszym atomem węgla, określanym jako węgiel (alfa). Ze względu na obecność grupy aminowej i karboksylowej w roztworze o pH obojętnym aminokwasy występują zazwyczaj w formie zjonizowanej, jako jony obojętne - amfolyty (grupa aminowa NH_3^+ oraz karboksylowa COO^-). Stan ten można regulować poprzez zmianę pH - następuje wtedy zmiana jonizacji cząsteczki.



Rysunek 1: Budowa i stopień jonizacji aminokwasu w zależności od pH roztworu.

Źródło: <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/budowa-bialek>

Znanych jest 22 aminokwasów, których łańcuchy boczne różnią się budową, ładunkiem elektrycznym, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz reaktywnością chemiczną. Każde białko, ze względu na liczbę i rodzaj aminokwasów, z których jest zbudowane, posiada określoną masę, ładunek oraz kształt, tzw. strukturę 2-go i 3-cio rzędową.

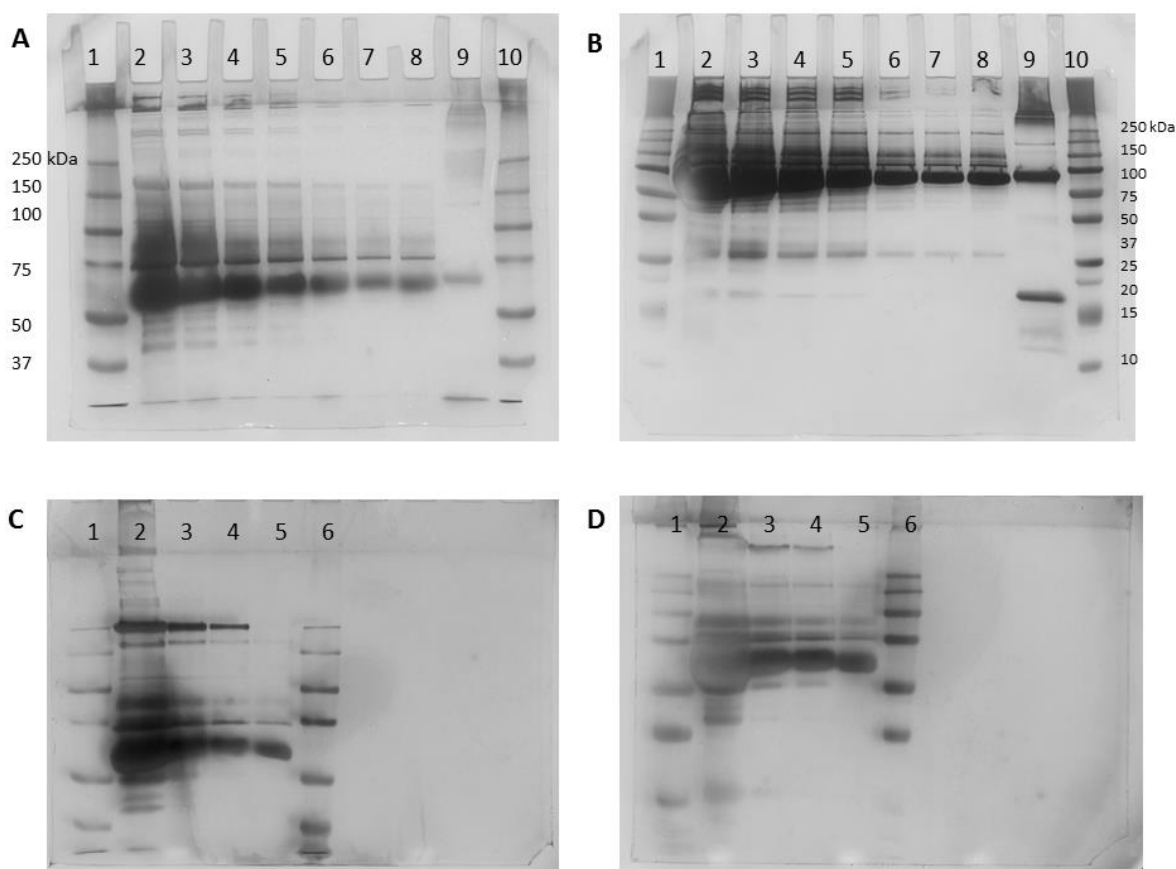
1.4. Rodzaje nośników elektroforetycznych

Rozdziały elektroforetyczne mogą być prowadzone bezpośrednio w objętości elektrolitu, lub w nośniku elektroforetycznym wypełnionym odpowiednim elektrolitem. W tym drugim przypadku nośnik elektroforetyczny (bibuła filtracyjna, octan celulozy, agaroza, skrobia, krzemionka,

poliakrylamid i inne) nie tylko stabilizuje elektrolit (m.in. poprzez tłumienie prądów konwekcyjnych), ale często przyczynia się do lepszej separacji makrocząsteczek; efekt sita molekularnego - cząsteczki, których rozmiary są małe w porównaniu z porami żelu łatwo w nim wędrują, natomiast cząsteczki znacznie większe od porów są prawie nieruchome. W tym celu stosuje się porowate nośniki takie jak: agarozę i poliakrylamid (PAGE). Nośniki te są chemicznie obojętne i łatwo się je otrzymuje poprzez polimeryzację (poliakrylamid) lub żelifikację.

Do przeprowadzenia rozdzielania elektroforetycznego białek ze względu na masę cząsteczkową (a nie ładunek), stosuje się elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. W tym celu mieszaninę białek rozpuszcza się w roztworze dodecylosiarczanu sodu (SDS). Aniony tego detergentu wiążą się w stałych proporcjach z łańcuchami głównymi białka nadając powstałemu kompleksowi duży **ujemny** ładunek wypadkowy – proporcjonalny do masy białka i zazwyczaj znacznie większy niż ładunek natywnego białka, który staje się tym samym nieistotny.

1.5. Przykładowe obrazy żeli PAGE



Rysunek 2. Przykład elektroforezy białek osocza w żelu poliakrylamidowym (PAGE-SDS). Żele barwione metoda srebrową

A. żel 8%; **B.** żel 15%; **C.** żel 8%; **D.** żel 10%

A, B. Ścieżki 1,10 – standard białek (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) -2μl

A,B. Ścieżki 2-8 przedstawiają rozdzielanie elektroforetyczne białek ludzkiego osocza rozcieńczonego w PBS-ie w stosunku 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80, 1:100 i 1:120 (nałożone w następującej kolejności rozpoczynając od 2 studzienki), natomiast ścieżka 9 przedstawia rozdzielanie mieszaniny Albumina-Inhibitor trypsyny-PBS (stosunek 1:1:2).

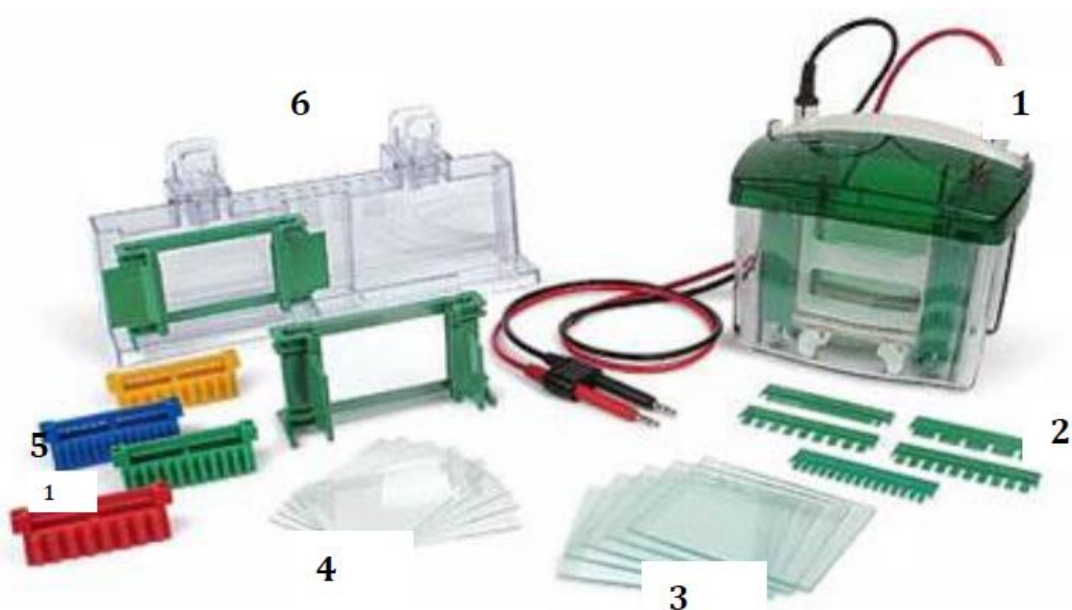
C,D. Ścieżki 1,8- standard białek (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) -2μl

C,D. Ścieżki 2-5 przedstawiają rozdzielanie elektroforetyczne białek ludzkiego osocza rozcieńczonego w PBS-ie w stosunku 1:10, 1:80, 1:100 i 1:150 (nałożone w następującej kolejności rozpoczynając od 2 studzienki).

A,B,C,D. Próbkę nakładano w objętości 20μl na dołek (10μl rozcieńczonego osocza+10μl buforu do próbek)

2. Układ doświadczalny

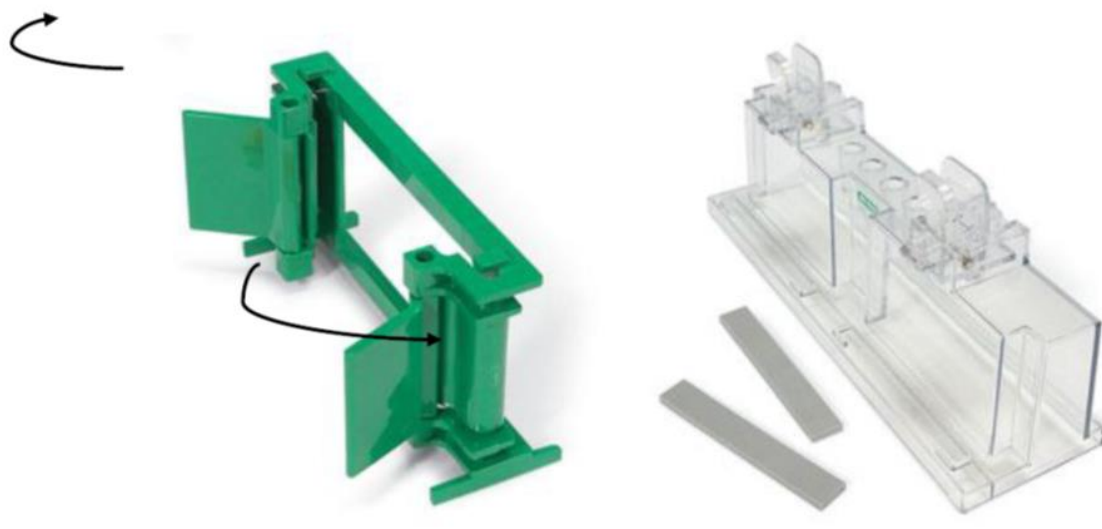
2.1. Opis aparatury do elektroforezy



Rysunek 3. Zestaw do elektroforezy wertykalnej (Bio-Rad, Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems).

1. Komora do przeprowadzania rozdziału elektroforetycznego wraz z kablami zasilającymi, 2. Grzebienie, które służą do utworzenia dołków w żelu poliakrylamidowym, 3. Płytki podstawowe z przerwą 1mm, 4. Płytki nakrywkowe, 5. Przegrody ułatwiające wprowadzanie białek do studzienek, 6. Stojak i „okienka” do przygotowywania żeli.

Przed wykonaniem żeli, szkiełka należy dokładnie umyć w wodzie z detergentem i odtłuścić alkoholem (70% etanol). W okienkach (6) umieszcza się założone na siebie płytkę podstawową i nakrywkową (płytkę podstawową znajduje się od strony stojaka, natomiast przed nią znajduje się płytkę nakrywkową). W celu eliminacji ryzyka wypłynięcia żelu, okienka montuje się na stole, tak aby dolne krawędzie płytek równo stykały się z powierzchnią stołu. Dociska się je poprzez „otwarcie okienka” jak na rysunku poniżej. Całość montuje się na stojaku na gumowych paseczkach, zapobiegającym wypływowi żelu. W tak ustawionym układzie można rozpocząć przygotowanie żeli. Przed przystąpieniem do montowania aparatu i przygotowania żeli zalecane jest obejrzenie filmu edukacyjnego [2].



Rysunek 4. Elementy stojaka do wylewania żeli na płytkach do elektroforezy.

Po lewej stronie przedstawiono „okienko” do umieszczania płytek. Po prawej stronie znajduje się dwustanowiskowy stojak do przygotowywania żeli.

W komorze do rozdzielania elektroforetycznego warto wyróżnić dwie kasetki do montowania żeli (Rysunek 5). Płytki z żelom umieszczają się w szczelinie pomiędzy białym wnętrzem a zielonymi, ruchomymi elementami.



Rysunek 5. Kasetka z komory do umieszczania żeli.

Po lewej stronie znajduje się przykład kasetki zamkniętej, po prawej otwartej.

Całość zestawu zasilana jest przy pomocy zasilacza, którego obsługa jest bardzo intuicyjna.



Rysunek 4. Zasilacz do zestawu do elektroforezy.

2.2. Odczynniki zużywalne

1. Woda destylowana
2. Woda demineralizowana
3. 96% Alkohol etylowy skażony (Lineal Chemicals, nr kat. LL-00012)
4. 40% Akrylamid (Bio-Rad, nr kat. 1610140)
5. 2% Bisakrylamid (Bio-Rad, nr kat. 1610142)
6. 10% SDS (Bio-Rad, nr kat. 1610416)
7. TEMED (Bio-Rad, nr kat. 1610800)
8. 10% Nadsiarczan amonu (APS) (Bio-Rad, nr kat. 161-0700)
9. 1,5 M Bufor Tris-HCl, pH 8,8 (Bio-Rad, nr kat. 1610798)
10. 0,5 M Bufor Tris-HCl, pH 6,8 (Bio-Rad, nr kat. 1610799)
11. Laemmli bufor obciążający do próbek (Bio-Rad, nr kat. 161-0737)
Bufor obciążający do próbek zawiera 65.8 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.1% SDS, 26.3% (w/v) glicerol, 0.01% błękit bromofenolowy
12. β -merkaptetanol (Bio-Rad, nr kat. 161-0710)

13. Bufor do elektroforezy - 10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad, nr kat. 161-0732)
Bufor do elektroforezy po 10-krotnym rozcieńczeniu w wodzie demineralizowanej zawiera 25 mM Tris, 192 mM glicynę i 0,1% SDS. pH buforu wynosi 8.3
14. Standard masowy białek (tzw. drabinka) - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, nr kat.1610374)
15. Lodowaty kwas octowy

2.3. Materiały zużywalne

1. Końcówki do pipet automatycznych o objętości 10µl, 200µl, 1000µl, 5ml
2. Probówki typu Falcon o objętości 50ml
3. Eppendorfy o objętości 1,5ml

2.4. Sprzęt laboratoryjny

1. Pipety automatyczne na 10µl, 200µl, 1000µl, 5ml
2. Worteks
3. Wyrząsarka
4. Waga elektroniczna

UWAGA!

Poliakrylamid w postaci ciekłej jest substancją neurotoksyczną dlatego należy zachować odpowiednie warunki bezpieczeństwa. Przed przygotowaniem roztworów należy ubrać fartuch laboratoryjny, rękawiczki gumowe oraz okulary laboratoryjne a cała procedura powinna być wykonana pod dygestorium

3. Wykonanie elektroforezy:

3.1. Przygotowanie odczynników do elektroforezy

1. Obejrzyj film edukacyjny [2] https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4
2. Na wadze analitycznej odważ 0,1 g APS, a następnie rozpuść go w 1ml wody demineralizowanej.
3. W celu uzyskania 30ml 30% roztworu akrylamidu mix, pod dygestorium wymieszaj 22,5ml 40% akrylamidu i 7,5ml 2% bisakrylamidu.
- 4.

Tab.1. Skład żelu rozdzielającego 8% i 15% o objętości 10ml (ilość wystarczająca na dwa żele)

Odczynnik	Żel 8%	Żel 15%
Woda demineralizowana	4,6ml	2,3ml
30% roztwór akrylamidu mix	2,7ml	5,0ml
1,5M Tris-HCl, pH 8.8	2,5ml	2,5ml
10% SDS	0,1ml	0,1ml
10% APS	0,1ml	0,1ml
TEMED	0,006ml	0,004ml

Tab.2. Skład żelu zagęszczającego 5% o objętości 8ml (ilość wystarczająca na cztery żele)

Odczynnik	Żel 5%
Woda demineralizowana	5,5ml
30% roztwór akrylamidu mix	1,3ml
0,5M Tris-HCl, pH 6.8	1,0ml
10% SDS	0,08ml
10% APS	0,08ml
TEMED	0,008ml

3.2. Przygotowanie żelu dolnego

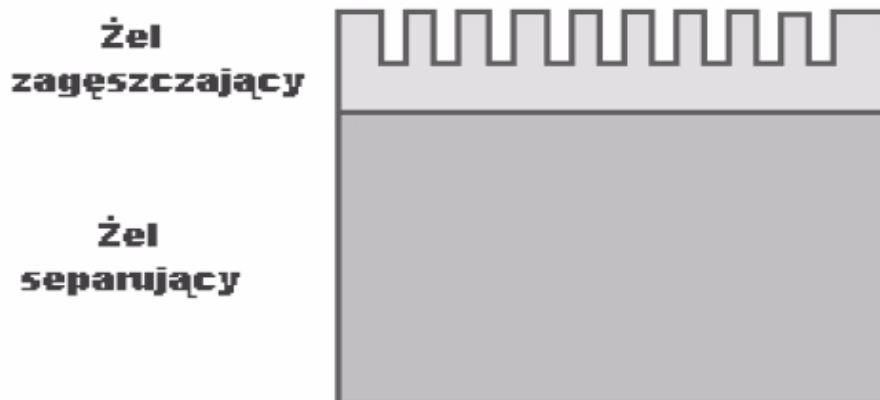
1. Wymyj płytki w wodzie z detergentem a następnie w alkoholu.
2. Załóż na siebie płytkę podstawową i nakrywkową, i umieść je w okienku, które należy zamontować w stojaku
3. Przygotuj żel rozdzielający o pożądanym stężeniu (stopniu polimeryzacji – tabela 1) i wprowadź między płytki 5ml przygotowanego roztworu.
4. Na wierzch żelu wprowadź wodę demineralizowaną, w celu usunięcia bąbli powietrza. Polimeryzacja trwa około 15-20 minut w temperaturze pokojowej.

3.3. Przygotowanie żelu górnego

1. Zlej wodę demineralizowaną z żelu dolnego, lekko osusz górną krawędź żelu (np. bibułą)
2. Wprowadź wcześniej przygotowany żel zagęszczający i włóż grzebień między płytki, w celu utworzenia studzienek. Prawidłowo wykonany żel powinien wyglądać jak na rysunku 7.

UWAGA!!!

Żel górny szybko polimeryzuje!



Rysunek 5. Schemat żelu do elektroforezy (1)

3.4. Przygotowanie buforu do próbek

W celu uzyskania buforu do próbek przygotuj w eppendorfie roztwór składający się z 950µl buforu Laemlii i 50µl β-merkaptioetanolu.

3.5. Przygotowanie próbek

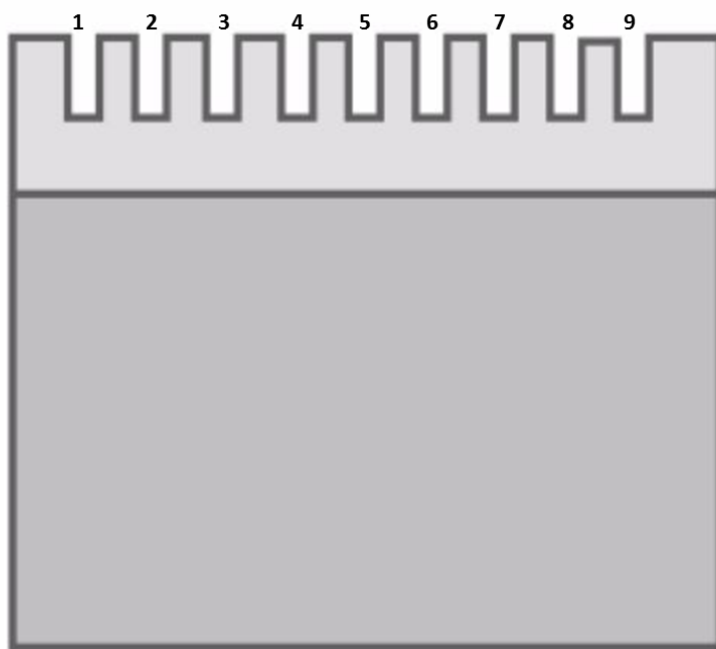
Przed przystąpieniem do przygotowania próbek obejrzyj film edukacyjny [3]

<https://www.youtube.com/watch?v=XUjLO-ek2C8>

1. Przygotuj próbki białek wykonując odpowiednie naważki w/g instrukcji prowadzącego
2. Zdenaturuj próbki białka w wodzie o temperaturze 100°C (2x10minut).
3. Gdy stężenie białka jest za wysokie rozcieńcz próbki w przefitrowanym PBSie bez jonów wapnia i magnezu.
4. Rozcieńcz przygotowane próbki białek buforem do próbek w stosunku próbka:bufor = 1:1.

3.6. Montowanie zestawu do elektroforezy

1. Zamontuj płytki szklane w kasetkach (holderach)
2. Przenieś zmontowane płytki do komory elektroforetycznej.
3. Wlej bufor do elektroforezy do wysokości uzależnionej od ilości wykorzystywanych kaset (1-dolna kreska, 2-górna kreska). Pomiędzy płytkami nalej bufor do samego końca.
4. Delikatnie usuń grzebień.
5. Nałóż po 20μl badanych próbek (do studzienek 2-9) na studzienkę oraz 1-2μl markeru (do studzienki 1 i 10).



Rysunek 6. Schemat numerowania studzienek w żelu.

6. Zamknij pokrywę i włącz elektroforezę.

Uwaga!!!

W przypadku pomiaru 1 lub 3 żeli po przeciwnej stronie żelu włożyć zaślepkę. Pomiar przy pomocy jednej kasetki (1 lub 2 żele) należy przeprowadzać w części podłączanej bezpośrednio do elektrod.

3.7. Wykonanie rozdziału elektroforetycznego białek

1. Włącz zasilacz (o jego działaniu informują pojawiające się w roztworze pęcherzyki).
2. Prowadź rozdział elektroforetyczny przy stałym napięciu $U=100$ V przez około pół godziny (do czasu osiągnięcia przez próbki żelu rozdzielającego).
3. Po osiągnięciu przez próbki żelu rozdzielającego, zmień wartość napięcia na 160V
4. Zatrzymaj elektroforezę, gdy front markera dojdzie do ok.0.5cm do końca płytki.

5. Wyłącz zasilanie.
6. Wyciągnij z kasetek płytki z żelami.
7. Delikatnie zsuń płytkę nakrywkową od podstawową i przenieś cały żel do szalki zawierającej utrwalacz.
8. Bufor do elektroforezy zlej do butelki szklanej, bufor można użyć 2 razy.

4. Barwienie żel poliakrylamidowych azotanem srebra

Przed przystąpieniem barwienia obejrzyj film edukacyjny [4]

<https://www.youtube.com/watch?v=b-1dXzU4iOw>

4.1. Materiały zużywalne

1. Końcówki do pipet automatycznych o objętości 5ml, 1000 μ l,
2. Pipety serologiczne o objętości 25ml

4.2. Odczynniki zużywalne

1. Woda demineralizowana
2. 96% etanol (Linegal Chemicals, nr kat. LL-00012)
3. 99,5-99,9% kwas octowy (POCH, nr kat.568760114)
4. 20% roztwór azotanu srebra 3 ml (POCH, nr kat. 814322777). Koncentrat wykonaj z wody demineralizowanej i przechowuj w ciemnej szczelnie zamkniętej butelce w temp. pokojowej.
5. Węglan sodu bezwodny (CZDA, odcz.FP, nr kat.810560119)
6. 36-38% Formaldehyd (POCH, nr kat.432173111)

4.3. Sprzęt laboratoryjny

1. Wytrząsarka z ustawianym rpm lub platforma bujana
2. Dygestorium
3. Waga elektroniczna
4. Pipety automatyczne

4.4. Naczynia laboratoryjne

1. Szalki szklane
2. Butelki szklane
3. Zlewki szklane

4.5. Wykonanie barwienia

1. Pod dygestorium przygotuj utrwalacz mieszając: 30 ml etanolu, 60 ml wody demineralizowanej i 10 ml lodowatego kwasu octowego
2. Po elektroforezie żel umieść w utrwalaczu (5 objętości żelu) na 4-12 godzin w temperaturze pokojowej pod dygestorium lub na dłużej w lodówce.
3. Przy użyciu pipetora zlej utrwalacz do butelki i 30% etanol (5 objętości żelu). Inkubuj żel przez 30 minut w temperaturze pokojowej przez cały czas wytrząsając na wytrząsarce (10 rpm, im mniej tym lepiej) lub platformie bujanej.
4. Powtórz krok 2.
5. Przy użyciu pipetora zlej etanol do butelki i dodaj wodę demineralizowaną (10 objętości żelu). Inkubuj żel przez 10 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce (10 rpm) lub platformie bujanej
6. Powtórz krok 5 4-krotnie
7. Przy użyciu pipetora usuń wodę demineralizowaną i dodaj 0,1% roztwór azotanu srebra (5 objętości żelu). Wykonaj świeży z 20% roztworu AgNO₃. Inkubuj żel w temperaturze pokojowej przez 30 minut stale wytrząsając na wytrząsarce (10 rpm) lub platformie bujanej

8. Przy użyciu pipetora usuń roztwór azotanu srebra, a następnie przepłukaj obie strony żelu wodą demineralizowaną przez 20 sekund
9. Pod dygestorium rozpuść 2,5g węglańu sodu (Na_2CO_3) w 100ml wody demineralizowanej (2,5% roztwór węglańu sodu), a następnie bezpośrednio przed dodaniem roztworu do żelu, dodaj do tego roztworu 250 μl 8% formaldehydu (0.02% roztwór formaldehydu).
10. Przy użyciu pipetora dodaj świeżo przygotowany roztwór 2,5% węglańu sodu i 0,02% formaldehydu (5 objętości żelu). Inkubuj żel w temperaturze pokojowej stale wytrząsając na wytrząsarce. Obserwuj żel, gdyż prążki pojawią się w ciągu kilku minut.
11. Gdy pojawią się dobrze widoczne prążki, usuń wyżej wymieniony roztwór i dodaj 1% kwasu octowego (5 objętości żelu) na kilka minut.
12. Usuń roztwór kwasu octowego i przepłukaj żel kilkakrotnie w wodzie demineralizowanej (10 minut) na wytrząsarce.

4.6. Problemy-rozwiązywanie przy barwieniu azotanem srebra

Problem	Możliwa przyczyna	Proponowane rozwiązanie
Szare tło	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zbyt długi czas wybarwiania 2. Niedokładne płukanie: <ol style="list-style-type: none"> a. mała objętość r-rów płuczających (pkt. 3.5.3-6) b. szybkie obroty wytrząsarki (pkt. 3.5.3-6) 3. Zanieczyszczona woda 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Skrócenie czasu wybarwiania 2. <ol style="list-style-type: none"> a. Zwiększ objętość r-rów płuczających b. zmniejszenie szybkość wytrząsania 3. Używaj tylko wody demineralizowanej
Żółte tło	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ekspozycja na światło podczas inkubacji z r-rem AgNO_3 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zakryj szalkę z żelem folią aluminiową lub grubym papierem. Chroń przed światłem.
Pozostałości białek w studzienkach	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gdy białko pozostaje w pojedynczych studzienkach: <ol style="list-style-type: none"> a. Nie skuteczna denaturacja białek 2. Gdy białko pozostaje we wszystkich studzienkach, a badamy różne białka: <ol style="list-style-type: none"> a. Elektroforeza nie zaszła 3. Gdy białko pozostaje we wszystkich studzienkach, a badamy jedno białko: <ol style="list-style-type: none"> a. Nie skuteczna denaturacja białek 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <ol style="list-style-type: none"> a. Sprawdź czy dodałeś SDS do próbek i 2-merkaptetanól, sprawdź warunki denaturacji (10 min 99°C) 2. <ol style="list-style-type: none"> a. Sprawdź czy w komorze do elektroforezy znajduje się bufor lub sprawdź skład buforu do elektroforezy 3. <ol style="list-style-type: none"> a. Sprawdź czy dodałeś SDS i 2-merkaptetanól, sprawdź warunki denaturacji (10 min 99°C)
Niewidoczny front elektroforezy	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zbyt długo prowadzona elektroforeza 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zatrzymać elektroforezę, gdy front markera będzie znajdował się 1-1,5cm od końca żelu

Słabo wybarwiony środek żelu	1. Nierównomierne płukanie żelu i barwienie	1. Zmniejszenie prędkości wytrząsania lub zastosuj platformę bujaną
Elektroforeza z tzn. „efektem uśmiechu” (szybszy rozdział elektroforetyczny próbek znajdujących się po środku żelu)	1. Środek żelu cieplejszy od skrajnych części	1. a. Sprawdź skład i zamień bufor do elektroforezy b. Sprawdź ustawione wartości napięcia: - rozdział elektroforetyczny w żelu zagęszczającym 100V - rozdział elektroforetyczny w żelu rozdzielającym 160V c. Kontrola czy pomiędzy żelami znajduje się odpowiednia ilość buforu
Nierównomierne tempo elektroforezy na całej długości żelu	1. Przeładowane próbki 2. Zbyt duże napięcie	1. Zmniejszenie ilości białka w próbce 2. Sprawdź ustawione wartości napięcia: a. rozdział elektroforetyczny w żelu zagęszczającym 100V, b. rozdział elektroforetyczny w żelu rozdzielającym 160V
Słabo rozdzielone prążki w żelu	1. Zbyt duża zawartość białka w próbce 2. Zanieczyszczenie próbek 3. Nieskuteczna denaturacja białek	1. Przygotuj próbki zawierające odpowiednie ilości białka: a. Dla metody z AgNO ₃ <20µg na studzienkę b. Dla metody Coomassie ~50µg na studzienkę 2. Przygotuj próbki unikając możliwych źródeł zanieczyszczenia próbki 3. Sprawdź czy dodałeś SDS do próbek i 2-merkaptoetanol, sprawdź warunki denaturacji (10 min 99°C)

5. Barwienie żeli poliakrylamidowych Coomassie Blue

5.1. Materiały zużywalne

1. Końcówki do pipet automatycznych o objętości 5ml, 1000µl,
2. Pipety serologiczne o objętości 25ml

5.2. Odczynniki zużywalne

1. Woda demineralizowana
2. 96% etanol (Linegal Chemicals, nr kat. LL-00012)
3. Lodowaty kwas octowy
4. Coomassie Brilliant Blue R250 (EM Science)

5.3. Sprzęt laboratoryjny

1. Wytrząsarka z ustawianym rpm lub platforma bujana
2. Dygestorium
3. Waga elektroniczna
4. Pipety automatyczne

5.4. Naczynia laboratoryjne

1. Szalki szklane
2. Butelki szklane
3. Zlewki szklane

5.5. Wykonanie barwienia

1. Pod dygestorium przygotuj utrwalacz mieszając: 30 ml etanolu, 60 ml wody demineralizowanej i 10 ml kwasu octowego
2. Po elektroforezie żel umieść w utrwalaczu (5 objętości żelu) na 4-12 godzin w temperaturze pokojowej pod dygestorium lub na dłużej w lodówce.
3. Odważ 0,25g Coomassie Blue
4. Przygotuj roztwór barwiący poprzez rozpuszczenie 0,25g Coomassie Blue w 10ml lodowatego kwasu octowego, 45ml wody i 45ml etanolu
5. Przy użyciu pipetora zlej utrwalacz do butelki i dodaj 5 objętości roztworu barwiącego. Inkubuj żel przez 30-60 minut w temperaturze pokojowej przez cały czas wytrząsając na wytrząsarce (10 rpm, im mniej tym lepiej) lub platformie bujanej.
6. Przy użyciu pipetora zlej barwnik i dodaj wodę demineralizowaną (10 objętości żelu). Inkubuj żel przez co najmniej 10 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce (10 rpm) lub platformie bujanej
7. Powtórz krok kilkakrotnie aż do pojawienia się niebieskich prążków.

6. Załączniki

Skład buforu SDS-PAGE o pH 8.3:

1x	10x	Związek	Stężenie w buforze 1x
3g	30.2g	TRIS	25mM
14,4g	144g	Glicyna	192mM
2g	20g	SDS	0,2% (lub 1g = 0.1%)
Uzupełnić do 1 litra	Uzupełnić do 1 litra	Woda	-

Bufor Laemmli 5x 1ml (w oparciu o Maniatis A8.42 Cell lysis 1x SDS buffer)

Składnik	Objętość/Masa	Stężenie w roztworze 5x (1x)
Tris pH 6.8 (1,0M)	300 µl	300 mM (60 mM)
Glicerol	500 µl	50% (10%)
SDS	0.1 g	10% (1%)
Bromofenol	0.005 g	0.005% (0.001%)
woda	200 µl	-

7. Literatura

1. Elektroforeza – przykłady zastosowań, praca zbiorowa pod redakcją Bogdana Walkowiaka i Violetty Kochmańskiej, s. 3-24 / <http://www.biofizyka.p.lodz.pl/elektroforeza.pdf>
2. https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4
3. <https://www.youtube.com/watch?v=XUjLO-ek2C8>
4. <https://www.youtube.com/watch?v=b-1dXzU4iOw>
5. „Molecular cloning: a laboratory manual” Tom Maniatis, E. F. Fritsch, Joseph Sambrook, 1989
6. <http://www.bio-protocol.org/e78>