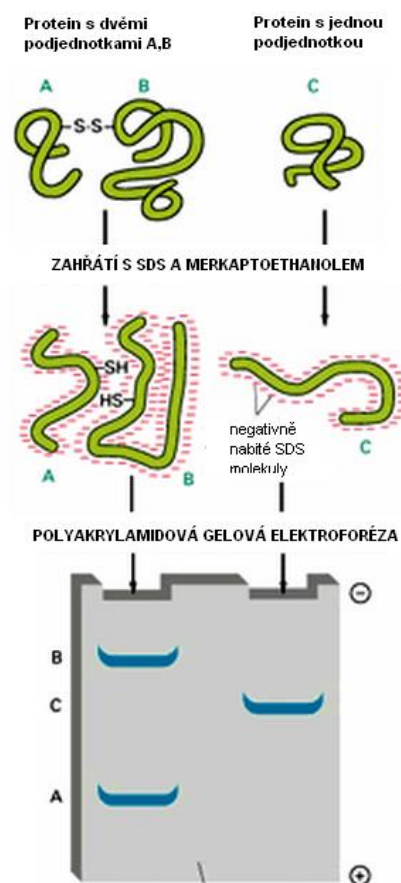


Sraz studentů v 8:00 před laboratoří A5/108, s sebou plášť a přezutí

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'-metylenbisakrylamidu (BIS), který zajišťuje zesíťování struktury polymeru.



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

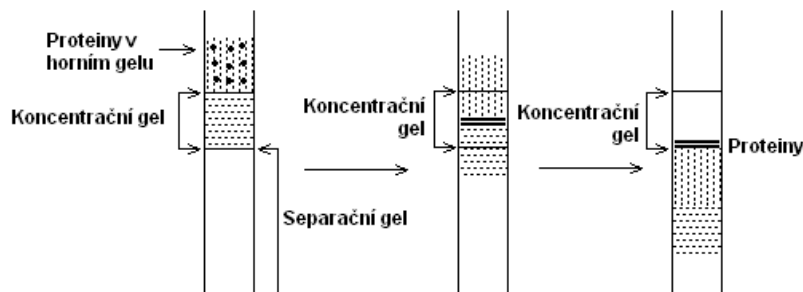
Obr. 1. Princip SDS PAGE separace

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 anionty 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.



Obr. 2. Princip diskontinuální elektroforézy

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

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

Barvení a identifikace proteinů

K barvení proteinů separovaných v **elektroforetických gelech** se využívá:

1. Barvení stříbrem: Ag^+ elektrostaticky interaguje se záporně nabitými skupinami proteinů v gelech a sulfátovou skupinou SDS. Ve vyvíjecím kroku dochází k redukci Ag^+ na Ag^0 . Vyvíjení se zastavuje vizuálně. Barvení stříbrem je nejcitlivější.
2. Barvení Coomassie Brilliant Blue: Barvivo Coomassie Brilliant Blue vytváří s proteiny komplexy, barvení probíhá do rovnováhy. Citlivější metody zahrnují barvení koloidní Coomassie.
3. Barvení fluorescenčními barvami (Sypro Ruby). Sypro Ruby vytváří s proteiny komplexy, barvení probíhá do rovnováhy. Fluorescenční barvení je citlivější než barvení Coomassie, je však velmi drahé.

K barvení proteinů na **blotovacích membránách** se využívají metody na bázi barvení Ponceau a amidočerni.

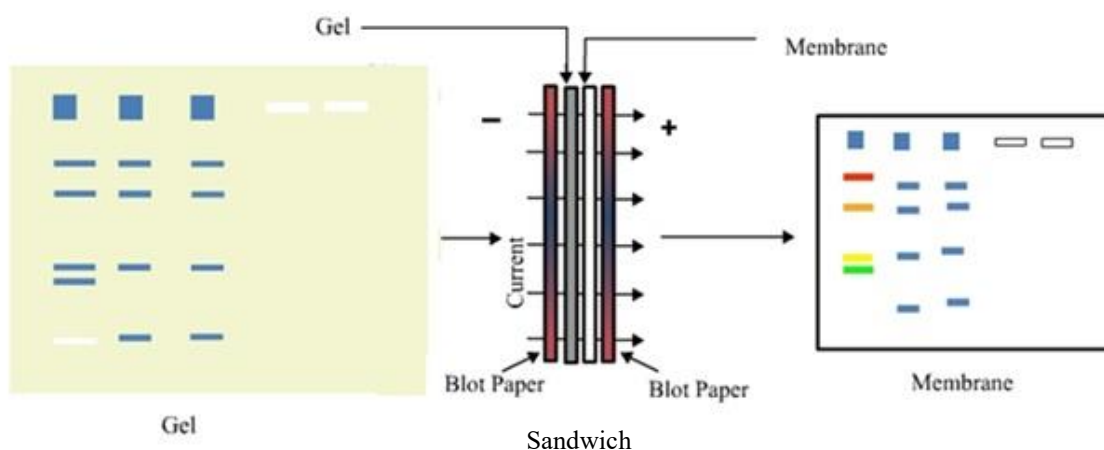
K **identifikaci proteinů** separovaných v gelech lze využít hmotnostní spektrometrie, pro sekvenaci od N-konce pak Edmanovo odbourávání.

Western blotting a imunochemická detekce proteinů

Western blotting je mikropreparativní metoda sloužící k přenosu proteinů z SDS-PAGE gelu pomocí elektrického pole na chemicky i mechanicky odolnější membránu (z nitrocelulózy nebo polyvinylidendifluoridu (PVDF)) (obrázek 3). Existují dva typy uspořádání western blottingu a to „wet blotting“ (mokrý přenos) a „semi-dry blotting“ (polosuchý přenos). Na membráně pak probíhá imunochemická detekce vybraných proteinů za pomoci primární a sekundární protilátky. Primární protilátka je specifická vůči cílovému proteinu (antigenu), neboť se váže

na sekvenci aminokyselin v cílovém proteinu zvanou epitop, která musí být specifická pro daný protein. Sekundární protilátka je pak specifická proti imunoglobulinům zvířete, ve kterém byla vytvořena primární protilátka, vytváří tedy komplex s primární protilátkou v místě jejího komplexu s antigenem. Sekundární protilátka navíc nese detekční systém (obvykle enzym – křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa), který rozkládá substrát, který po rozložení buď produkuje chemiluminiscenci (svítí) nebo viditelné zbarvení v místě komplexu antigen-primární protilátka-sekundární protilátka. Díky specifitě interakce antigen-protilátka a vysoké citlivosti detekce je možné identifikovat jeden konkrétní protein ze směsi obsahující až tisíce proteinů. Kvalita výsledků vždy velmi záleží na kvalitě primární protilátky.

V rámci cvičení provedeme zjednodušenou úlohu, v níž budeme detekovat biotinem značený protein albumin o hmotnosti 66 kDa pomocí streptavidinu značeného křenovou peroxidasou (nahrazující primární i sekundární protilátku).



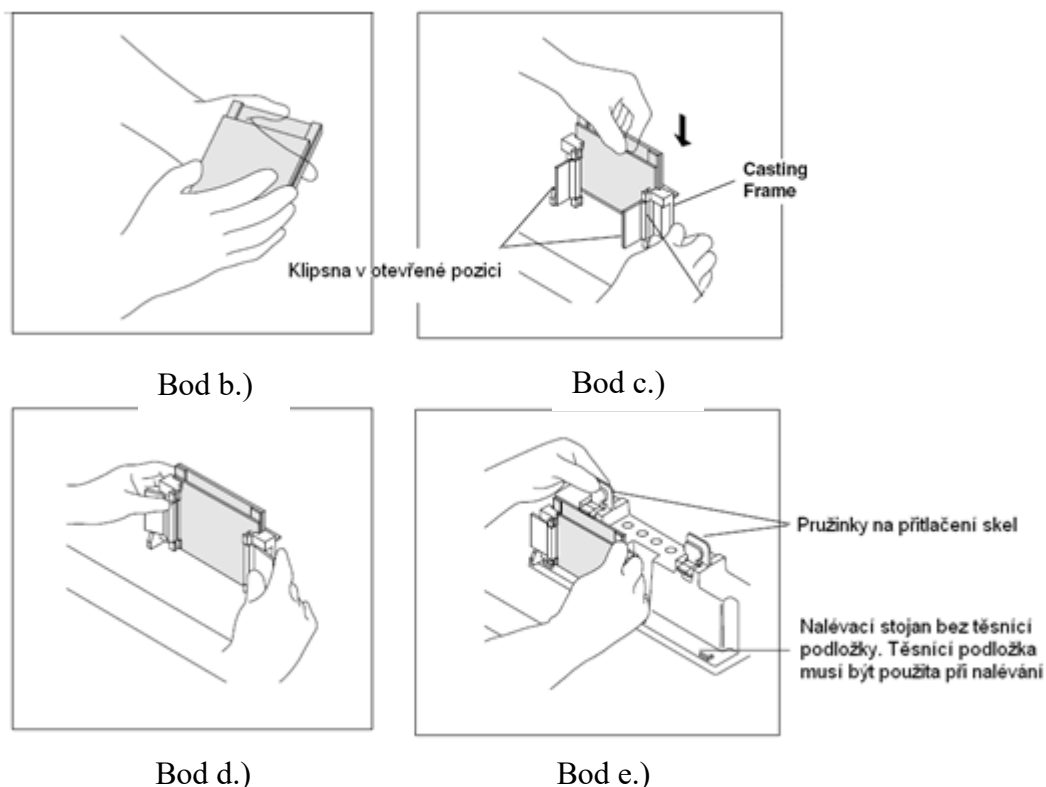
Obr. 3. Princip přenosu proteinů pomocí western blottingu

PRAKTICKÁ ČÁST

Příprava SDS-PAGE gelu

Složení kazety pro nalití gelu (viz obr. 4)

- Umístěte rámečky a nalévací stojan na rovnou podložku.
- Vezměte delší skla se spacersy 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 klipsnými zároveň.
- Umístěte nalévací rámeček se skly na nalévací stojan (nezapomeňte umístit na stojan těsnicí podložku) a přitlačte je pomocí pružinky.



Obr. 4. Sestavení nalévacího stojanu pro SDS-PAGE

Nalévání separačního gelu

- Do eppendorfký si připravte 1 ml 10% roztoku persíranu amonného (APS) rozpuštěním 0,1 g APS v 0,9 ml dd H₂O. Na základě tabulky 2 namíchejte směs pro 10 % separační gel do 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 neurotoxicke 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 vody.
- 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

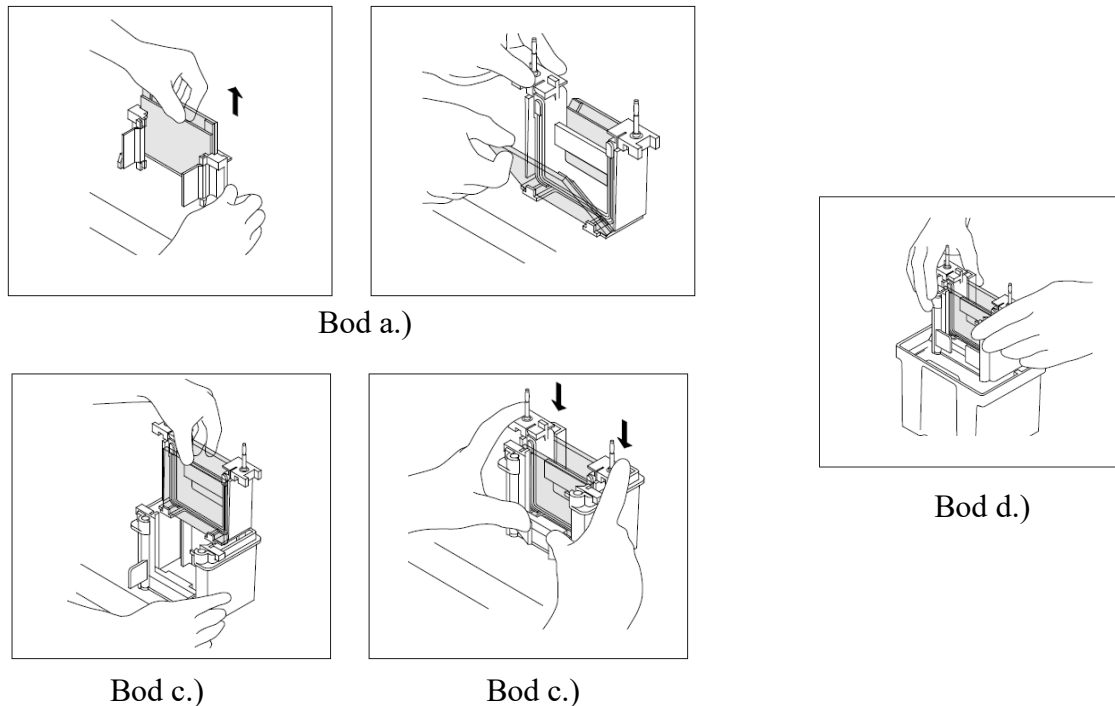
- Na základě tabulky 2 namíchejte směs pro 5 % koncentrační gel do kádinky. Jako poslední opět přidávejte persíran amonný a TEMED a opět promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný.**
- Pomocí 5 ml pipety nalijte 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

(2.) 5% (T) koncentrační gel		(1.) 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 pro SDS-PAGE

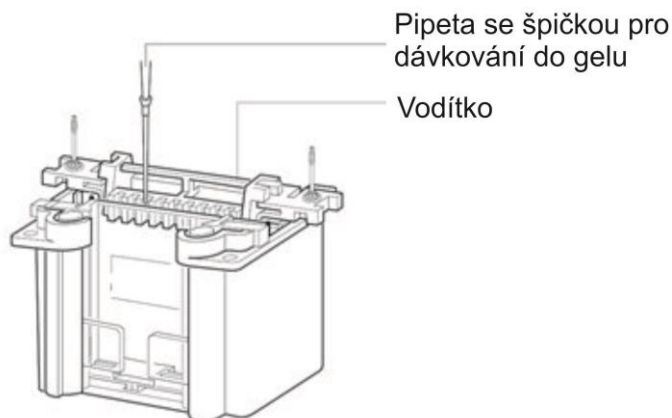
- Vyjměte skla z nalévacího rámečku a umístěte každé sklo do drážek v elektrodevém držáku. Skla musí být umístěna tak, že kratší skla jsou orientována dovnitř směrem k sobě, čímž vytváří vaničku pro nalití pufru (obr. 5)
- Takto připravený elektrodevý držák se skly zasuňte do upínacího rámečku.
- Gely 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.



Obr. 5. Sestavení aparatury pro SDS-PAGE

Nanesení vzorku

- Před nanesením umístěte vzorek a směsi 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 tzv. vodítko pro nanášení vzorku.
- Do jednotlivých jamek nanášejte pomocí pipety se speciálními špičkami pro dávkování vzorků do gelu vzorky a standarty podle rozpisu. Obvykle se nanáší 20-30 μg celkového proteinu na jamku.



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

V rámci cvičení provedeme separaci proteinových vzorků ve dvou gelech:

V gelu 1 budeme separovat: dvě směsi proteinových standardů o známých molekulových hmotnostech (obarvený a neobarvený standard), hovězí sérový albumin (66 kDa), hovězí krevní sérum (2,5 μg , 10 μg a 25 μg) a bakteriální lyzát (2,5 μg , 10 μg a 25 μg). Gel 1 bude následně obarven stříbrem.

V gelu 2 budeme separovat: směsi proteinových standardů o známých molekulových

hmotnostech (obarvený standard), bakteriální lyzát a bakteriální lyzát obsahující biotinylovaný albumin. U gelu 2 bude proveden western blotting a protein-specifická detekce.

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

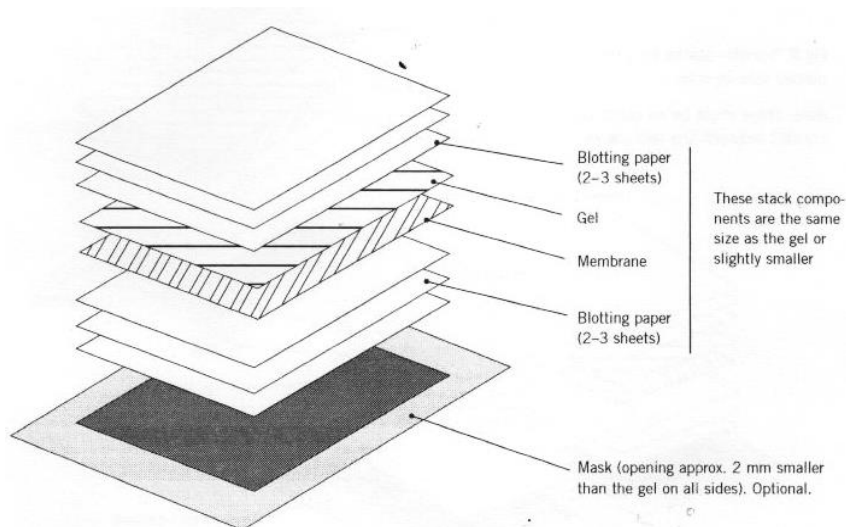
Provádějte na třepačce na rychlost „pomalu“, vyvíjení a zastavování vyvíjení na rychlost „rychle“

- 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 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.

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 dva blotovací 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 dva blotovací papíry v přenosovém pufru.
- e. Membránu opatrně uchopte pinzetou za růžek a umístěte ji na gel.
- f. Ihned zakryjte vrstvou blotovacích papírů.

- g. Obráťte sendvič tak, aby membrána byla pod gelem (dle obr. 7), tzn. aby proteiny migrovaly z gelu na membránu ve směru k anodě (+), které se nachází v aparatuře **dole**.



Obr. 7. Sestavení sendviče pro semi-dry blotting

Vlastní přenos

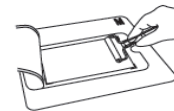
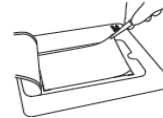
Aparaturu připojte ke zdroji stejnosměrného napětí, nastavte konstantní proud 30 mA a nechte probíhat přenos po dobu 60 min.

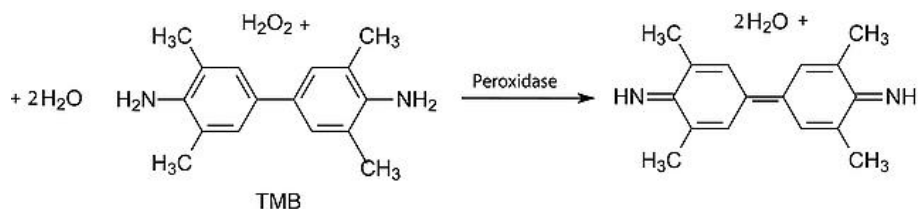
Barvení membrány na celkový protein pomocí Ponceau S

1. Po ukončení western blottingu ponořte membránu do roztoku 1x Ponceau S a obarvěte do vizualizace.
2. Srovnejte obarvení drah obou porovnávaných vzorků.
3. Membránu odbarvěte v destilované vodě.

Detekce proteinů na blotovací membráně

- a. Blotovací složku uchopte za krycí stranu (modré okraje) a smočte membránovou stranu destilovanou vodou v namáčecí vaničce asi na 20 s. **Nenamáčejte** modrou krycí stranu. Poté přeneste namočenou složku na podložku.
- b. Membránu umístěte do blotovací složky **proteinovou stranou dolů** (=strana, která byla při blotování u gelu – označte si ji křížkem propiskou).
- c. Uzavřete blotovací složku a jemně odstraňte vzduchové bubliny válečkem.
- d. Otevřete kazetu v aparatuře, blotovací složku otočte tak, aby proteinová strana membrány byla nahoře, a umístěte ji do kazety. Výřez ve složce usnadňuje správné umístění do kazety.
- e. Uzavřete kazetu. Přidejte 30 ml blokovacího pufru. Inkubujte 5 min. Přitlačte kazetu dolů a otevřete přívod vakua. Jakmile je všečen roztok odsát, vypněte vakuum.
- f. Na povrch membrány aplikujte 4 ml roztoku streptavidinu značeného křenovou peroxidasou (HRP).
- g. Inkubujte 10 min při laboratorní teplotě. Roztok se vsákne do membrány a povrch se může jevit suchý, přesto nezapínejte vakuum dříve než po 10 min inkubace.
- h. Přitlačte kazetu dolů a otevřete přívod vakua. Vyčkejte, dokud nebude všečen roztok odsátý.
- i. Při otevřeném přívodu vakua přidávejte 30 ml 1x TBS promývacího pufru. Promývání opakujte ještě 3x (celkově 4 promytí).
- j. Vypněte přívod vakua. Vyjměte blotovací membránu z blotovací složky a ve 2 ml předpřipraveného roztoku HRP substrátu na bázi 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB) – princip viz obr. 8.
- k. Pozorujte vývin modrého zbarvení ve vzorku obsahujícím biotinylovaný albumin, inkubujte do vizualizace.





Obr. 8. Princip enzymatické přeměny 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB), substrátu křenové peroxidasy, na modře zbarvený produkt.

Příprava roztoků 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 -merkapt ethanol	250 μ l β -merkapt ethanolu
bromfenolová modř	přídavek zásobního roztoku do modrého zbarvení
	doplnit ddH ₂ O do 5 ml a rozalíkovat

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, roztok má pH= 8,8). Před použitím se desetkrát zředí deionizovanou vodou.	

Příprava roztoků pro western blotting

Tris-glycin pufr

Tris	3,0 g
Glycin	14,4g
Doplnit do 800 ml ddH ₂ O	

Přenosový pufr

Tris-glycin pufr	40 ml
100% methanol	10 ml

1x TBS pufr

Tris	6,05 g
NaCl	8,76 g
Rozpustit v 800 ml ddH ₂ O. Pomocí 1 M HCl upravit pH na 7,5 a doplnit do 1 l ddH ₂ O.	

Blokovací pufr

0,5% odtučněné sušené mléko v 1x TBS pufru

Streptavidin značený křenovou peroxidasou

4 ml 1x TBS pufru
1,5 μ l zásobního roztoku streptavidinu značeného křenovou peroxidasou (HRP)

Předpřipravený roztok HRP substrátu

Sigma-Aldrich kat.č. T9455