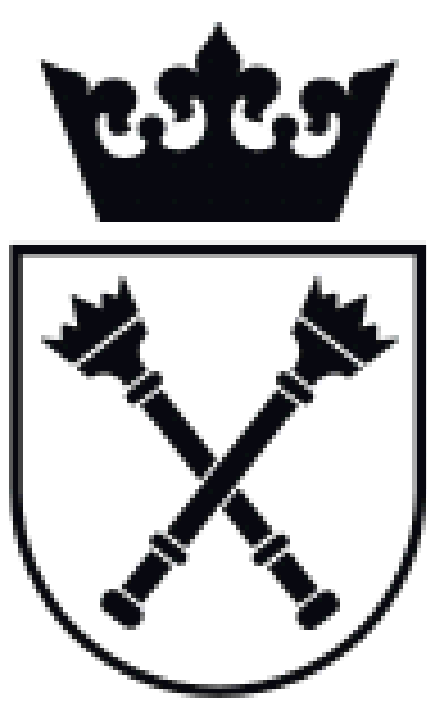




Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym.

Aleksandra Wołoszyn

opiekun naukowy: dr hab. Ewa Stępień prof. UJ

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ

Wstęp

Elektroforeza to często stosowana metoda rozdzielu białek. Jest to zjawisko migracji cząstek pod wpływem przyłożonego napięcia. Twórcą tej metody był Arne Tiselius, który w roku 1937 odkrył, że po przyłożeniu pola elektrycznego składniki mieszaniny buforu i białek surowicy migrują. Celem ćwiczenia było zbadanie czystości próbek białek: trypsyny, kazeiny, proteazy oraz albuminy, zakupionych u producenta (Sigma).

Podstawy fizyczne

Cząstki poruszają się w zależności od posiadanego ładunku w odpowiednim kierunku i z odpowiednią szybkością. Na każdą działa siła elektryczna:

$$F_s = qE$$

Której przeciwstawia się siła lepkości środowiska:

$$F_{lepkości} = 6\pi r\eta v$$

Ta z kolei sprawia, że cząstka zaczyna poruszać się ruchem jednostajnym.

Po porównaniu obu wzorów otrzymuje się wzór na szybkość cząstki:

$$v = \frac{qE}{6\pi r\eta}$$

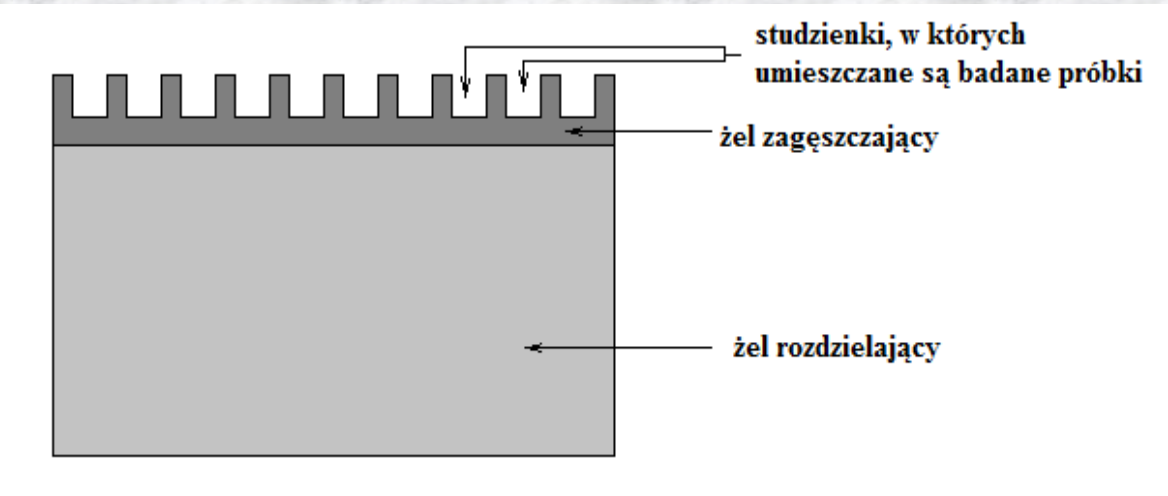
Często stosowany jest również wzór na tzw. ruchliwość elektroforetyczną:

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

Cząsteczki rozdzielane są dzięki efektowi tzw. jak 'sita molekularnego', to znaczy większe cząsteczki białek zostają zatrzymane, natomiast mniejsze przedostają się przez pory w żelu i migrują dalej.

Przebieg elektroforezy

Do prawidłowego wykonania procesu elektroforezy potrzebne jest przygotowanie dwóch rodzajów żeli: rozdzielającego oraz zagęszczającego (rys.1).



Rysunek 1. Schemat żelu do elektroforezy

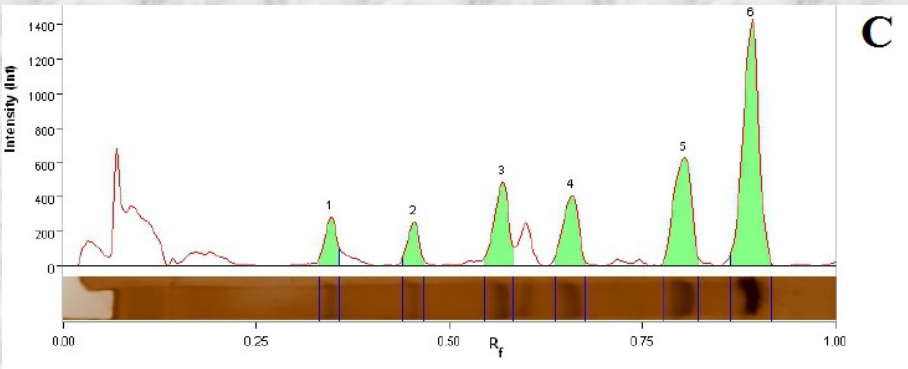
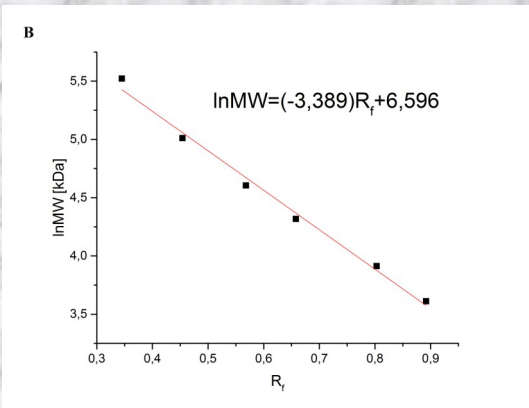
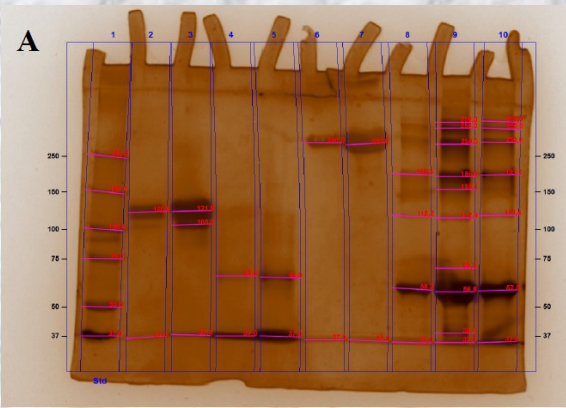


Rysunek 2. Komora do elektroforezy
Źródło: http://www.a-biotech.pl/tl_files/a-biotech/produkty/

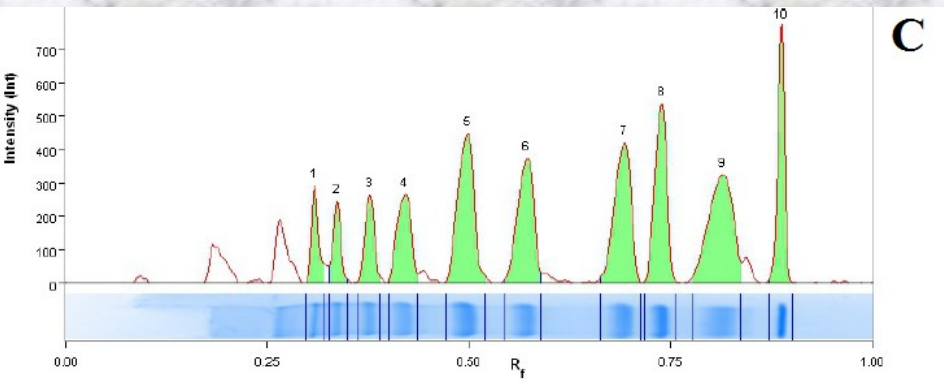
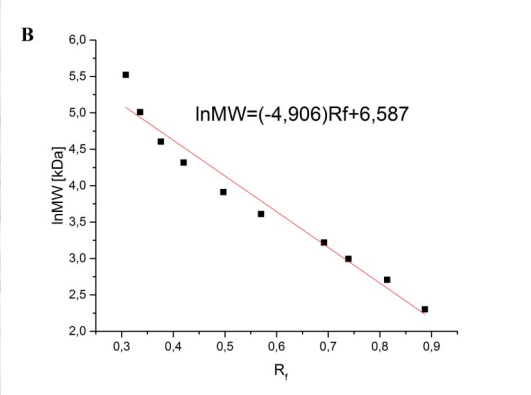
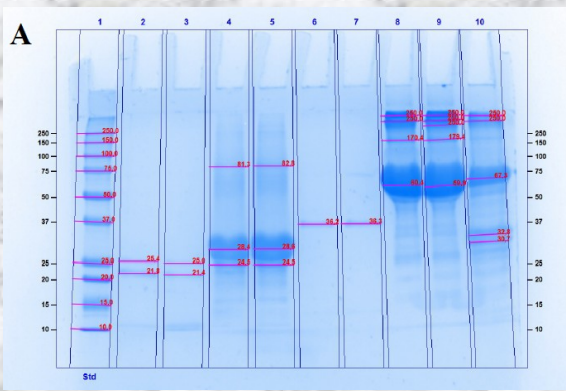
W studzienkach żelu zagęszczającego umieszcza się sporządzone próbki białek, a następnie tak przygotowane żele umieszcza się w komorze do elektroforezy (rys.2) i włącza stałe napięcie 160 V.

W celu analizy badanych żeli wybarwia się je na dwa sposoby: azotanem srebra lub Commasie Blue.

Wyniki pomiarów



Rysunek 3. Wyniki pomiarów dla żelu 8 %: A. Zdjęcie żelu wybarwionego azotanem srebra. B. Wykres zależności logarytmu naturalnego masy cząsteczkowej od względnej ruchliwości. C. Densytogram dla standardu białkowego (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards). Masę cząsteczkową szukanych białek obliczono w programie GelDoc.



Rysunek 4. Wyniki pomiarów dla żelu 15 %: A. Zdjęcie żelu wybarwionego Commasie Blue. B. Wykres zależności logarytmu naturalnego masy cząsteczkowej od względnej ruchliwości. C. Densytogram dla standardu białkowego (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards). Masę cząsteczkową szukanych białek obliczono w programie GelDoc.

Standard białkowy	Trypsyna 10:40	Trypsyna 80:100	Kazeina 10:40	Kazeina 80:100	Proteaza 10:40	Proteaza 80:100	Albumina 10:40	Albumina 80:100	MIX
-------------------	----------------	-----------------	---------------	----------------	----------------	-----------------	----------------	-----------------	-----

W studzienkach znajdowały się kolejno:

Po oszacowaniu masy możliwe było stwierdzenie obecności (lub nie) badanych białek w roztworach oraz określenie czystości badanych próbek:

Nazwa białka	Masa teoretyczna wyliczona na podstawie elektroforezy [kDa]		Masa podana przez producenta próbek [kDa]
	Żel 15 %	Żel 8%	
Trypsyna	25,065	-	24
	24,338	-	
Kazeina	23,865	-	19-24
Proteaza	-	-	18 kDa
Albumina	75,591	71,604	66
	74,853		

Tabela 1. Wyniki przeprowadzonej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym

Wnioski

Na podstawie otrzymanych wyników elektroforezy wnioskować można, że lepsze efekty daje stosowanie żeli o nieco wyższych stężeniach - dla żelu o stężeniu 15% wybarwiła się cała drabinka standardu białkowego, natomiast dla żeli 8% utracono 4 prążki.

Lepsze efekty otrzymano również dla wyższych stężeń białek.

Próbki badanych białek nie były idealnie czyste. Można to wnioskować z dużej ilości prążków, które pojawiły się w żelu podczas elektroforezy. Nie w każdej z próbek wryto białka, które były szukane.

Literatura

- [1] https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/t4799pis.pdf
- [2] skrypt do ćwiczenia z48
- [3] <http://www.bio-rad.com/en-mx/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-mul>
- [5] Elektroforeza – przykłady zastosowań, praca zbiorowa pod redakcją Bogdana Walkowiaka i Violetty Kochmańskiej, s. 3-24 / <http://www.biofizyka.p.lodz.pl/elektroforeza.pdf>