

Separace proteinů pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE)

Úloha do laboratorního cvičení – Speciální metody
pro magisterské studium Ústav chemie-Analytická chemie, jarní semestr

1. Teorie k SDS-PAGE

Gelová elektroforéza patří mezi elektromigrační analytické metody. Účinkem stejnosměrného elektrického pole v roztoku elektrolytu se analyty dělí na základě jejich rozdílné pohyblivosti. Velikost náboje, velikost a tvar molekul, podmínky prostředí (pH) a síla elektrického pole určují vlastnosti migrace analytu. Elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ nabitých částic analytů se definuje jako rychlost iontů v v elektrickém poli o jednotkové intenzitě E :

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Jiná rovnice pohyblivosti iontů vyjadřuje vztah mezi nábojem iontu Q a rychlosti v :

$$\mu = \frac{Q}{6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v} \quad (2)$$

Vyplývá z ní, že více objemné částice s malým elektrickým nábojem se budou pohybovat pomaleji než částice objemné s velkým nábojem. Jednotka pohyblivosti je $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$.

Gelová elektroforéza (dále jen GE) se dělí z různých hledisek. Dle uspořádání rozlišujeme vertikální nebo horizontální elektroforézu. Elektroforéza může být provedena v kontinuálním pufrovém systému nebo v diskontinuálním pufrovém systému. Diskontinuální systém tvoří dvě části gelu. V prvním, zaostřovacím gelu, dochází k izotachoforéze a v druhém gelu se látky separují. Dle prostředí, ve kterém se analyty separují, gelovou elektroforézu rozlišujeme jako SDS PAGE (GE v denaturujícím prostředí) a Native PAGE (nativní GE v nedenaturujícím prostředí).

GE se využívá k určení molekulové hmotnosti analytu pomocí srovnání retenčního faktoru analytu a standardu. *Retenční faktor* R_f je parametr, který je přímo závislý na elektromigrační dráze neznámé

bílkoviny a a nepřímo úměrný celkové délce elektroforézy b . Čelo separace se detekuje látkou, která se v gelu nezadrží. (např. bromfenolová modř, methylenová modř)

$$R_f = \frac{a}{b} \quad (3)$$

PAGE vyjadřuje zkratku pro polyakrylamidový gel, který je nosičem pro GE. Mechanická pevnost, průhlednost, inertnost a možnost přípravy materiálu s různým stupněm zesíťování a polymerace charakterizují PAGE. Akrylamid (AA), který se používá jako monomer pro přípravu tohoto gelu, je neurotoxický a kumuluje se v organismu. Proto se s ním manipuluje jen s ochrannými pomůckami. Kopolymerační reakci se účastní zesíťovací činidlo N, N' -metylenbisakrylamid (tzv. BIS). Radikálová polymerace začne probíhat až v přítomnosti volných radikálů a katalyzátoru. Peroxodisíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) slouží jako chemické iniciační činidlo. Polymeraci brání kyslík, který se odstraní katalyzátorem N, N, N', N' -tetramethylenethyldiamin (TEMED).

Veličiny %T a %C definují vlastnosti gelu. Celkovou procentuální koncentraci monomeru AA a zesíťovacího činidla (BIS) určuje %T. Charakterizuje ji rovnice:

$$\%T = \frac{g(\text{AA}) + g(\text{BIS}) \cdot 100\%}{\text{ml}(V_{\text{celkový}})} \quad (4)$$

Procentuální koncentraci činidla způsobujícího prostorové zesíťování polymeru (BIS) ve směsi, se počítá pomocí %C:

$$\%C = \frac{g(\text{BIS}) \cdot 100\%}{g(\text{AA}) + g(\text{BIS})} \quad (5)$$

Použijeme $T = 30\%$ a $C = 2,67\%$.

Elektroforéza v denaturujícím prostředí SDS PAGE se od Nativní GE liší tím, že separuje proteiny pouze na základě jejich molekulové hmotnosti (tvaru a velikosti). Kdežto v Nativní GE se bílkoviny rozdělují v nendenurovaném prostředí nejen podle molekulové hmotnosti (tvaru a velikosti), ale i dle náboje.

SDS je název odvozený od dodecylsíranu sodného. Hydrofobní interakcí se tento detergent váže na bílkoviny v množství asi 1,4 mg na 1 mg bílkoviny. Po reakci vytvoří komplex s proteiny a tím i jediný

záporný náboj. Proto látky putují ke kladně nabitě elektrodě, tedy k anodě, dle jejich molekulové hmotnosti. Před denaturací musí dojít k redukci disulfidických můstků a to pomocí dithiothreitolu nebo dle 2-merkaptoethanolu.

SDS PAGE se provádí většinou dle protokolu podle Lämmliho (i v našem případě).

V Nativní GE si proteiny zachovávají své přirozené vlastnosti. Záleží zde na pI proteinu a pH elektroforetického pufru. Pro udržení biologické aktivity proteinu a jeho dostatečného pohybu v gelu, se musí volit vhodný rozsah pH elektroforetického pufru. Záporný náboj získají proteiny v pH pufru větším než pI bílkoviny. K záporné elektrodě (ke katodě) se budou pohybovat bílkoviny v pH pufru nižším než je jejich pI . Nulový náboj nastane v případě rovnosti pH pufru a pI bílkoviny, čímž se látky nebudou pohybovat v elektrickém poli.

K detekci proteinů se využívá různá vizualizace barvením. Mezi nejvíce používané metody patří barvení stříbrem, modří Coomassie Brilliant G-250 (CBB R-250), modří Coomassie Brilliant R-250 nebo rubínovou SYPRO. Další zpracování gelu rozhoduje o volbě barvení proteinu. Pro MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) se používá CBB R-250 a G-250, pro spojení GE s laserovou ablací a s indukčně vázaným plazmatu (ICP MS) je vhodnější barvení stříbrem.

1.1. Formulace úkolu

Separovat neznámý vzorek pomocí gelové elektroforézy na polyakrylamidové nosiči a podle žebříčku standardů neznámý vzorek identifikovat.

2. Provedení SDS-PAGE

Použité přístroje:

Mini-Protean[®] 3 Cell (Bio-Rad, Philadelphia, USA)

PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, Philadelphia, USA)

Třepačka CFL (Schüttelapparate Shakers, Burgwedel, Německo)

pH metr (CyberScan pH 510 a Ion 510, Helago, Česká republika)

Váhy (Ohaus, Vitrum, Česká republika)

Samotné laboratorní cvičení je uspořádané do následujících částí:

- 2.1. Použité chemikálie a roztoky
- 2.2. Příprava vzorků
- 2.3. Příprava polyakrylamidového nosiče pro separaci za denaturujících podmínek
- 2.4. Vizualizace gelu
- 2.5. Otázky k diskusi

Pozn. S akrylamidem, tedy s gelem se vždy pracuje v rukavicích (tzn. jakákoliv manipulace s ním : vážení, příprava, barvení atd.) !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

2.1. Použité chemikálie a roztoky

Pro průběh gelové elektroforézy jsou potřebné následující roztoky. Na začátku laboratorního cvičení si zkontrolujete zda některý z roztoků nechybí a bude-li třeba jeho nachystání.

i) zaostřovací koncentrační pufr $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8:

Navážte 6,00 g Tris a rozpust'ete v ~ 60 ml vody, po úpravě hodnoty pH na 6,8 pomocí 6 mol.l^{-1} HCl, doplňte po rysku na celkový objem 100 ml Uchovávejte při 4 °C v plastové nádobě.

ii) rozlišovací dělicí pufr $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,8:

Navážte 27,26 g Tris a rozpust'ete v ~ 80 ml vody, po úpravě hodnoty pH na 8,8 pomocí 6 mol.l^{-1} HCl, doplňte po rysku na celkový objem 150 ml Uchovávejte při 4 °C v plastové nádobě.

iii) běžící pufr 10-krát koncentrovanější, pH 8,3:

Navážte 30,30 g Tris + 144,00 g glycinu + 10,00 g SDS a rozpust'ete v ~ 850 ml vody. Není třeba upravovat hodnotu pH! Dopln'ete na celkový objem 1000 ml. Pro jednu separaci je třeba pufr 10x zredit do objemu 500 ml. Uchovávejte při 4 °C v plastové nádobě.

iv) 10% APS:

Navážte 100 mg APS a rozpust'ete v 1 ml vody. Je třeba připravovat vždy čerstvý!

v) Akrylamid / Bis (30 %T, 2,67 %C):

Navážte 87,6 g akrylamidu + 2,4 g N', N'-bis-methylenakrylamidu a rozpust'ete v ~ 200 ml vody, zfiltrujte a dopln'ete po rysku na objem 300 ml. Uchovávejte při 4 °C v plastové nádobě maximálně 30 dní.

vi) Vzorkovací pufr (sample buffer), SDS redukční pufr:

Napipetujte 3,55 ml dd.vody + 1,25 ml 0,5 mol.l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8 + 2,50 ml glycerol + 2,00 ml 10% (w/v) SDS + 0,2 ml 0,5% (w/v) bromfenolová modř a dopln'ete vodou do 10 ml .Uchovávat při teplotě místnosti.

vii) 10% SDS:

Navážte 10 g SDS a rozpust'ete v~ 90 ml vody, jemně míchejte, dopln'ete na celkový objem 100 ml.

2.2. Příprava vzorků

Standardy proteinů: BSA (bovine serum albumin), (Sigma, Steinheim, Německo)

Myoglobin (from horse), (Sigma, Steinheim, Německo)

Cytochrom C (from horse heart), (Sigma, Steinheim, Německo)

PRÁCE s 2-merkptoethanolem V DIGESTOŘI!!!!

Připravený roztok standardu o koncentraci 0,0001 mol.l⁻¹ je smícháno v dvojnásobném nadbytku s 2-merkptoethanolem a vzorkovacím pufrem ve vialce o objemu 0,6 ml (činidla v poměru 5,25:1, respektive). Pro denuraci proteinů si připravte objem na pět dávek v jedné vialce. Vialka se řádně označí a vloží cca na dobu 5 minut do horké vodní lázně T = 95 °C. Tím se docílí redukce disulfidických můstků v proteinech. Po vychladnutí je do jamek dávkován objem 15 µl. Vypočt'ete výslednou koncentraci standardu proteinu v dávkovací jamce, tzn. množství separovaného proteinu.

2.3. Příprava polyakrylamidového nosiče pro separaci za denaturujících podmínek

Tab. 1. Složení pro přípravu gelu o různé koncentraci

procenta gelu [%]	dd. H ₂ O [ml]	30% Akrylamid/Bis [ml]	*pufr [ml]	10% w/v SDS [ml]
4	6,1	1,3	2,5	0,1
5	5,7	1,7	2,5	0,1
6	5,4	2,0	2,5	0,1
7	5,1	2,3	2,5	0,1
8	4,7	2,7	2,5	0,1
9	4,4	3,0	2,5	0,1
10	4,1	3,3	2,5	0,1
11	3,7	3,7	2,5	0,1
12	3,4	4,0	2,5	0,1
13	3,1	4,3	2,5	0,1
14	2,7	4,7	2,5	0,1
15	2,4	5,0	2,5	0,1
16	2,1	5,3	2,5	0,1
17	1,7	5,7	2,5	0,1
18	1,4	6,0	2,5	0,1
19	1,1	6,3	2,5	0,1
20	0,7	6,7	2,5	0,1

*zaostřovací koncentrační pufr 0,5 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8

*rozlišovací dělicí pufr 1,5 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8

Polyakrylamidový gel se připravuje nalitím čerstvě homogenně zamíchané směsi. Roztok se lije mezi skla, která se musí přesně připevnit ke stojanu. Toto je nejdůležitější krok vlastní přípravy. Skla musí u sebe přesně sedět. Začíná se dělicím separačním pufrem, pro který se použije 1,5 mol.l⁻¹ Tris. Dle zvoleného procenta gelu se přidává určitý poměr AA/BIS a vody a vždy stejné množství TEMEDu (5 µl) a 10% APS (50 µl) (viz tabulka). Tato směs se nalije kapilárou nebo pomocí injekční stříkačky mezi nachystaná skla přibližně do výšky 1,5 cm od vrchní části skla. Polymerace trvá minimálně 60 minut. Pro zabránění přístupu vzduchu a vyrovnání gelu slouží butanol, který pokryje v malé vrstvě separační gel.

Zaostřovací gel (nejlépe 4%) se připravuje až po odstranění butanolu. Butanol se odlije nakloněním skel a promytím dd. (destilovaná)vody ze stříčky. Nadbytečné kapky vody se odstraní jemnou tkaninou vloženou mezi skla. Pro zaostřovací gel slouží 0,5 mol.l⁻¹ Tris. Dle zvoleného procenta gelu se přidává určitý poměr AA/BIS a vody. Vždy se použije 10 µl TEMED a 50 µl 10% APS. Vzniklou

směs zamícháme a kapilárou nebo injekční stříkačkou nalijeme na dělicí gel mezi skla a opatrně vložíme hřeben. Tento gel polymeruje a ztuhne za 45 minut. Jeho rozměr je podstatně menší než rozměr separačního gelu. Po této době se jemně vytáhnou hřebeny, tak aby se nepoškodily jejich konce. Skla se sundají ze stojanu.

Elektroforetická komora se skládá z velké průhledné plastové nádoby a bílých držáků skel. Zpolymerovaný gel mezi skly se přiloží k držáku s elektrody kratší částí skel dovnitř. Celé se zasune do většího držáku, připevní se k sobě a vše se vloží do nádoby.

Na držák skel v elektroforetické komoře se položí pomocí zařízení pro nanášení vzorků, které má označené jamky. Do hamiltonky se nasaje patřičné přesné množství vzorku (10 – 15 μ l), které se opatrně vytlačí jehlou vloženou do jamky gelu vytvořené hřebenem, tak aby se roztok nepřelil do sousedící jamky. Hamiltonka se před dalším použitím vždy nejméně 4krát vypláchne destilovanou vodou.

Po nanesení vzorků se odstraní pomocné zařízení pro jejich nanášení. Nalije se elektroforetický běžící pufr do vnitřní komory až po horní část skel a zbytek do velkého prostoru průhledné komory. Nasadí se správně víko komory. Elektrody se zapojí ke zdroji elektrického proudu, na kterém se nastaví konstantní napětí a doba zaostření **pro izotachoforézu, tj. 100 V po dobu 10 minut**. Pak se nastaví **separace při konstantním napětí 145 V po dobu 30 minut**.

Po uplynutí této doby se vypne zdroj napětí, odstraní se víko a elektroforetický běžící pufr se vylije. Skla se vyjmou z držáku a omyjí se destilovanou vodou. Uchopí se skla a opatrně se od sebe oddělají pomocí zúžené lopatky tak, aby gel zůstal na větším skle. To se překloupí a pomocí lopatky se pomalu odlepuje od skla gel do Petriho misky. Konec separace se označí nařiznutím gelu. Do misky se nalije patřičný fixační roztok pro daný typ vizualizace. Dále se postupuje dle typu barvení gelu.

2.4. Vizualizace gelu

Postup barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250:

- 1) **Fixační roztok:** 45% methanol + 10% kyselina octová
(450 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové do 1 000 ml)
- 2) **Barvicí roztok:** 45% methanol + 10% kys. octová + 0,1% CBB
(450 ml methanolu + 100 ml kys. octové + 1 g CBB do 1 000 ml)
- 3) **Odbarvovací roztok:** 5% methanol + 7,5% kys. octová
(50 ml methanolu + 75 ml kys. octové do 1 000 ml)

Gel v Petriho misce se ponoří do fixačního roztoku na 30 minut. Poté se roztok slije a na gel se dá barvicí roztok, kdy se Petriho miska s gelem uloží na 3 hodiny do ledničky (na 4 °C). Nakonec se odlije barvicí roztok a gel se umyje destilovanou vodou. Gel se ponoří do odbarvovacího roztoku. Gel v Petriho misce se položí na třepačku, na které se nastaví jen jemné třepání, aby se nepřetrhl gel. Odbarvovací roztok se vyměňuje tak často, než se objeví jen modré zóny proteinů a téměř průhledné pozadí gelu. Petriho miska s gelem po odbarvení se uchovává v ledničce.

Postup barvení gelu stříbrem:

- 1) **Fixační roztok:** methanol : kys. octová : voda v poměru 45:2:45
- 2) **0,02% roztok Na₂S₂O₃** (0,1 g Na₂S₂O₃ rozpustit a doplnit vodou na výsledný objem 0,5 l)
- 3) **0,1% roztok stříbra** (0,5 g AgNO₃ rozpustit a doplnit vodou na výsledný objem 0,5 l)
- 4) **Vyvíjecí roztok** (12,5 g Na₂CO₃, 150 µl 37% formaldehydu doplněné na 0,5 l)
- 5) **1% kyselina octová**

Ve fixačním roztoku se gel uchová po dobu 20-30 minut v ledničce. Poté se gel několikrát promyje destilovanou vodou. Ponoří se do 0,02% roztoku thiosíranu sodného na 1,5-2 minuty. Roztok se vymění za 0,1% roztok stříbra a nechá se inkubovat po dobu 30-40 minut v ledničce. Pak se gel promyje několikrát destilovanou vodou. Ponoří se do vyvíjecího roztoku a s Petriho miskou s gelem se třepe v rukách. V případě zežloutnutí gelu, se tento roztok vymění. Pro toto barvení je tento krok klíčový. Vyvíjecí roztok se musí měnit velmi často. Reakce se zastaví pomocí 1% kyseliny octové, ve které se gel uchovává v ledničce.

Roztoky se stříbrem vylévat do označené nádoby!

2.5. Otázky k diskuzi

- 1) K polymeraci gelu musí být přítomny dvě látky, které to jsou a jakou funkci plní?
- 2) Srovnajte GE s CE (kapilární elektroforézou), jejich výhody a nevýhody. Co mají společné?
- 3) Pokuste se vysvětlit, z jakého důvodu je vhodnější barvení CBB R-250 pro MALDI-TOF-MS než barvení stříbrem? A z jakého důvodu je barvení stříbrem vhodnější pro LA-ICP-MS?

Vyhodnocení protokolu

V protokolu uveďte své jméno a datum; stačí vypracovat jeden protokol za jednu skupinu. Dále připojte experimentální výsledky:

- * Vypočítejte R_f separovaných proteinů z naskenovaného gelu.
- * Identifikujte proteinu/y v neznámém vzorku a statisticky vyhodnoťte se separovanými standardy proteinů.
- * Vypočítejte výslednou koncentraci standardu proteinu v dávkovací jamce, tzn. množství separovaného proteinu.

Dále uveďte odpovědi na otázky a diskuzi výsledků.

Doporučená literatura:

J. D. Hayes, P. K. Stockman, *Br. Medj.*, 1898, **299**: 843-846.

U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**: 680-685.

J Havliš, H. Thomas, M. Šebela, A. Shevchenko, *Anal. Chem.*, 2003, **75**: 1300-1306.

Tento návod byl vytvořen v rámci projektu Tvůrčí práce studentů směřující k inovaci vzdělávací činnosti, podpořeného grantem z Fondu rozvoje vysokých škol Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (FRVŠ G4/780).