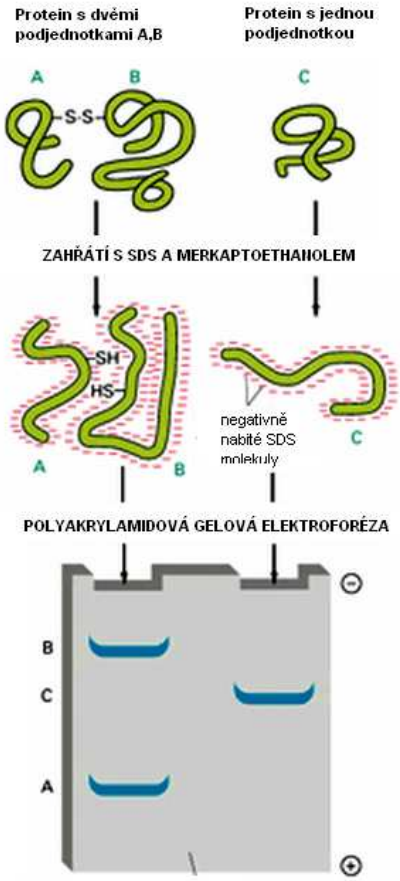
Sraz studentů v 8:00 před laboratoří A5/108, s sebou plášť a přezutí

PRINCIP

Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 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'-methylenbisakrylamidu (BIS), který zajišťuje zesíťování struktury polymeru.



Obr. 1. Princip SDS PAGE separace

Tabulka 1. Separační schopnosti SDS-PAGE gelů

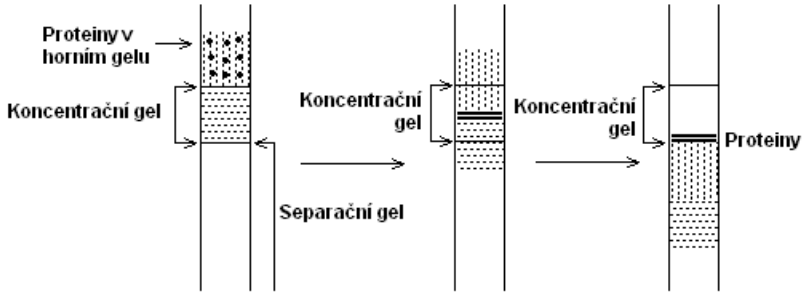
Koncentrace monomeru (akrylamid + BIS) [%T]	Oblast lineární separace [kDa]
15,0	12–43
10,0	16–68
7,5	36–94
5,0	57–212

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 (řídký 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.



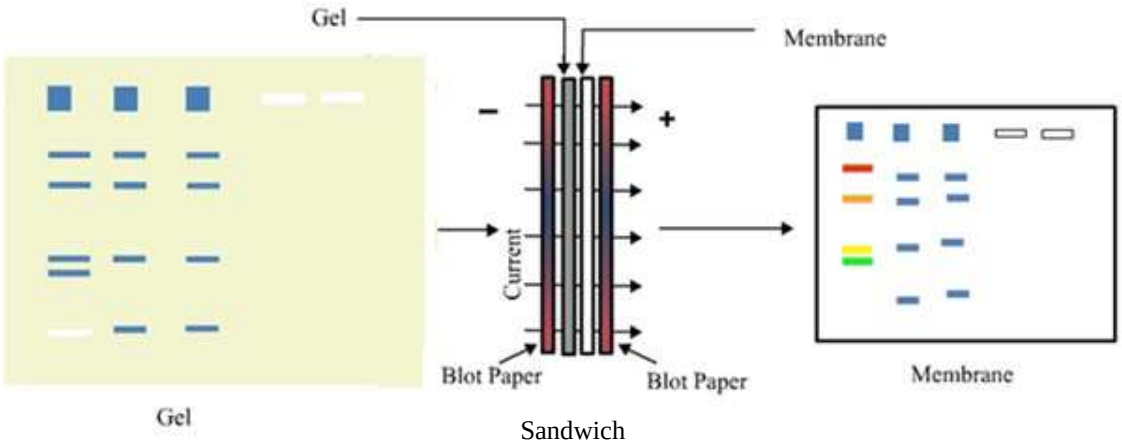
Obr. 2. Princip diskontinuální elektroforézy

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

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

Western blotting

Western blot je analytická metoda sloužící k přenosu a imunochemické detekci proteinů z SDS-PAGE gelu. Proteiny z SDS-PAGE gelu jsou nejprve přeneseny pomocí elektrického pole na chemicky i mechanicky odolnější membránu (nitrocelulóza nebo polyvinylidendifluorid (PVDF)) (obrázek 3). Existují dva typy uspořádání western blotu a to „wet blotting“ (mokrý přenos) a „semi-dry blotting“ (polosuchý přenos), pomocí obou metod je dosahováno srovnatelných výsledků. Na membráně pak probíhá imunochemická detekce proteinů za pomocí primární a sekundární protilátky. Primární protilátka je specifická vůči cílovému proteinu (antigenu), neboť se váže na specifickou sekvenci aminokyselin v cílovém proteinu zvanou epitop, která se liší protein od proteinu. Sekundární protilátka je pak specifická proti imunoglobulinům zvířete, které vytvořilo primární protilátku, vytváří tedy komplex s primární protilátkou v místě jejího komplexu s antigenem. Sekundární protilátka navíc nese detekční systém (obvykle enzym – alkalická fosfatasa, peroxidasa), který rozkládá substrát, který po rozložení produkuje chemiluminiscenci (svítí) v místě komplexu antigen-primární protilátka-sekundární protilátka. Díky vysoké specifitě interakce antigen-protilátka a vysoké citlivosti detekce je možné identifikovat jeden konkrétní protein ze směsi obsahující až stovky proteinů.



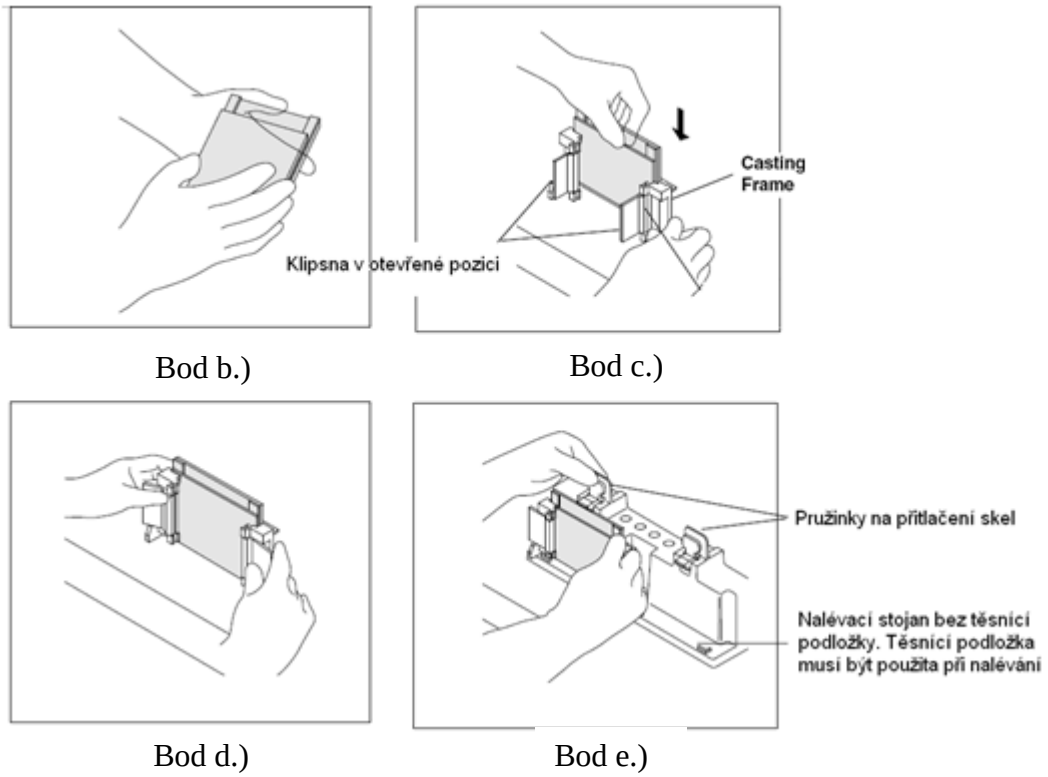
Obr. 3. Princip přenosu proteinů pomocí western blottingu

PRAKTICKÁ ČÁST

Příprava SDS-PAGE gelu

Složení sendvičové kazety pro nalití gelu (viz obr. 4)

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



Bod b.) Bod c.)

Bod d.) Bod e.)

Obr. 4. Sestavení nalévacího stojanu pro SDS-PAGE

Nalévání separačního gelu

a. Na základě tabulky 2 namíchejte směs pro 10 % separační gel do Erlenmayerovy baňky nebo kádinky a promíchejte. Jako poslední přidávejte 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.**
b. Pomocí 5 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla tak, aby od okraje kratšího skla zůstala mezera cca. 1 cm.
c. Převrstvěte opatrně nalitý gel tenkou vrstvou vodou.
d. Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu a pomocí filtračního papíru odsajte vodu na povrchu polymerovaného gelu.
e. Vraťte nalévací rámeček se skly do nalévacího stojanu.

Nalévání koncentračního gelu

a. Na základě tabulky 2 namíchejte směs pro 5 % koncentrační gel do Erlenmayerovy baňky nebo kádinky. Jako poslední opět přidávejte persíran amonný a TEMED a opět promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný.**
b. 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.
c. Poté opatrně zasuňte mezi skla hřebínek o tloušťce 1.0 mm.
d. Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu, vyndejte opatrně hřebínek a vzniklé jamky propláchněte deionizovanou vodou.

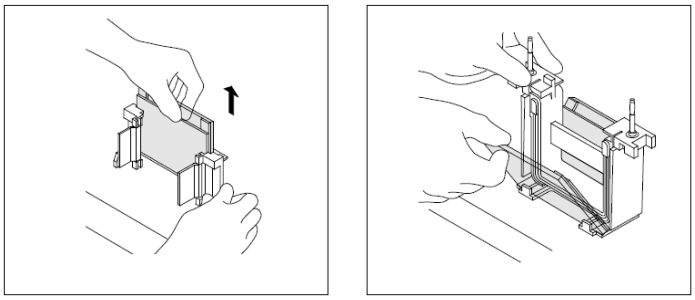
Tabulka 2. Složení směsi pro nalévání gelu

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_2O	3,400	H_2O	3,950
Celkový objem	**5,000**	**Celkový objem**	**10,000**

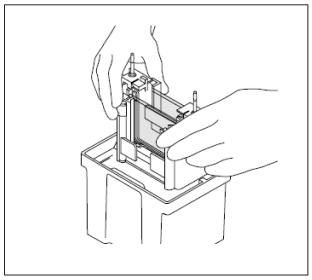
Sestavení aparatury pro SDS-PAGE

a. Vyjměte skla z nalévacího rámečku a umístěte každé sklo do drážek v elektrodovém držáku. Skla musí být umístěna tak, že kratší skla jsou orientována dovnitř směrem k sobě, čímž vytváří vaničku pro nalití pufru (obr. 5)
b. Takto připravený elektrodový držák se skly zasuňte do upínacího rámečku.
c. Gely přitlačte na zelené těsnění pomocí klipsen.
d. Upínací rámeček poté vložte do elektrodové vany.

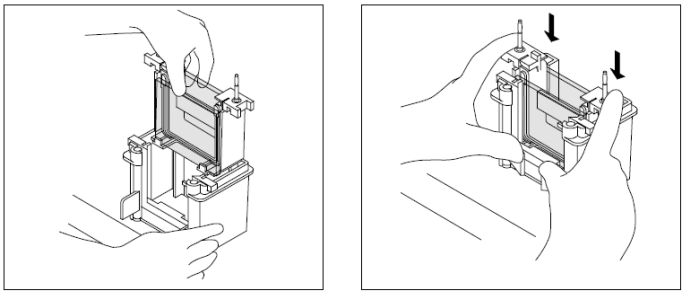
e. Do komůrky mezi skly (katodový prostor) v elektrodovém držáku nalijte elektrodový pufr (až po okraj, cca. 125 ml). Do elektrodové vany (anodový prosotor) nalijte potom asi 200 ml elektrodového pufru.



Bod a.)



Bod d.)

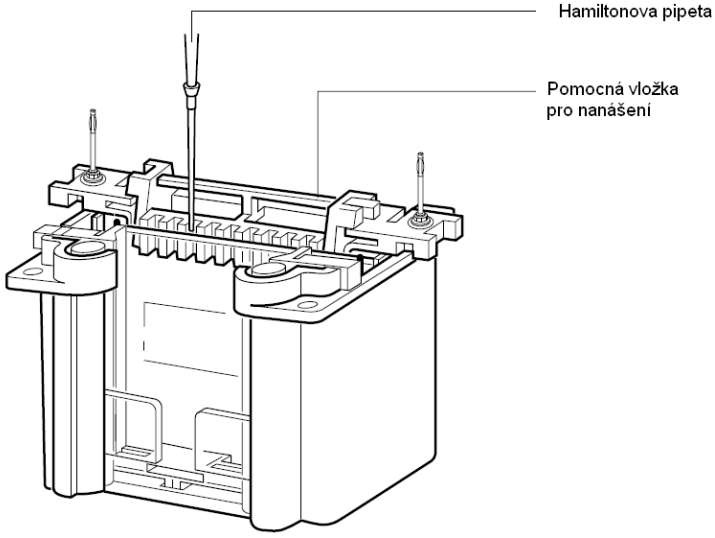


Bod c.) Bod c.)

Obr. 5. Sestavení sendviče pro SDS-PAGE

Nanesení vzorku

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



Obr. 6. Nanesení vzorku do jamek v SDS-PAGE gelu

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 7% kyseliny octové (viz bod „a“ dále).

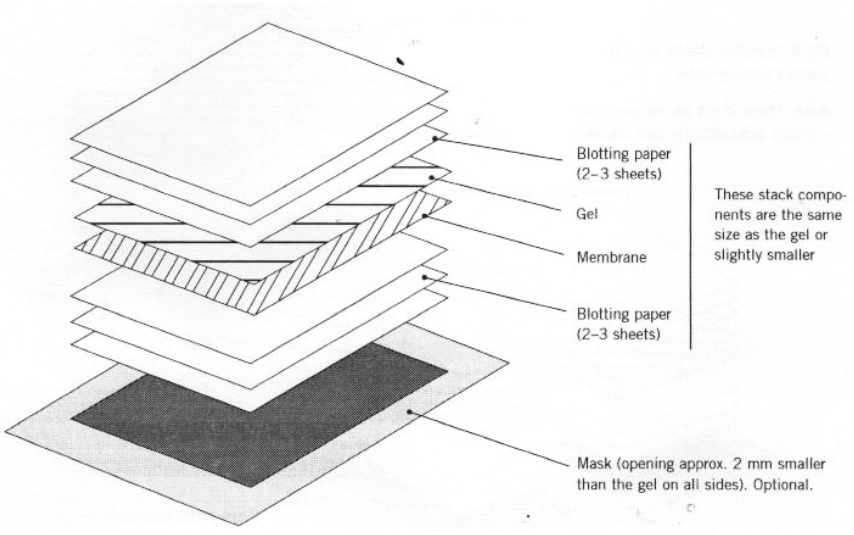
Protokol pro barvení SDS-PAGE gelů stříbrem

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

a. Ponořte gel na 7 minut do 100 ml 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 µl 30 % NaOH + 1.4 ml 14.8 M hydroxidu amonného
h. Připravte barvící 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 barvícího 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 µl 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.

Sestavení aparatury pro western blotting

a. Před složením sendviče (obr. 7) nejprve membránu ponořte do methanolu a poté ekvilibrujte v přenosovém pufru 5 minut.
b. Namočte tři filtrační papíry do přenosového pufru a umístěte je na podložku.
c. Rukavice smočte v přenosovém pufru, opatrně vezměte gel do rukou a přeneste jej na filtrační papíry.
d. Předpřipravte si další 3 filtrační papíry v přenosovém pufru.
e. Membránu opatrně uchopte pinzetou za růžek a umístěte ji na gel.
f. Ihned zakryjte vrstvou filtračních papírů.
g. Membrána musí směřovat k anodě (+).



Obr. 7. Sestavení sendviče pro semi-dry blotting

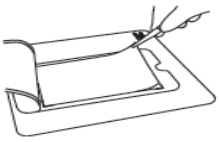
Vlastní přenos

Aparaturu připojte ke zdroji stejnosměrného napětí, nastavte konstantní napětí 30 V a nechte probíhat přenos po dobu 30 min.

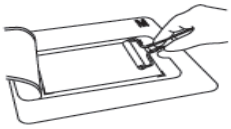
Imunochemická detekce na membráně

a. Blotovací složku uchopte za krycí stranu (modré okraje) a smočte membránovou stranu destilovanou vodou v namáčecí vaničce. **Nenamáčejte** krycí stranu. Poté přeneste namočenou složku na podložku.

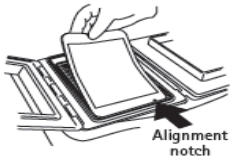
b. Je-li třeba, předmočte membránu v methanolu a vodě a umístěte ji do blotovací složky **proteinovou stranou dolů.**



c. Jemně odstraňte vzduchové bubliny válečkem, uzavřete složku a znovu přejeďte válečkem.



d. Otevřete kazetu, blot otočte proteinovou stranou nahoru a umístěte jej do kazety. Výřez ve složce usnadňuje správné umístění do kazety.

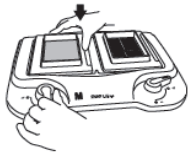


e. Zavřete a uzamkněte kazetu. Přidejte 30 ml blokovacího pufru. Inkubujte 5 min. Přitlačte kazetu dolů a otevřete přívod vakua. Jakmile je všechen roztok odsát, vypněte vakuum.

f. Na povrch membrány aplikujte 5 ml roztoku primární protilátky.

g. Inkubujte 10 min při pokojové teplotě. Roztok se vsákne do membrány a povrch se může jevit suchý. Upozornění: Nezapínejte vakuum dříve než po 10 min inkubace.

h. Přitlačte kazetu dolů a otevřete přívod vakua. Vyčkejte 5-8 s dokud nebude všechen roztok odsátý.



i. Při otevřeném přívodu vakua, přidávejte 30 ml promývacího pufru. Promývání opakujte ještě 3x (celkově 4 promytí). Vypněte přívod vakua.

j. Na povrch membrány aplikujte 5 ml roztoku sekundární protilátky. Inkubujte 10 min při pokojové teplotě. Roztok se opět vsákne do membrány a povrch se může jevit suchý.

k. Přitlačte kazetu dolů a otevřete přívod vakua. Vyčkejte 5-8 s dokud nebude všechen roztok odsátý. Při otevřeném přívodu vakua, přidávejte 30 ml promývacího pufru. Promývání opakujte ještě 3x (celkově 4 promytí).
l. Vypněte přívod vakua. Vyjměte blot ze složky a inkubujte 2 minuty v 10 ml detekčního pufru.
m. Poté slijte detekční pufr a inkubujte s 10 ml BCIP/NBT substrátu přibližně 2-5 minut.

Složení pufrů pro SDS-PAGE

Nanášecí (denaturační a redukující) pufr

250 mM Tris/HCl pH 6.8	1,25 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8
10 % SDS	0,5 g SDS
30 % glycerol	1,5 ml glycerolu
5 % β-merkaptoethanol	250 µl β-merkaptoethanolu
bromfenolová modř	přídavek zásobního roztoku do modrého zbarvení
	doplnit ddH_2O do 5 ml a rozalikvotovat

Elektroforetický pufr (10 x koncentrovaný)

TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

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

Složení pufrů pro western blotting

Přenosový pufr

Tris	3,0 g
Glycin	14,4g

Doplnit do 800 ml ddH_2O

Blokovací pufr

5% odtučněné sušené léko v 1x TBS pufru

1x TBS promývací pufr

Tris	6,05 g
NaCl	8,76 g

Rozpusit v 800 ml ddH_2O. Pomocí 1 M HCl upravit pH na 7.5 a doplit do 1 l ddH_2O.

Detekční pufr

TRIS	3,02 g
$MgCl_2$	0,25 g
NaCl	1,46 g

Upravit pH na 9.5 a doplnit do 250 ml ddH_2O.

BCIP/NBT substrát

5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP)	1,5 mg
Nitrobluetetrazolium (NBT)	3,0 mg

Rozpustit v 10 ml detekčního pufru