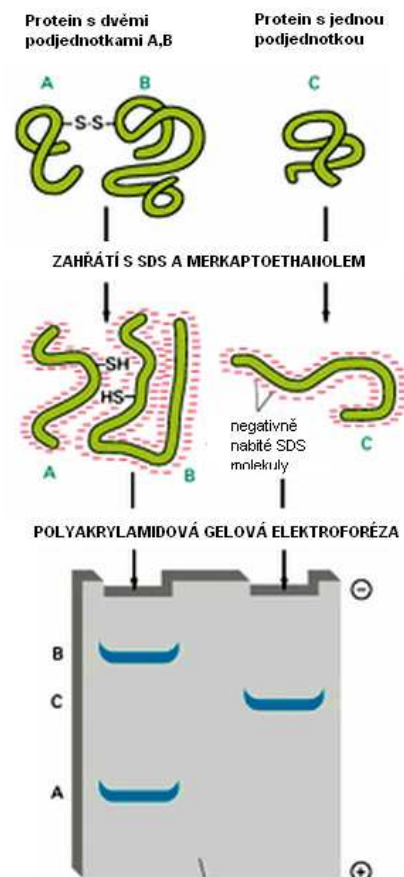


Sraz studentů v 8:15 před laboratoří A5/108, s sebou plášť a přezutí

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE)

PRINCIP

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Zahřátím vzorku proteinů v denaturujícím a redukujícím pufru dochází k denaturaci proteinů včetně odstranění disulfidových můstků a jejich obalení molekulami dodecylsulfátu sodného (SDS), který udělí proteinům celkový záporný náboj. Je to dáno tím, že SDS se nekovalentně váže na proteiny v poměru 1.4 g SDS na 1 g bílkoviny. Po nanesení vzorku se záporně nabitými proteiny na gel a umístění gelu do elektrického pole migrují proteiny ke kladné elektrodě (anodě). Během této migrace jsou proteiny separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu (obrázek 1.). Po následné vizualizaci separovaných proteinů v gelu se dá určit jejich relativní molekulová hmotnost srovnáním vzdálenosti od startu migrace daného proteinu se směsí standardů o známé molekulové hmotnosti. Koncentrace monomeru použitého k přípravě gelu se volí podle velikosti proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace se používá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace se používá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti (viz tabulka 1). Vlastní monomer je směsí akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), který zajišťuje zesíťování struktury polymeru.



Obrázek 1. Princip SDS PAGE separace

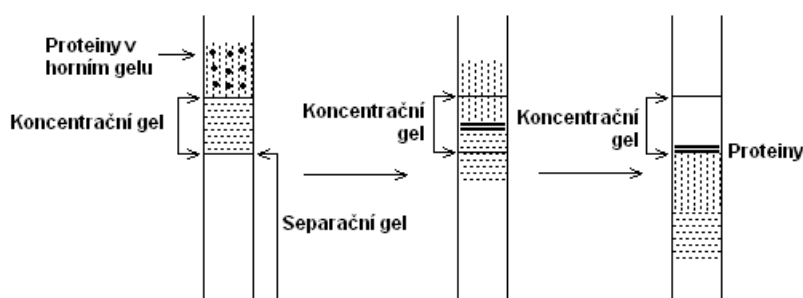
Tabulka 1. Separační schopnosti SDS-PAGE gelů

Koncentrace monomeru (akrylamid + BIS) [%T]	Oblast lineární separace [kDa]
15,0	12–43
10,0	16–68
7,5	36–94
5,0	57–212

V praxi se pro separace proteinů velmi často používá tzv. diskontinuální elektroforéza skládající se ze dvou gelů, koncentračního a separačního (obrázek 2). Tyto gely mají různá pH a také různou koncentraci monomeru. Koncentrační gel má pH cca 6,8, při kterém mají ionty glycinu ($pI=6,1$) obsažené v elektroforetickém pufru významně nižší mobilitu než při pH 8,8, které je nastaveno v separačním gelu. Díky tomu v koncentračním a separačním gelu panují odlišné separační podmínky. Kromě iontů glycinu se v systému nacházejí také anionty proteinů, anionty chloridu a kationty (protionty) TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan).

V prvním - koncentračním gelu se aniony řadí následovně dle mobility: 1. chloridy 2. proteiny 3. glycin. V této situaci (řidký gel) dochází k zúžení (isotachoforetickému zakoncentrování) zóny proteinů díky tomu, že ionty glycinu tlačí „zezadu“ na zónu proteinů, která je zepředu ohraničena zónou chloridových aniontů. Díky tomu je zóna proteinů velmi dobře zúžena (zakoncentrována) před vstupem do separačního gelu.

Po vstupu do separačního gelu je pořadí mobilit anionů díky vyššímu pH a tím pádem zápornějšímu náboji glycinu a jeho vyšší mobilitě odlišné: 1. chloridy 2. glycin 3. proteiny. V této situaci již mobilita proteinů není zezadu ovlivňována jinými ionty a díky hustšímu separačnímu gelu se proteiny s různou molekulovou hmotností postupně separují na principu molekulového síta podle své molekulové hmotnosti.



Obrázek 2. Princip diskontinuální elektroforézy

Vzorce pro výpočet podílu celkového monomeru (%T) v gelu a podílu crosslinkující složky (%C) v monomeru

$$\%T = \frac{m(\text{akrylamid}) + m(\text{BIS})}{m(\text{roztoku v okamžiku polymerace})}$$

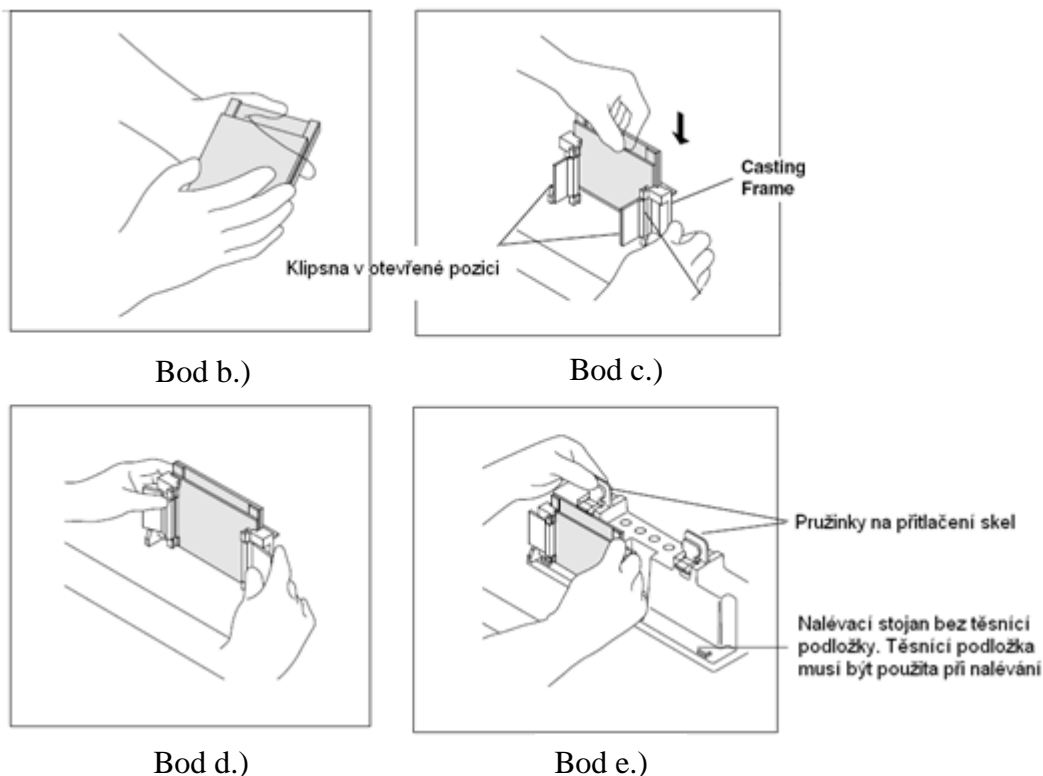
$$\%C = \frac{m(\text{BIS})}{m(\text{akrylamid}) + m(\text{BIS})}$$

PRAKTICKÁ ČÁST

Příprava gelu

Složení sendvičové kazety pro nalití gelu (viz obrázek na následující straně)

- Umístěte nalévací stojan a rámečky na rovnou podložku.
- Vezměte delší skla se spacery o tloušťce 1.0 mm a umístěte na ně kratší skla.
- Umístěte skla do nalévacího rámečku tak, že popis na delším skle je orientován nahoru.
- Zaklapněte skla oběma klipsy zároveň.
- Umístěte nalévací rámeček se skly na nalévací stojan (nezapomeňte umístit na stojan těsnící podložku) a přitlačte je pomocí pružinky.



Nalévání separačního gelu

- Na základě tabulky 2 namíchejte směs pro 10 % separační gel do Erlenmayerovy baňky nebo kádinky a promíchejte. Jako poslední přidejte persíran amonný a TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin), které slouží jako iniciátor a katalyzátor polymerace. Opět promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný.**
- Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla tak, aby od okraje kratšího skla zůstala mezera cca. 1 cm.
- Převrstvěte opatrně nalitý gel tenkou vrstvou vodou.
- Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu a pomocí filtračního papíru odsajte vodu na povrchu polymerovaného gelu.
- Vraťte nalévací rámeček se skly do nalévacího stojanu.

Nalévání koncentračního gelu

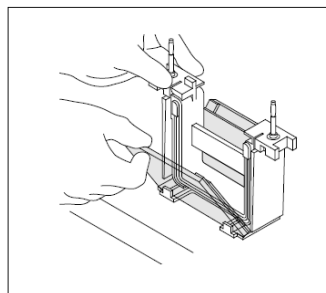
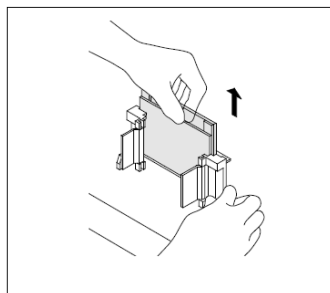
- Na základě tabulky 2 namíchejte směs pro 5 % koncentrační gel do Erlenmayerovy baňky nebo kádinky. Jako poslední opět přidejte persíran amonný a TEMED a opět promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný.**
- Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla na již ztuhlý separační gel tak, aby koncentrační gel byl nalit až po okraj kratšího skla.
- Poté opatrně zasuňte mezi skla hřebínek o tloušťce 1.0 mm.
- Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu, vyndejte opatrně hřebínek a vzniklé jamky propláchněte deionizovanou vodou.

Tabulka 2. Složení směsi pro nalévání gelu

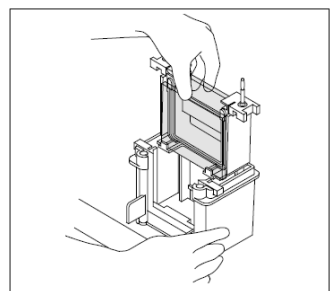
5% (T) koncentrační gel		10% (T) separační gel	
Látka/roztok	Objem [ml]	Látka/roztok	Objem [ml]
30 % (akrylamid + BIS 37,5:1)	0,850	30 % (akrylamid + BIS) 37,5:1)	3,350
1 M Tris (pH 6.8)	0,625	1.5 M Tris (pH 8.8)	2,500
10 % persíran amonný	0,050	10 % persíran amonný	0,100
10 % SDS	0,050	10 % SDS	0,100
TEMED	0,005	TEMED	0,004
H ₂ O	3,400	H ₂ O	3,950
Celkový objem	5,000	Celkový objem	10,000

Sestavení aparatury

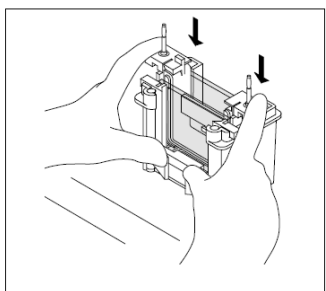
- Vyjměte skla z nalévacího rámečku a umístěte každé sklo do drážek v elektrodevém držáku. Skla musí být umístěna tak, že kratší skla jsou orientována dovnitř směrem k sobě, čímž vytváří vaničku pro nalití pufru.
- Takto připravený elektrodevý držák se skly zasuňte do upínacího rámečku.
- Gely přitlačte na zelené těsnění pomocí klipsen.
- Upínací rámeček poté vložte do elektrodevé vany.
- Do komůrky mezi skly (katodový prostor) v elektrodevém držáku nalijte elektrodevý pufr (až po okraj, cca. 125 ml). Do elektrodevé vany (anodový prostor) nalijte potom asi 200 ml elektrodevého pufru.



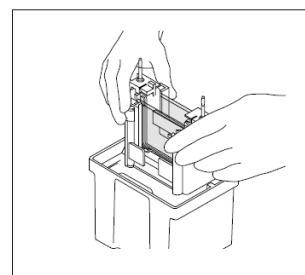
Bod a.)



Bod c.)



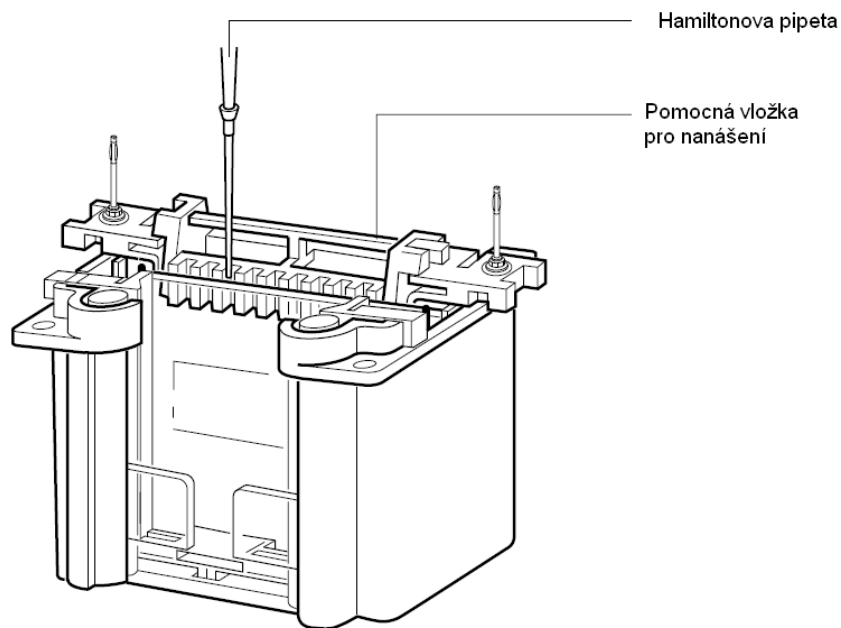
Bod c.)



Bod d.)

Nanesení vzorku

- Před nanesením umístěte vzorek a směs standardních proteinů o známé molekulové hmotnosti (standarty) na 5 minut do termobloku vyhřátého na 95°C.
- Poté vzorek a standard zchlaďte na ledu.
- Do horní vaničky si vložte pomocnou vložku pro nanášení vzorku.
- Do jednotlivých jamek nanášejte pomocí Hamiltonovy pipety vzorky a standarty podle rozpisu. Obvykle se nanáší 20-30 µg celkového proteinu na jamku.



Vlastní elektroforéza

Elektroforetickou aparaturu uzavřete víkem a připojte ji ke zdroji stejnosměrného napětí. Na zdroji nastavte konstantní proud 30 mA/gel a po zapnutí ponechte elektroforézu probíhat tak dlouho, až zóna bromfenolové modři doputuje ke spodnímu okraji gelu.

Ukončení elektroforézy

Vypněte zdroj, otevřete elektroforetickou aparaturu, vyjměte z ní vnitřní elektrodový prostor, a slijte elektrodový pufr. Uvolněte z vnitřního elektrodového prostoru držák s gelem a opatrným zapáčením od sebe uvolněte skla. Z gelu odstraňte koncentrační část a zbytek přeneste do vody.

Protokol pro barvení gelů stříbrem

Provádějte na třepačce na rychlost „pomalou“, vyvíjení a zastavování vyvíjení na rychlost „rychle“

- a. Ponořte gel na 7 minut do 7% kyseliny octové
- b. Ponořte gel na 10 minut do 50% metanolu
- c. Znovu ponořte gel na 10 minut do 50% metanolu
- d. Připravte si roztok A: 0.8 g dusičnanu stříbrného + 4 ml deionizované vody
- e. Propláchněte gel po dobu 10 minut v 100 ml vody
- f. Propláchněte gel po dobu 10 minut v 100 ml vody
- g. 5 minut před posledním promytím připravte roztok B: 21 ml vody + 250 μ l 30 % NaOH + 1.4 ml 14.8 M hydroxidu amonného
- h. Připravte barvicí roztok: Roztok B umístěte na míchačku a za neustálého míchání přidejte po kapkách roztok A. poté přidejte 76 ml deionizované vody.
- i. Ponořte gel na 15 minut do barvicího roztoku.
- j. Propláchněte gel po dobu 5 minut v 100 ml vody
- k. Znovu propláchněte gel po dobu 5 minut v 100 ml vody
- l. Připravte vyvíjecí roztok: Smíchejte 200 ml deionizované vody s 1 ml 1% kyseliny citronové a 100 μ l 37% formaldehydu. Dále si připravte 200 ml 7% kyseliny octové.
- m. Ponořte gel do vyvíjecího roztoku a inkubujte ho, dokud nejsou viditelné proužky (obvykle 2-10 minut).
- n. Vyvíjení zastavte vypuštěním vyvíjecího roztoku, přidáním 200 ml 7% kyseliny octové a inkubací po dobu 10 min.

Složení pufřů**Nanášecí (denaturační a redukcující) pufr**

250 mM Tris-HCl pH 6.8

10 % SDS

30 % Glycerol

5 % β -merkaptoethanol (nebo 0.5M dithiothreitol)

0.02 % bromfenolová modř

Elektroforetický pufr (10 x koncentrovaný)

TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) 30.3 g

Glycin 144 g

SDS 10 g

Doplňt do 1l vodou (pH se neupravuje, směs má pH= 8,8). Před použitím se desetkrát zředí deionizovanou vodou.