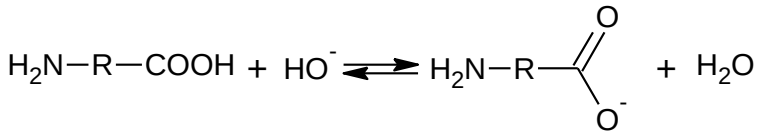
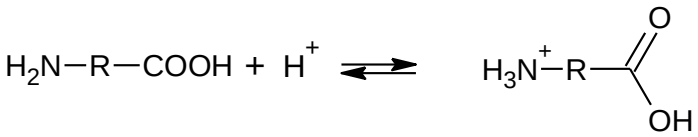
Dělení bílkovin pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

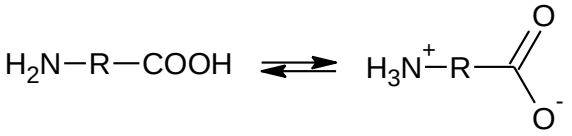
Při elektroforéze dochází k pohybu (migraci) iontů v elektrickém poli. Elektroforetické metody se tedy používají k separaci látek nesoucí elektrický náboj (ionty). Nositeli elektrického náboje jsou mimo jiné amfolyty (např. aminokyseliny). Ty získávají náboj (kladný nebo záporný) v důsledku jejich vnitřní disociace. Náboj aminokyselin ovlivňuje hodnota pH. Při vyšším pH dochází k ionizaci karboxylových skupin a aminokyseliny získávají záporný náboj:



Při nižším pH ionizují naopak zásadité skupiny a náboj molekuly je pak kladný.



V určité oblasti pH dochází u těchto látek k disociaci stejného počtu jak kyselých tak i zásaditých skupin a celkový náboj molekuly (zwitteriontu) je pak nulový.



Tato hodnota pH se nazývá *izoelektrický bod pI* a je charakteristickou konstantou pro každý amfolyt. Aminokyseliny jsou stavebními jednotkami bílkovin, a proto se bílkoviny chovají jako amfolyt. Bílkoviny jsou makromolekuly koloidní povahy a elektroforéza se často využívá k dělení těchto látek.

Příčinou pohybu koloidních částic v elektrickém poli je *elektrokinetický potenciál* (ζ-potenciál, čti zeta potenciál). Jde o potenciálový rozdíl mezi pohyblivou a fixovanou částí iontové atmosféry, tj. mezi difúzně rozptýlenými ionty v roztoku a tenkou vrstvou protiiontů, poutanou k povrchu částice.

Pohyb elektricky nabitých částic závisí na jejich velikosti, tvaru, velikosti jejich náboje a na intenzitě vloženého elektrického pole**.** Pohyb částice je charakterizován jejich *elektroforetickou pohyblivostí u*, což je rychlost pohybu při potenciálním spádu 1 *V/cm*. Vztah mezi pohyblivostí a nábojem částice *Q* vyplývá z rovnosti hnací *síly elektrické* a brzdící *síly třecí*. Elektrická síla je dána součinem náboje částice a *potenciálu pole E*, v němž se částice

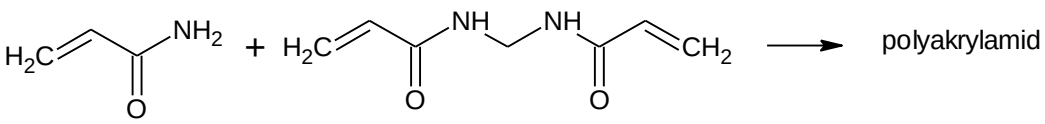
nachází. Brzdící síla je dána vztahem $B=v.f$, kde v je rychlost pohybu a f je *koeficient tření.* Z rovnosti obou těchto sil a z definice pohyblivosti tedy plyne:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{Q}{f} \qquad [1]$$

Jednotkou pohyblivosti je $cm^2s^{-1}V^{-1}$.

Elektroforéza se realizuje jako volná nebo jako zónová. V případě volné elektroforézy se vzorky látek rozpustí v pufru o určitém pH a nanesou se např. na dno U-trubice. Vzorky se pak převrství pufrem o stejném pH, do kterého se vloží elektrody. Po zavedení elektrického proudu dochází k pohybu nabitých molekul k elektrodám nesoucí opačný náboj. Dělení v tomto uspořádání je zatíženo celou řadou chyb, a proto byla zavedena elektroforéza zónová neboli na nosičích. Vzorky látek se v tomto případě nanášejí na vhodný nosič, čímž je např. filtrační papír, chromatografický papír, agarový gel, škrobový gel nebo polyakrylamidový gel. Nosič je pak navlhčen nebo přímo ponořen do roztoku pufru, do něhož jsou rovněž zavedeny elektrody. Po zavedení elektrického proudu dochází k migraci nabitých částic k opačně nabitým elektrodám stejně jako u volné elektroforézy, ovšem pohyb se děje na nosiči, což umožňuje lepší průběh, zpracování a vyhodnocení elektroforetického dělení. Částice pak na nosiči vytváří zóny, které jsou seřazené podle elektroforetické pohyblivosti. Protože je hodnota elektrického proudu nastavena na určitou konstantní hodnotu, pohybují se zóny konstantní rychlostí, ale vytváří se stupňovitý gradient potenciálu. Projevuje se zde tzv. samozaostřující efekt. Zpozdí-li se některý ion za „svou“ zónou, tj. za zónou odpovídající příslušné pohyblivosti, octne se tak v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho urychlí tak, aby dohnal svou zónu (a naopak).

V praxi se velice často používá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE), který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a nabízí možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu aj.). Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu a N,N-methylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného. Do směsi se vždy přidává stabilizátor volných radikálů TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylendiamin).



Fyzikální vlastnosti tohoto gelu jsou dány podílem akrylamidu v gelu a stupněm zasíťování. Lineární řetězce vznikají spojováním monomerů akrylamidu, příčné vazby mezi nimi jsou tvořeny BIS. Velikost pórů polyakrylamidového gelu závisí nepřímo úměrně na koncentraci akrylamidu. Čím vyšší je tedy koncentrace akrylamidu, tím jsou menší póry. Nejčastější koncentrace akrylamidu je 3 – 15 %. Koncentrace BIS obvykle odpovídá 5% celkové koncentraci akrylamidu.

Zónovou elektroforézu lze realizovat bud v kontinuálním nebo diskontinuálním systému. Diskontinuita může být jak v koncentracích gelu, tak především v pH a iontové síle. V případě pH se diskontinuita volí použitím různé hodnoty pH pufru elektrodového a pufru v gelu. Při diskontinuální elektroforéze získáváme ostřejší zóny než v případě kontinuální elektroforézy. Jako elektrodového pufru se mimo jiné používá Tris(hydroxymethyl)aminomethan/glycinátový pufr pH 8,3 (Tris/glycin). Gel pak obsahuje pufr Tris/HCl pH 9,2. Po skončení elektroforézy se rozdělené bílkoviny v gelu fixují v 10 % roztoku kyseliny chloroctové a poté barví pomocí barviva CBB R-250 (Coomassie Brilliant Blue R 250). Nakonec se gel odbarví v roztoku methanolu a kyseliny octové, přičemž zóny bílkovin zůstanou zbarveny modře.

Úkol: Rozdělte bílkovinu vaječného bílku pomocí diskontinuální elektroforézy

Chemikálie:

Elektrodový pufr (0,025 mol.l^{-1} Tris, 0,192 mol.l^{-1} glycin, pH 8,3)

pufr do gelu (2,25mol.l^{-1} Tris, 0,1655 mol.l^{-1} HCl)

30 % (w/v) akrylamid

2 % (w/v) bisakrylamid

10 % (w/v) persíran amonný

vzorkovací pufr (0,125 mol.dm^3 pufr do gelu, 0,01 % (w/v) bromfenolová modř)

TEMED (*N*,*N*,*N*′,*N*′-Tetramethylethylenediamine)

fixační roztok (10 % kys. trichloroctová)

barvící roztok (0,1 % (w/v) CBB R-250 v 15 % (v/v) kys. octové a 45 % (v/v) methanolu)

odbarvovací roztok (40 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kys. octová)

vaječný bílek

Pomůcky:

Kádinka (50 ml, 2 ks 100 ml)

odměrný válec

elmag. míchačka + míchadlo

automatické pipety + špičky na pipety

plastové mikrozkumavky

špachtle

misky

střička

třepačka

elektroforetický přístroj

Pracovní postup:

Akrylamid a BIS jsou neurotoxické látky. S jejich roztokem pracujeme vždy s co největší opatrností, v gumových rukavicích. **Nikdy tyto látky nepipetujeme ústy!**

Příprava 8 % gelu

Podle rozpisu odpipetujeme příslušná množství daných látek do kádinky.

Destilovaná voda	5,41 ml
Pufr do gelu	2,4 ml
Akrylamid	4 ml
BIS	3 ml
TEMED	50 μl

Kádinku umístíme na elektromagnetickou míchačku nastavenou na hodnotu 250 - 300 otáček za minutu a zapneme ji. Formu na gel uzavřeme vložením dvou plíšků. Formu dáme do plastového kelímku, aby případný uniklý gel neznečistil pracovní plochu. Poté zahájíme polymeraci gelu přídavkem 140 μl čerstvě připraveného 10 % roztoku persíranu amonného (ten si připravíme do mikrozkumavky s uzávěrem – 1 ml) do kádinky postavené na míchačce. Po promíchání (cca 8 sekund) nalijeme roztok do formy tak, aby nevznikaly bublinky. Po nalití ihned zasuneme do roztoku gelu hřebínek. Do kádinky se zbytky roztoku gelu nalijeme vodu. Gel necháme polymerizovat a připravíme si vzorky. Z roztoku vaječného bílku odpipetujeme postupně 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 ml do plastových mikrozkumavek a doplníme je přídavkem 0,4 ml vzorkovacího pufru.

Z formy s gelem odstraníme plíšky (špachtlí odřízneme gel od plíšků, pak je vyjmeme) a vysuneme hřebínek. Vodu na gelu slijeme a případnou vodu v jamkách pro vzorky opatrně odsajeme injekční stříkačkou. Poté do jednotlivých jamek (krajní jamky nevyužíváme, dochází zde k deformaci zón) odpipetujeme vzorky bílkovin. Elektroforetickou vanu naplníme 180 ml elektrodového pufru. V pufru nesmí být přítomny bubliny. *Formu s gelem vložíme do elektroforetické vany a to pomalu a velmi opatrně, aby nedošlo k vyplavení vzorků z jamek!* Do elektrodového pufru nejprve ponoříme pravou stranu gelu, pak pomalu stranu levou (se vzorky).

Při elektroforéze budou vzorky putovat z levé strany na pravou (ke kladné elektrodě), proto musí být vzorky na levé straně! Vanu přikryjeme víkem (kabely vedoucí na víko elektroforetické vany musí být na vzdálenější straně) a zapneme zdroj napětí, který nastavíme na hodnotu 150 V.

Po doputování zóny bromfenolové modři asi 1 cm před konec gelu (cca 80 min.) elektroforézu ukončíme. Formu s gelem vyjmeme a gel necháme opatrně sklouznout do misky. Gel několikrát propláchneme destilovanou vodou. Pro orientaci rozdělených zón na gelu odřízneme pravý dolní roh gelu. Gel pak vložíme do misky s fixačním roztokem a misku dáme na třepačku. Po 5 minutách gel vyjmeme, fixační roztok vrátíme zpět do zásobní láhve. Gel opět propláchneme a vložíme jej do misky s barvícím roztokem. Gel necháme 15 minut barvit na třepačce. Po obarvení slijeme barvící roztok zpět do zásobní láhve, gel několikrát propláchneme destilovanou vodou a vložíme jej do misky s cca 20 ml odbarvovacího roztoku. Gel odbarvujeme jednou, popřípadě dvakrát po dobu alespoň 15 minut.

Zbytky chemikálií vyléváme do zvláštního barelu.

Vyhodnocení:

Určíme počet zón na gelu a následně změříme jednotlivé vzdálenosti zón vzorků bílkovin od startovních jamek a určíme relativní pohyblivost R_f (vzdálenost středu zóny bílkoviny ke vzdálenosti konce gelu od startovních jamek). Při práci s gelem je nutné používat gumové rukavice.