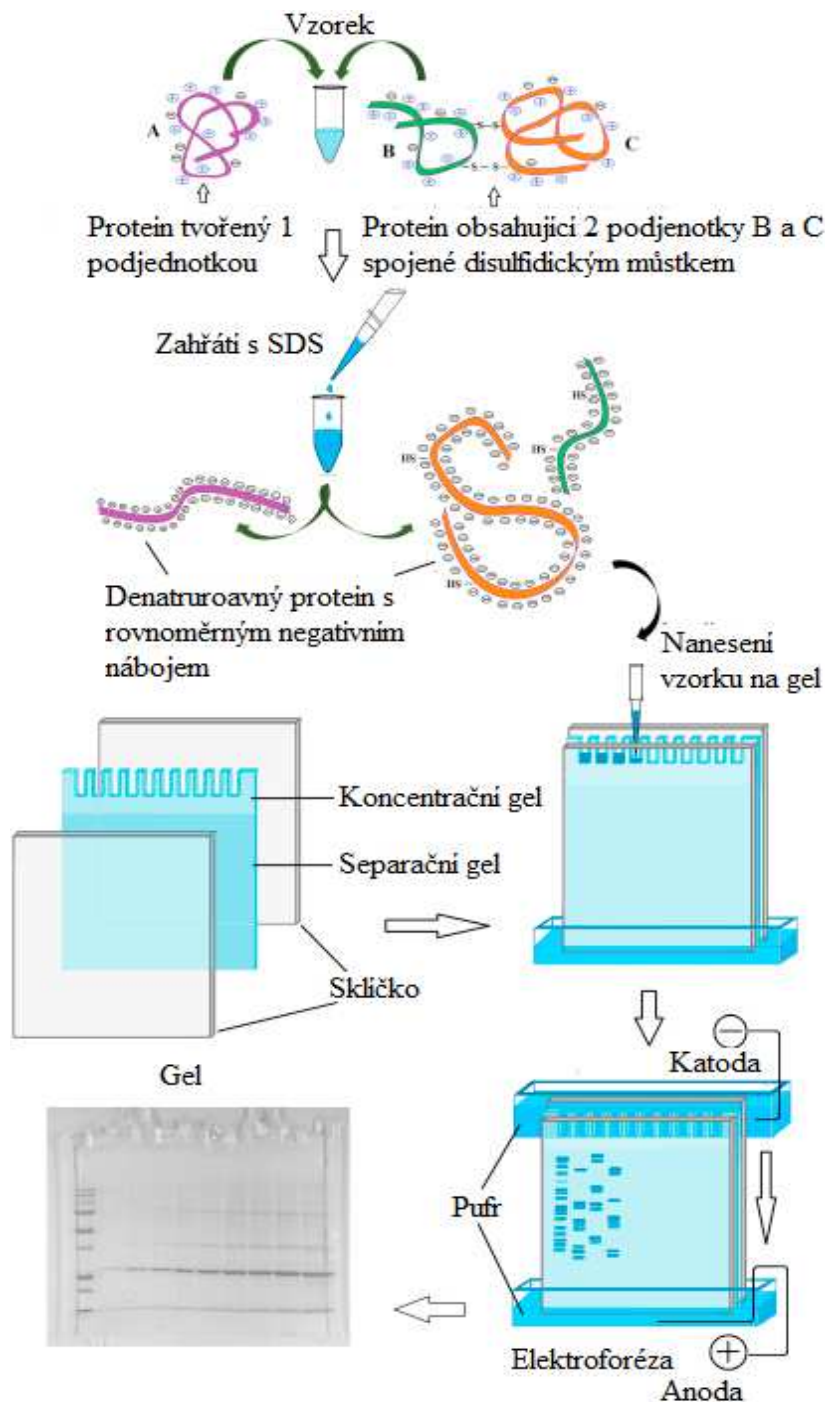


2. Úloha, Příprava gelu pro metodu SDS-PAGE

Elektroforetické metody se používají pro separaci látek (např. proteinů nebo nukleových kyselin), buněk nebo jiných částic nesoucích elektrický náboj. Pohyblivost molekul závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí a síle elektrického pole. Pro dělení proteinů se nejčastěji používá polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE).

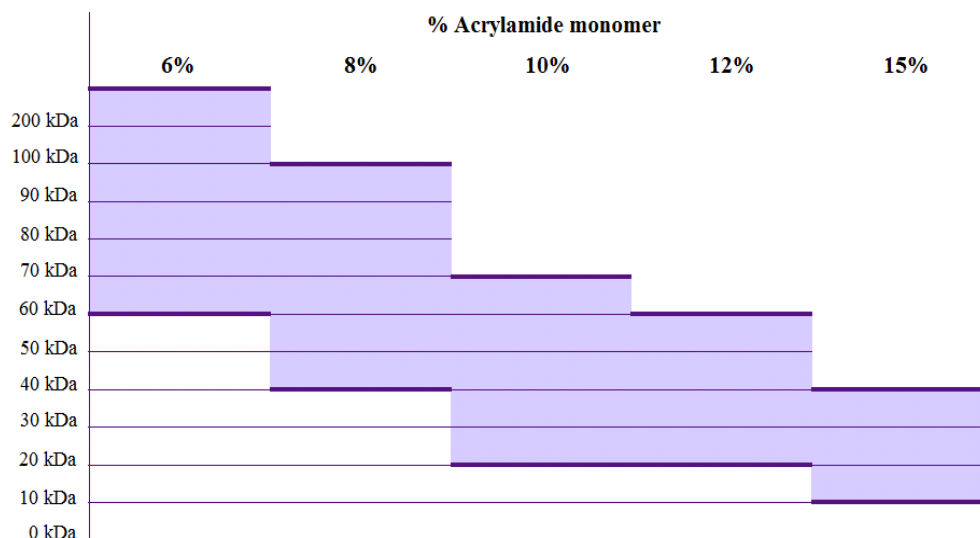
Elektroforetická metoda SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát - polyakrylamidová gelová elektroforéza) patří k základním technikám umožňujícím úspěšnou identifikaci a charakterizaci proteinů v biologickém vzorku. SDS-PAGE slouží k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Dodecylsírán sodný (SDS) je anionaktivní detergent schopný „maskovat“ náboj studovaných bílkovin, kdy výsledné komplexy SDS-bílkovina mají stejnou hodnotu povrchového náboje. Zahřátím vzorku proteinů v denaturujícím a redukujícím pufru dochází k denuraci proteinů včetně odstranění disulfidových můstků a jejich obalení molekulami dodecylsulfátu sodného (SDS), který udělí proteinům celkový záporný náboj. Což je způsobeno specifickou vazbou detergentu, 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). V průběhu této migrace jsou proteiny separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu (Obrázek 1.). Separace pak probíhá na základě velikosti molekul separovaných látek. Při použití standardu je možné stanovit molekulovou hmotnost proteinů v testovaném vzorku. 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.



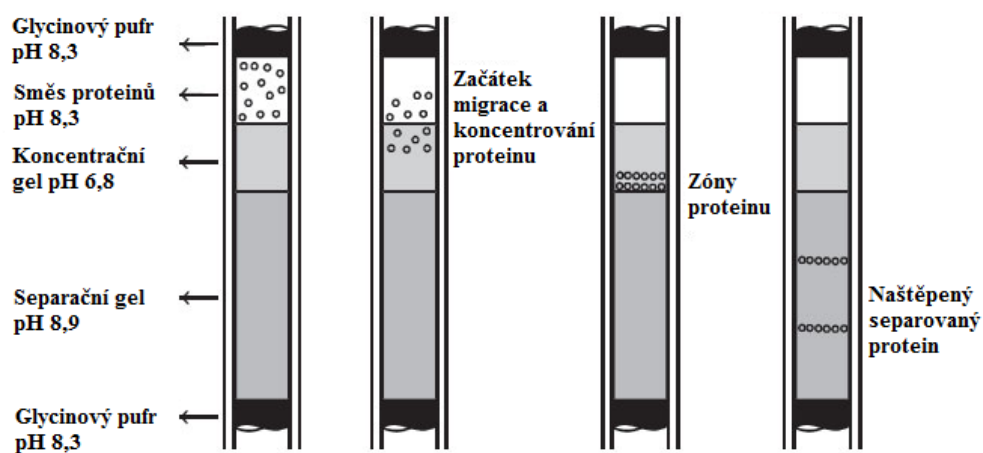
Obrázek 1. Schéma polyakrylamidové gelové elektroforézy

Koncentrace monomeru akrylamidu použitého k přípravě gelu se volí podle velikosti proteinů, které chceme separovat. Nízká koncentrace monomeru se používá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco vysoká koncentrace se používá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti (Obrázek 2). Vlastní monomer je směsí akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), který zajišťuje zesíťování struktury v polymeru.



Obrázek 2. Separáčnı schopnosti SDS-PAGE gelů.

V praxi se pro separace proteinů velmi často používá tzv. diskontinuální elektroforéza skládající se ze dvou gelů, koncentračního a separáčního (Obrázek 3). Tyto gely mají různá pH a také různou koncentraci monomeru. Koncentračnı 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 separáčním gelu. Díky tomu v koncentračním a separáčním gelu panují odlišné separáčnı podmínky. Kromě iontů glycinu se v systému nacházejí také anionty proteinů, anionty chloridu a kationty (protionty) TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan).



Obrázek 3. Princip diskontinuální elektroforézy.

V prvním - koncentračním gelu se aniony řadí následovně dle mobility: 1. chloridy 2. proteiny 3. glycin. V této situaci (řídý gel) dochází k zúžení (isotachoretickému 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.

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

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

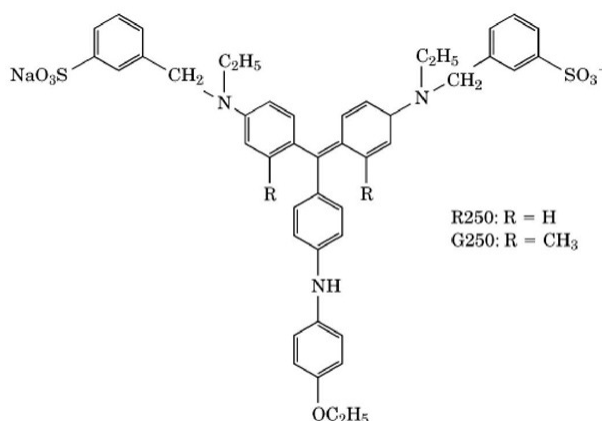
Barvení a identifikace proteinů

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 způsob.
2. Barvení Coomassie Brilliant Blue: Barvivo Coomassie Brilliant Blue vytváří s proteiny komplexy, barvení probíhá do ustavení rovnováhy. Citlivější metody zahrnují barvení koloidním typem barviva Coomassie Brilliant Blue. Koloidní barvení se provádí 0.08% CBB v prostředí 8% síranu amonného, 1.6% kyseliny fosforečné a 20% methanolu (v/v, aq.).
3. Barvení fluorescenčními barvami (Sypro Ruby). Sypro Ruby vytváří s proteiny komplexy, barvení probíhá do ustavení 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 amidočerní.

Nejčastěji se využívá modré barvivo Coomassie Brilliant Blue (G-250, R-250), (Obrázek 4), barvení se provádí v kyselém prostředí (7% k. octová). Protein je tak fixován v gelové struktuře a pozitivně nabit, což umožňuje vazbu barviva, které se váže i hydrofobními interakcemi. Tento způsob barvení má citlivost okolo 0,1 mg. Odbarvování gelu se provádí roztokem methanolu a kyseliny octové (koncentrace dle požadované rychlosti odbarvování).

Pozn. Podobně jako u mnoha jiných barviv, nese použité barvivo „Coomassie“ jméno po místním africkém názvu, v tomto případě ghanském městě Kumasi. Barva byla vyvinuta jako barvicí prostředek pro vlnu a pojmenována jako připomínka britské okupace hlavního města ghanského království Ashanti v r. 1896, nesoucího tenkrát domorodé jméno Coomassie.



Obrázek 4. Triarylmetanové barvivo Coomassie Brilliant Blue R250 a G250.

Výhody a nevýhody SDS-PAGE

Výhody:

- *anionický detergent*
- *po zahřátí na 100 °C rozbaluje protein a váže se na něj*
- *velký náboj → velká pohyblivost*
- *vysoké rozlišení*
- *dobrá fixace bandů*
- *lze odstranit z gelu, aniž by se uvolnily proteiny*
- *10x vyšší detekční limit než nativní ELFO*

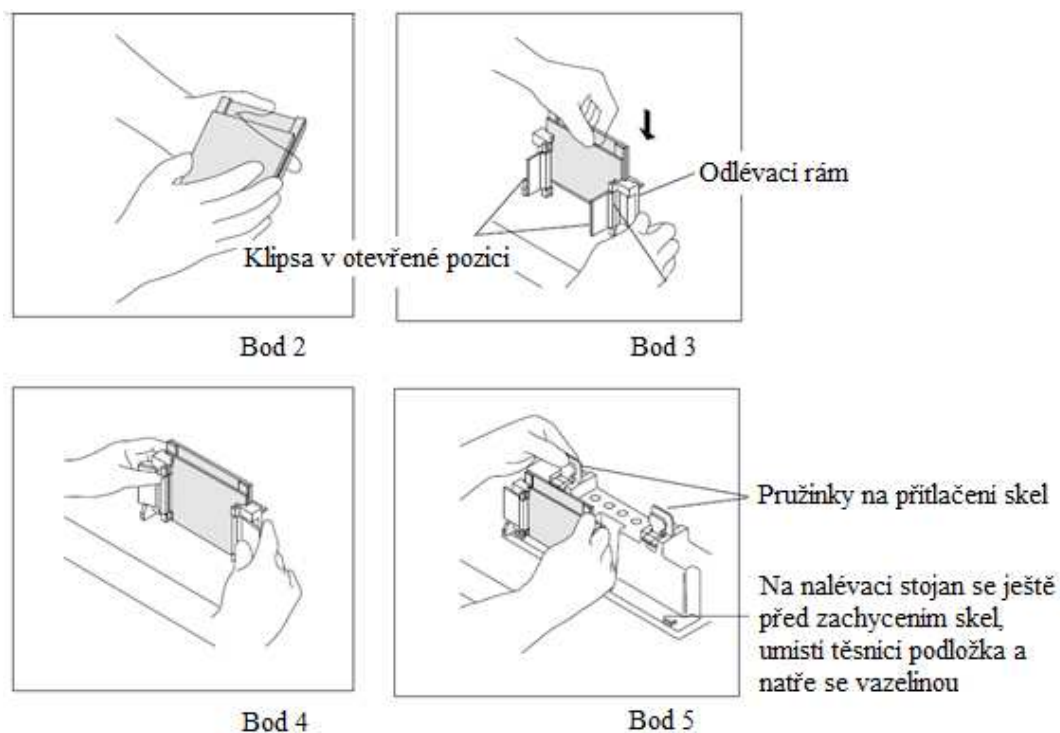
Nevýhody:

- *za nízkých teplot gel krystalizuje*
- *mnoho proteinů se chová anomálně: –*
 - *v důsledku neuniformní vazby SDS –*
 - *proteiny s velkým záporným, velkým kladným nábojem a na prolin bohaté proteiny*

Praktická část**Příprava SDS-PAGE gelu**

Postup složení kazety pro nalití gelu: (viz. Obrázek 5)

1. Umístěte rámečky a nalévací stojan na rovnou podložku.
2. Vezměte delší skla se spacers o tloušťce 1.0 mm a umístěte na ně kratší skla.
3. Umístěte skla do nalévacího rámečku tak, že popis na delším skle je orientován nahoru.
4. Zaklapněte skla oběma klipsy zároveň.
5. Umístěte nalévací rámeček se skly na nalévací stojan (nezapomeňte umístit na stojan těsnící podložku natřenou vazelínou) a přitlačte je pomocí pružinky. Obr. 4.



Obrázek 5. Sestavení nalévacího stojanu pro přípravu gelu.

Tabulka 1. Popis přípravy gelů pro SDS-PAGE.

15% resolving gel								
number of gels	1	2	3	4	5	6	7	8
30% acrylamide	2,49 ml	4,98 ml	7,47 ml	9,96 ml	12,45 ml	14,94 ml	17,43 ml	19,92 ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
4 \times resolving buffer	1,25 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6,25 ml	7,5 ml	8,75 ml	10 ml
ddH ₂ O	1,16 ml	2,32 ml	3,48 ml	4,64 ml	5,8 ml	6,96 ml	8,12 ml	9,28 ml
10% APS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
TEMED	3 μ l	6 μ l	9 μ l	12 μ l	15 μ l	18 μ l	21 μ l	24 μ l

12,5% resolving gel								
number of gels	1	2	3	4	5	6	7	8
30% acrylamide	2,08 ml	4,16 ml	6,24 ml	8,32 ml	10,4 ml	12,48 ml	14,56 ml	16,64 ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
4 \times resolving buffer	1,25 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6,25 ml	7,5 ml	8,75 ml	10 ml
ddH ₂ O	1,57 ml	3,14 ml	4,71 ml	6,28 ml	7,85 ml	9,42 ml	10,99 ml	12,56 ml
10% APS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
TEMED	3 μ l	6 μ l	9 μ l	12 μ l	15 μ l	18 μ l	21 μ l	24 μ l

10% resolving gel								
number of gels	1	2	3	4	5	6	7	8
30% acrylamide	1,67 ml	3,34 ml	5,01 ml	6,68 ml	8,35 ml	10,02 ml	11,69 ml	13,36 ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
4 \times resolving buffer	1,25 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml	6,25 ml	7,5 ml	8,75 ml	10 ml
ddH ₂ O	1,98 ml	3,96 ml	5,94 ml	7,92 ml	9,9 ml	11,88 ml	13,86 ml	15,84 ml
10% APS	50 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l	250 μ l	300 μ l	350 μ l	400 μ l
TEMED	3 μ l	6 μ l	9 μ l	12 μ l	15 μ l	18 μ l	21 μ l	24 μ l

5% stacking gel								
number of gels	1	2	3	4	5	6	7	8
30% acrylamide	250 μ l	500 μ l	750 μ l	1 ml	1,25 ml	1,5 ml	1,75 ml	2 ml
10% SDS	16 μ l	32 μ l	48 μ l	64 μ l	80 μ l	96 μ l	112 μ l	128 μ l
4 \times stacking buffer	396 μ l	792 μ l	1,188 ml	1,584 ml	1,98 ml	2,376 ml	2,772 ml	3,168 ml
ddH ₂ O	812 μ l	1,624 ml	2,436 ml	3,248 ml	4,06 ml	4,872 ml	5,684 ml	6,496 ml
10% APS	24 μ l	48 μ l	72 μ l	96 μ l	120 μ l	144 μ l	168 μ l	192 μ l
TEMED	1 μ l	2 μ l	3 μ l	4 μ l	5 μ l	6 μ l	7 μ l	8 μ l

Postup přípravy - Nalévání separačního gelu

1. Na základě Tabulky 1 namíchejte směs pro 10 %, 12,5 % a nebo 15% SDS-PAGE separační gel (dle domluva s vedoucím) 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, pak opět promíchejte. **Pracujte v digestoři – směs monomerů má neurotoxické a potenciálně karcinogenní účinky, polymer je však již zdraví neškodný!!!**
2. Pomocí 1 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla tak, aby od okraje kratšího skla zůstala mezera cca 1 cm.
3. Převrstvěte opatrně nalitý gel tenkou vrstvou vody (1 ml).
4. Po 30 minutách pomocí filtračního papíru odsajte vodu na povrchu polymerovaného gelu.

Nalévání koncentračního gelu

1. Na základě Tabulky 1 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!!!**
2. Pomocí 1 ml pipety nalijte připravený gel mezi připravená skla na již ztuhlý separační gel tak, aby koncentrační gel byl nalit až po okraj kratšího skla.
3. Poté opatrně zasuňte mezi skla hřebínek o tloušťce 1.0 mm.
4. Po 20 minutách vyndejte nalévací rámeček se skly z nalévacího stojanu, gel vyjměte z odlévacího rámu a opláchněte jej destilovanou vodou, zabalte gel do mokrého ubrousku, vše vložte do zipového sáčku a uložte do lednice.