

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA**



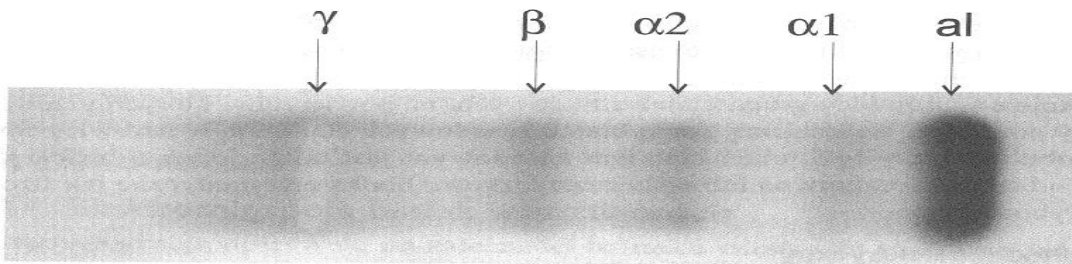
**INSTRUKCJA Z LABORATORIUM W  
ZAKŁADZIE BIOFIZYKI**

## **Ćwiczenie 2**

**ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ  
BIAŁEK**

## I. WSTĘP TEORETYCZNY

Elektroforeza jest ruchem fazy rozproszonej względem fazy rozpraszanej, zachodzącym pod wpływem przyłożonej zewnątrz różnicy potencjałów elektrycznych. Istotę zjawiska elektroforezy stanowi wędrówka w polu elektrycznym cząsteczek mających dodatni lub ujemny ładunek elektryczny i proces rozdzielania tych cząsteczek na skutek różnicy szybkości ich wędrówki w roztworze (elektroforeza swobodna) bądź w nośnikach, dokładniej w roztworach wypełniających kręte kapilary nośników (elektroforeza w nośnikach = elektroforeza strefowa = elektroforeza pasmowa). Nośnikami mogą być najróżniejsze substancje, jak bibuła oraz żele: krzemionkowy, dekstranowy, agarowy, skrobiowy, agarozowy i syntetyczny żel poliakrylamidowy. Przykładowy obraz elektroforezy białek na żelu agarozowym przedstawia poniższy rysunek 1.



**Rys.1. Elektroforeza białek na żelu agarozowym.** Na żelu agarozowym białka surowicy rozdzielają się na pięć frakcji – albuminę,  $\alpha - 1$ ,  $\alpha - 2$ ,  $\beta -$ , oraz  $\gamma$  - globuliny

Cząsteczki białek posiadają na swojej powierzchni kwaśne grupy karboksylowe, pochodzące między innymi z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz zasadowe grupy aminowe, związane z obecnością lizyny i asparaginy. W środowisku wodnym grupy karboksylowe ulegają dysocjacji elektrolitycznej, tworząc ujemnie naładowane aniony karboksylowe. Posiadające charakter zasadowy grupy aminowe łączą się z kationem wodorowym pochodzącym z roztworu, tworząc dodatnio naładowane kationy. W roztworach wodnych cząsteczki białek posiadają na swojej powierzchni zarówno ujemnie naładowane zjonizowane grupy karboksylowe, jak i dodatnio naładowane grupy aminowe. W zależności od wzajemnego stosunku ilości ujemnie naładowanych anionów i dodatnich kationów cząsteczka białka może posiadać wypadkowy ładunek ujemny, dodatni lub

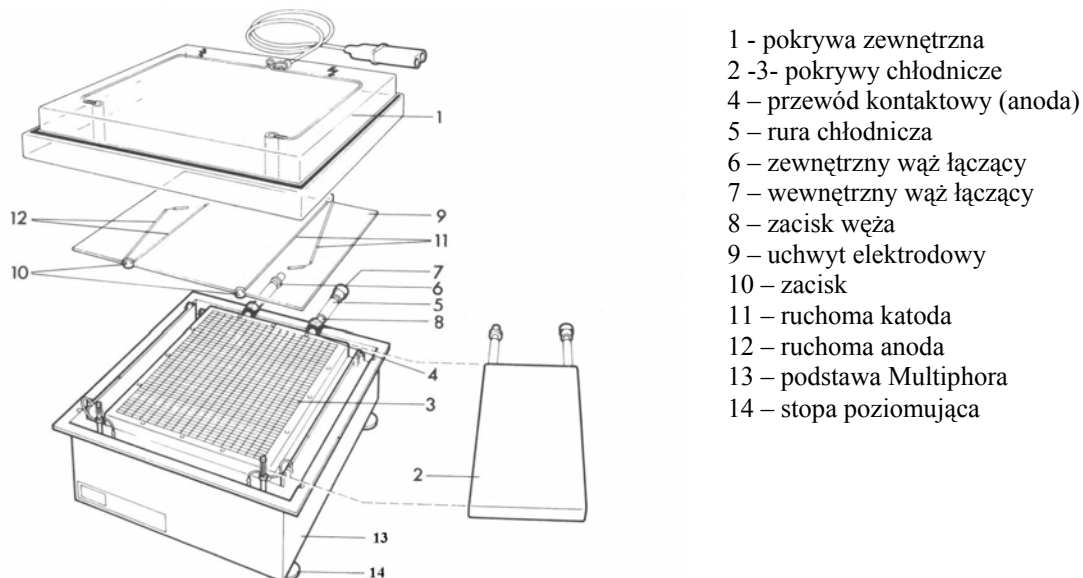
równy zero. O wypadkowym ładunku cząsteczki białkowej decyduje wzajemny stosunek ilości grup karboksylowych i aminowych na powierzchni białka, a także odczyn środowiska. W środowisku kwaśnym, kiedy stężenie kationów wodorowych jest wysokie, dysocjacja ujemnie naładowanych grup karboksylowych zostanie cofnięta. Liczba ujemnie naładowanych anionów, znajdujących się na powierzchni białka ulega zmniejszeniu, jednocześnie ilość uprotonowanych i obdarzonych ładunkiem dodatnim grup aminowych pozostaje niezmienną lub nawet wzrasta. W miarę zakwaszania środowiska wypadkowy ładunek białka staje się coraz bardziej dodatni i przy niskich wartościach pH większość cząsteczek białkowych posiada ładunek dodatni.

Dokładnie odwrotne zjawisko obserwujemy w trakcie podwyższania pH. W środowisku zasadowym grupy karboksylowe często ulegają całkowitej dysocjacji, zwiększając ujemny ładunek białka, związane natomiast z grupami aminowymi kationy wodorowe łączą się z anionami hydroksylowymi roztworu. Ilość dodatnio naładowanych uprotonowanych reszt aminowych ulega zniszczeniu. W środowisku zasadowym większość cząsteczek białkowych posiada wypadkowy ładunek ujemny.

Zmieniając odczyn środowiska można doprowadzić do sytuacji, kiedy liczba zjonizowanych grup karboksylowych jest równa liczbie dodatnio naładowanych grup aminowych. Jako całość cząsteczka białkowa posiada wypadkowy ładunek równy zero. Wartość współczynnika pH, przy którym wypadkowy ładunek białka jest równy zero, nazywa się punktem izoelektrycznym białka.

## II. OPIS BUDOWY STANOWISKA

Do przeprowadzenia elektroforezy dwukierunkowej można wykorzystać aparat o nazwie Multiphor II firmy Pharmacia, którego schemat przedstawiono na rysunku 1.



**Rys.1. Schemat aparatu do elektroforezy**

## III. PRZEBIEG ĆWICZENIA

### A. Przygotowanie żelu do elektroforezy

1. Zestaw szyb do wylania żelu poliakryloamidowego dokładnie umyć, odtłuścić alkoholem etylowym i pozostawić do wyschnięcia. Następnie przygotować wszystkie niezbędne elementy do montażu (dwie szyby, folię adhezywną oraz „spinacze”).

Na szybę bez gumowych przekładek nałożyć folię adhezywną stroną hydrofobową do szyby. Niezdejmując bibuły ochronnej wypchnąć nadmiar wody, zdjąć bibułę i nałożyć szybę z przekładkami. Całość unieruchomić przez założenie „spinaczy”.

2. Przygotować żel rozdzielający, tak aby przy objętości 16 ml końcowe stężenia poszczególnych składników wynosiły odpowiednio:

- 12% akrylamid;
- 0,5 mol/dm<sup>3</sup> TrisHCl pH 8,8;
- 0,1% SDS;

3. Dokładnie wymieszać odczynniki, a następnie dodać 30  $\mu$ l TEMED, ponownie wymieszać.
  4. Przygotować stojak z probówkami typu eppendorf.
  5. Do mieszaniny do sporządzania żelu dodać 30  $\mu$ l PSA (nadsiarczanu amonu), **natychmiast wymieszać** i ostrożnie wlać do przygotowanego zestawu szyb. Wlewać należy nieprzerwanym strumieniem unikając pozostawienia bąbli powietrza, do wysokości około 2,5 cm od górnej krawędzi szyby. Nalewając należy pozostawić niewielką ilość żelu, którą następnie należy wlać do dwóch probówek typu eppendorf.
  6. Na powstałą warstwę żelu ostrożnie nanieść około 1 ml mieszaniny H<sub>2</sub>O/alkohol allilowy.
  7. Odczekać czas niezbędny do polimeryzacji, sprawdzając stan w probówkach typu eppendorf. Następnie zlać mieszaninę H<sub>2</sub>O/alkohol allilowy z powierzchni żelu.
  8. Przygotować żel zagęszczający tak, aby w objętości 2ml końcowe stężenia składników wynosiły odpowiednio:
    - aktylamid 5%;
    - 0,125 mol/dm<sup>3</sup> TrisHCl pH 6,8;
    - 0,1% SDS
- Dokładnie wymieszać odczynniki, dodać 4  $\mu$ l TEMED, a następnie dodać 5  $\mu$ l PSA, ponownie wymieszać. Żel nanieść na powierzchnię żelu rozdzielającego. Do kolejnych dwóch eppendorfów, przelać część żelu w celu kontroli szybkości polimeryzacji.
9. Zlać mieszaninę H<sub>2</sub>O/alkohol allilowy z nad spolimeryzowanego żelu i bardzo ostrożnie zdjąć wierzchnią szybę zestawu, następnie zdjąć folię z żelem.

### **B. Przygotowanie próbek do elektroforezy**

1. Przygotować dwa szeregi po 9 probówek typu eppendorf
2. Do pierwszego szeregu wlać 25  $\mu$ l surowicy krwi, do drugiego szeregu 250  $\mu$ l roztworu albuminy.
3. Do probówek 3-7 w obu szeregach dodać 300  $\mu$ l 10% roztworu SDS
4. Do probówek 4-6 oraz 8-9 dodać 200  $\mu$ l merkaptoetanolu

5. Do wszystkich probówek ostrożnie dodać 10 µl roztworu błękitu bromofenolowego
6. Następnie wszystkie probówki odpowiednio uzupełnić buforem TrisHCl pH 8,8 do objętości 1000µl.
7. Probówki o numerach 2, 5, 7 i 9 zdenaturować inkubując przez 1 min w temperaturze 60 °C
8. Próbkę numer 6 zdenaturować inkubując przez 1 min w temperaturze 100 °C

### **C. Przebieg elektroforezy.**

1. Folię z żelem umieścić w aparacie do elektroforezy.
2. Trzy paski bibuły elektroforetycznej złożyć na trzy części (wzdłuż dłuższego boku), a następnie zmoczyć je buforem elektroforetycznym (TRIS-HCl, Glicyna, SDS). Nałożyć bibułę na żel tak, aby bibuła pokrywała 2-3 mm żelu zagęszczającego. Analogicznie przygotować bibułę i umieścić ją wzdłuż wolnego boku żelu rozdzielającego. Nałożyć pokrywę aparatu i odpowiednio ustawić elektrody.
3. Nanieść próbki białka według wskazań prowadzącego ćwiczenia.
4. Bardzo delikatnie ustawić chłodzenie wodą aparatu.
5. Nałożyć pokrywę aparatu, włączyć zasilacz i **po uzyskaniu zgody od prowadzącego** rozpocząć rozdział elektroforetyczny.
6. Po czasie, w którym czoło elektroforezy osiągnęło brzeg żeli rozdzielającego wyłączyć zasilacz, delikatnie zdjąć bibułę i żel.

### **C. Barwienie żeli.**

Folię z żelem przyciąć do rozmiarów kuwety z barwnikiem i zanurzyć w barwniku. Pozostawić na około 1 godzinę. Następnie zlać barwnik i całość zalać płukaczem.

## **IV. SPRAWOZDANIE POWINNO ZAWIERAĆ**

1. Krótki wstęp teoretyczny.
2. Cel ćwiczenia.
3. Obraz przeprowadzonej elektroforezy.
4. Dyskusję i wnioski.

## V. PYTANIA KONTROLNE

1. Ogólna budowa białek.
2. Definicja elektroforezy.
3. Punkt izoelektryczny.
4. Rodzaje elektroforezy – omówić elektroforezę żelową.
5. Zastosowanie elektroforezy.

## LITERATURA

1. A. Dembińska – Kieć: *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*; Volumed, Wrocław 1998
2. L. Kłyszajko – Stefanowicz: *Ćwiczenia z biochemii*; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999
3. F. Jaroszyka: *Biofizyka*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001