

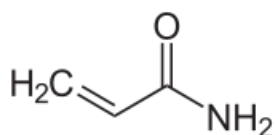
ĆWICZENIE II.

ELEKTROFOREZA W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM (ANG. POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS - PAGE)

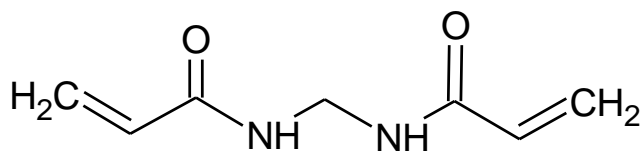
PRZYGOTOWANIE ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO DO ELEKTROFOREZY BIAŁEK W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE)

Żele poliakrylamidowe do elektroforezy wytwarza się poprzez wolnorodnikową polimeryzację monomerów akryl amidowych, których długie łańcuchy są łączone kowalencyjnie w wyniku działania czynnika sieciującego N,N'-metyleno-bis-akrylamidu. Gęstość żelu zależy od całkowitego stężenia obu składników, natomiast stopień usieciowania zależy od stężenia bis-akrylamidu. Reakcja polimeryzacji jest inicjowana przez wolne rodniki dostarczone przez nadsiarczan amonu i katalizowana przez N,N,N',N'-czterometyloetylenodwuaminę (TEMED). Reakcja trwa około 10-20 min, lecz czas ten może różnić się w zależności od stężeń nadsiarczanu amonu i TEMEDu.

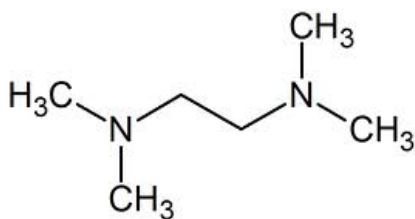
Polimeryzacja zachodzi bez dostępu tlenu, który jest inhibitorem tej reakcji. Możliwa jest także fotopolimeryzacja, czynnikiem inicjującym reakcję polimeryzacji jest wówczas UV.



Akrylamid

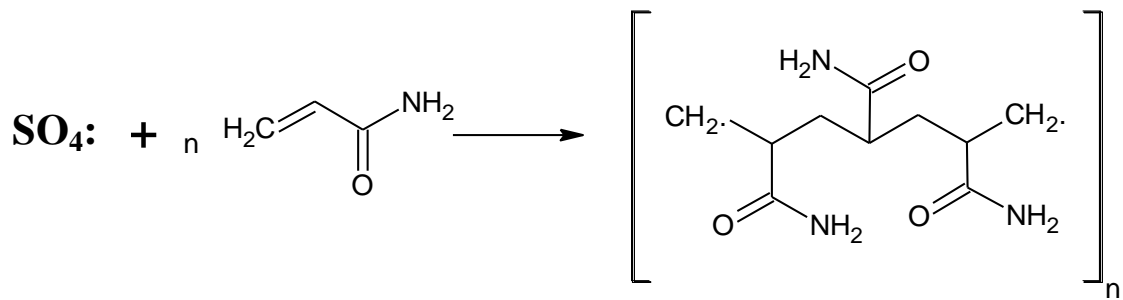


N,N'-Metylenodiakrylamid = Bisakrylamid

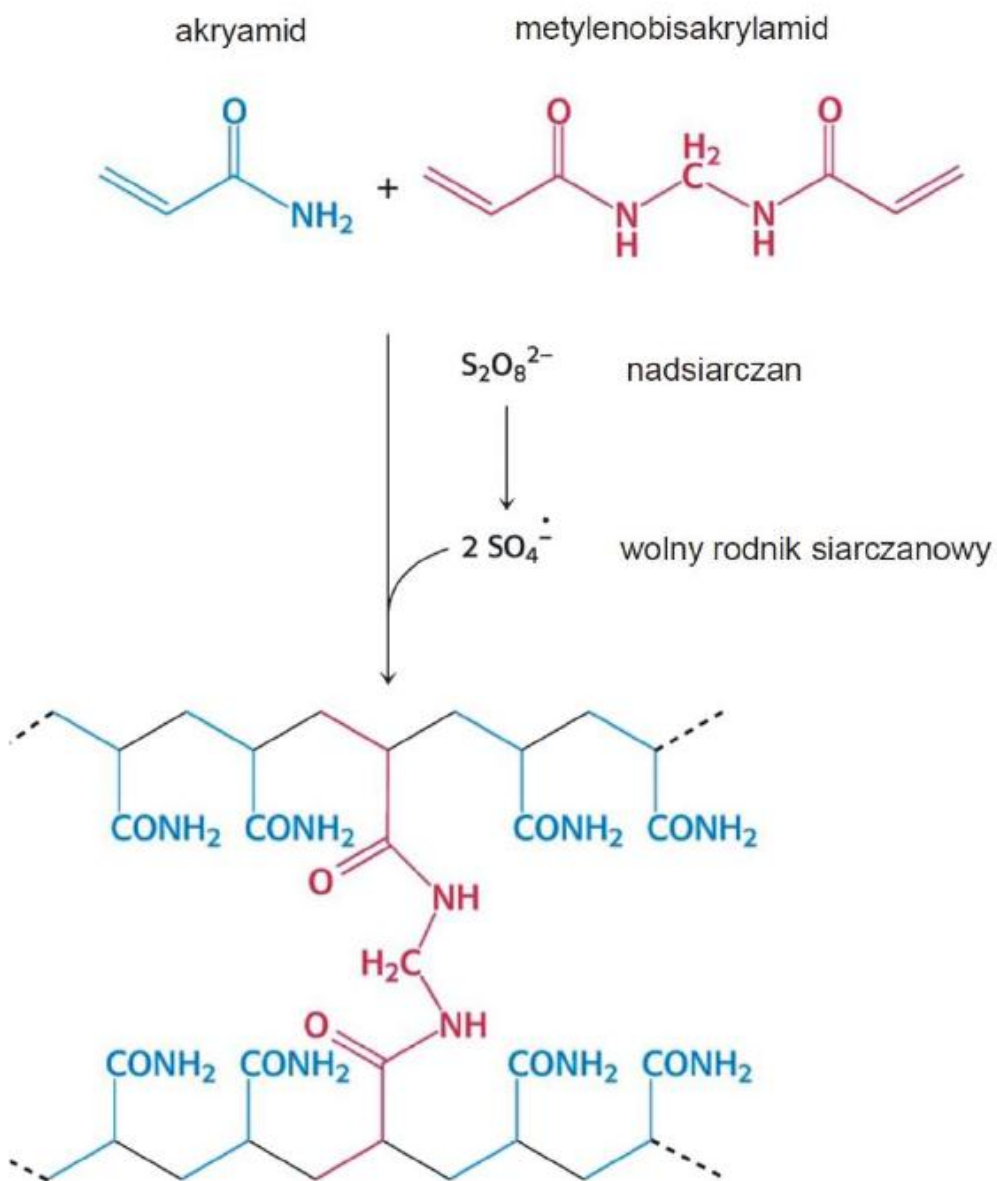


N,N,N',N'-czterometylo-etylenodwuamina = TEMED

Rys. 1 Chemiczne struktury związków stosowanych do przygotowania żeli poliakrylamidowych.



Rys.2 Polimeryzacja bez udziału bisakrylamidu.



Rys. 3 Polimeryzacja z udziałem bisakrylamidu.

Wielkość por w żelu poliakrylamidowym zależy od procentowej zawartości akrylamidów. Zwiększenie procentowości żelu prowadzi do zmniejszenia wielkości porów. Jeśli chcemy rozdzielić fragmenty charakteryzujące się szerokim zakresem wielkości, można zastosować żel gradientowy. W takim żelu wielkość porów jest większa u góry (przy studzienkach), zmniejszając się gradientowo w kierunku do dołu żelu.

Elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym zazwyczaj prowadzi się w wersji dwuwarstwowej (górną, stosunkowo wąską warstwę – żel zagęszczający i dolną, szerszą warstwę – żel rozwijający). Obie warstwy różnią się stężeniem akrylamidu, siłą jonową buforu i jego pH.

Uwaga: Akrylamidy niespolimeryzowane są neurotoksyczne, efekt toksyczny ma charakter kumulacyjny, tzn. objawy patologiczne mogą wystąpić po wielu latach niewielkiej, ale systematycznej ekspozycji, należy więc unikać kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi!!!

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

CZĘŚĆ I.

PRZYGOTOWANIE ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM DO ELEKTROFOREZY BIAŁEK W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE)

Materiały

- Płytki szklane wewnętrzne o wymiarach
- Płytki szklane z przekładkami (spacer'ami)
- Ramka do płytek
- Uszczelka silikonowa do statywu
- Statyw
- Grzebień teflonowy
- Zlewki do przygotowania żeli



Odczynniki chemiczne:

- Roztwór akrylamid : N, N-metyleno-bisakrylamid (37,5 : 1)
- Woda 2x dejonizowana
- 10% roztwór SDS (dodecylo siarczan sodu)
- 10% roztwór APS (nadsiarczan amonu)
- 1.5 M bufor Tris-HCl (pH 8.8)
- 0,5 M bufor Tris-HCl (pH 6.8)
- TEMED - N, N, N', N' - tetrametyloetylenodiamina

Wymagane środki ostrożności

- ✓ W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- ✓ Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- ✓ Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):
 - Akryloamid - T Produkt toksyczny R25, R48/23/24/25, R45, R46, R62; Xn Produkt szkodliwy R20/21; Xi Produkt drażniący R36/38, R43
 - Nadsiarczan amonu - O Produkt utleniający R 8; Xn Produkt szkodliwy R22; Xi Produkt drażniący R36/37/38, R42/43
 - TEMED - F Produkt wysoce łatwopalny R11; C Produkt żrący R34; Xn Produkt szkodliwy R20/22
- ✓ Pierwsza pomoc:
 - w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody.
 - w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
 - jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze. Jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie. Zasięgnąć porady medycznej.
 - w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
 - w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

Dokładne instrukcje postępowania są zawarte w dołączonych kartach charakterystyk substancji.

Przygotowanie żelu poliakrylamidowego SDS-PAGE - Wykonanie

1. Starannie umyć szybki detergentem (płyn do mycia naczyń, roztwór SDS), osuszyć czystym ręcznikiem papierowym i przetrzeć wewnętrzne powierzchnie szybki etanolem lub denaturatem.
2. Ustaw płytkę z krawędziami zgodnie z oznaczeniem „up” i włóż złożone ze sobą płytki do ramki do wylewania żelu, tak, aby krótsza płytka znalazła się od strony zacisków ramki.

Uwaga: Płytki muszą być ułożone równolegle do siebie.

3. Zabezpieczone w ramce do wylewania żelu płytki umieść w statywie z dopasowaną uszczelką.
4. Sporządzić roztwór żelu rozdzielającego (wg Tabeli 1). Polimeryzacja zaczyna się, gdy w mieszaninie znajdują się nadsiarczan amonu i TEMED, dlatego należy je dodawać na końcu.

Tabela 1. Składniki żelu rozdzielającego, całkowita objętość 10 ml.

% żelu	H ₂ O [ml]	Akrylamid/Bis [ml]	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	10% SDS [ml]	TEMED [μl]	10% APS [μl]
5%	5,7	1,7	2,5	0,1	5	50
8%	4,7	2,7	2,5	0,1	5	50
10%	4,1	3,2	2,5	0,1	5	50
12%	3,4	4,0	2,5	0,1	5	50

5. Przy pomocy pipety wlać żel rozdzielający (4-5 ml). Wyrównać powierzchnię żelu przez kołysanie.
6. Warstwę żelu rozdzielającego zalać wodą (zabezpieczy przed wysuszeniem powierzchni żelu i przyspieszy polimeryzację).
7. Sporządzić roztwór żelu zagęszczającego (wg Tabeli 2).

Tabela 1. Składniki żelu zagęszczającego, całkowita objętość 5 ml.

% żelu	H ₂ O [ml]	Akrylamid/Bis [ml]	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	10% SDS [ml]	TEMED [μl]	10% APS [μl]
5%	2,85	0,85	1,25	0,05	5	25
8%	2,35	1,85	1,25	0,05	5	25

10%	2,05	1,6	1,25	0,05	5	25
-----	------	-----	------	------	---	----

8. Po zakończeniu polimeryzacji żelu rozdzielającego (około 30 min) wylać wodę i odsączyć jej resztki przy pomocy ligniny lub ręcznika papierowego.
9. Przy pomocy pipety wlać żel zagęszczający (ok. 1.5 ml), umieścić grzebień teflonowy w żelu tak aby leżał równolegle z brzegiem krótszej płytki szklanej. Pozostaw na około 20 – 30 minut, aby żel spolimeryzował.
10. Po zakończeniu polimeryzacji żelu zagęszczającego wyjąć grzebień, zdjąć żel (tzn. żel z szybami pomiędzy którymi się znajduje) z ramki do wylewania i żel wraz z płytkami umieścić w ramce wewnętrznej. Zamknąć płytki z żelem w ramce, używając przystosowanych do tego zacisków.
11. Przepłukać studzienki wodą i odsączyć resztki wody ligniną lub ręcznikiem papierowym.

Sprawozdanie

Sprawozdanie wykonać po zakończeniu wszystkich trzech ćwiczeń dotyczących elektroforezy żelowej.

Literatura

1. "Techniki elektromigracyjne - teoria i praktyka" [Red.] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Szumski M., Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, ISBN 978-83-925269-9-5.
2. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L. (2005) Biochemia. (według V wyd. amerykańskiego) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
3. Józwiak Z., Bartosz G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN (2007)
4. <http://www.kucharczyk.com.pl/> (Przepisy i porady)