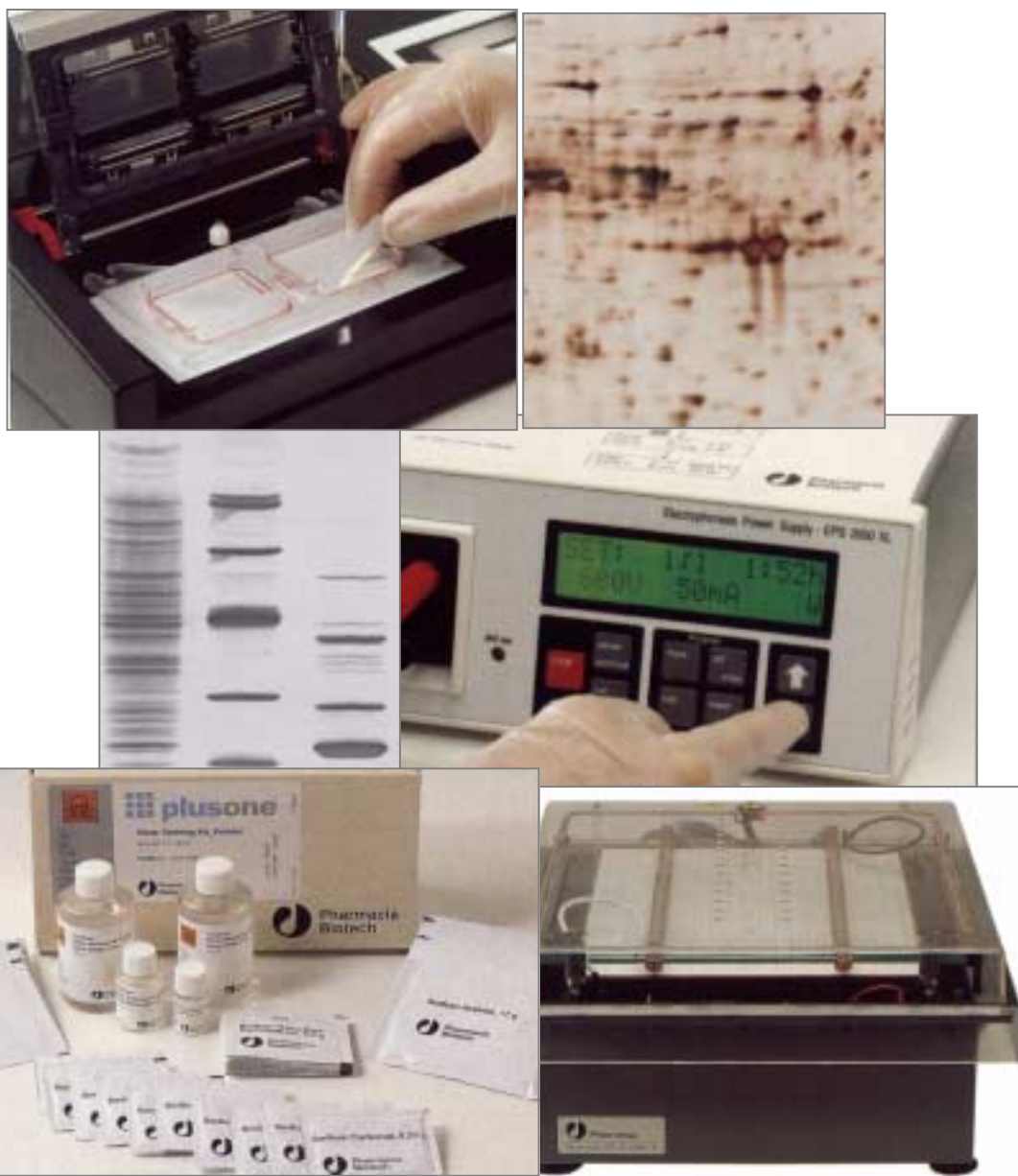


# ELEKTROFOREZA

## PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ

Opracowanie zbiorowe pod redakcją  
Bogdana Walkowiaka i Violetty Kochmańskiej



# SPIS TREŚCI

|                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW UŻYWANYCH W OPRACOWANIU .....                                                                                                                                                   | 3   |
| WSTĘP .....                                                                                                                                                                                         | 5   |
| ELEKTROFOREZA JAKO TECHNIKA SEPARACJI MAKROcząSTECZEK – Walkowiak B.....                                                                                                                            | 6   |
| - PODSTAWY TEORETYCZNE .....                                                                                                                                                                        | 7   |
| - RODZAJE NOŚNIKÓW ELEKTROFORETYCZNYCH .....                                                                                                                                                        | 10  |
| - RODZAJE KOMÓR ELEKTROFORETYCZNYCH .....                                                                                                                                                           | 12  |
| - RODZAJE ELEKTROFOREZY .....                                                                                                                                                                       | 13  |
| - PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ELEKTROFOREZY .....                                                                                                                                                       | 18  |
| - BARWIENIE, DOKUMENTACJA ORAZ ANALIZA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA .....                                                                                                                                 | 20  |
| PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ.....                                                                                                                                                                           | 23  |
| 1. DETEKcja FOSFORYLACJI BIAŁEK POWIERZCHNIOWYCH BŁON KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA<br>Z UDZIAŁEM EKTOKINAZ BIAŁKOWYCH – Pawłowska Z. ....                                                                     | 25  |
| 2. FOSFORYLACJA BIAŁEK W PŁYTKACH KRWI STYMULOWANYCH KOLAGENEM C Kralisz U.....                                                                                                                     | 29  |
| 3. OCENA POZIOMU FOSFORYLACJI BIAŁEK PŁYTEK KRWI AKTYWOWANYCH ADP U CHORYCH<br>Z PRZEWLEKŁĄ NIEWYDOLNOŚCIĄ NEREK – Walkowiak B., Tański W., Koziolkiewicz W.....                                    | 35  |
| 4. ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK MIĘSA PRZY UŻYCIU SDS-PAGE Z DODATKIEM<br>8M MOCNIKA – Greaser ML., Pospiech E., Fritz J., Swartz DR., Grześ B. ....                                           | 43  |
| 5. ELEKTROFOREZA BIAŁEK MIĘSA O MASIE POWYŻEJ 200 K W ŻELU AGAROWYM – Greaser ML.,<br>Kumazawa Y., Pospiech E. ....                                                                                 | 48  |
| 6. OCENA FENOTYPÓW $\alpha_1$ -ANTYTRYPSYNY – Piłacik B.....                                                                                                                                        | 52  |
| 7. ELEKTROFORETYCZNE ROZDZIAŁY BIAŁEK GENERATYWNYCH CZĘŚCI ROŚLIN – Kalinowski A.,<br>Radłowski M.....                                                                                              | 55  |
| 8. KRZYWE MIARECZKOWANIA ELEKTROFORETYCZNEGO – Buchowiecka A., Peltre G.....                                                                                                                        | 61  |
| 9. MINIATUROWA ELEKTROFOREZA DWUKIERUNKOWA (m2D) BIAŁEK Z GENERATYWNYCH<br>CZĘŚCI ROŚLIN – Kalinowski A., Radłowski M.....                                                                          | 68  |
| 10. ZASTOSOWANIE ELEKTROFOREZY DWUKIERUNKOWEJ W ANALIZIE BIAŁEK KOMÓREK MDCK<br>ZAKAŻONYCH WIRUSEM INFLUENZY KONI – Rożek W.....                                                                    | 75  |
| 11. ANALIZA PROFILU BIAŁKOWEGO KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY<br>DWUKIERUNKOWEJ Z UŻYCIEM SYSTEMU ETTANDALT – Pawłowska Z.....                                                          | 81  |
| 12. EFEKTYWNOŚĆ TRANSFERU BIAŁEK Z ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO PRZY POMOCY TECHNIKI<br>TRANSFERU PÓLSUCHEGO – Walkowiak B., Walkowiak A.....                                                            | 84  |
| 13. IMMUNOBLOTTING BIAŁEK MIĘSA – Greaser ML., Pospiech E., Fritz J., Swartz DR.....                                                                                                                | 90  |
| 14. ANALIZA GENETYCZNA RODZIN OBCIĄŻONYCH ZESPOŁEM MEN 2A – WYKRYWANIE<br>GERMINALNYCH MUTACJI PROTOONKOGENU <i>RET</i> METODĄ PCR-SSCP – Bartkowiak J., Rieske P.,<br>Piaskowski S.....            | 94  |
| 15. DIAGNOSTYKA WIRUSA CHOROBY PĘCHERZYKOWEJ ŚWIŃ (SVD) – Niedbalski W., Kęsy A.....                                                                                                                | 98  |
| 16. ELEKTROFORETYCZNE OCZYSZCZANIE BIAŁEK Z NADEKSPRESJI W KOMÓRKACH <i>E.Coli</i> - Szalata M.,<br>Kalak R., Lipiński D., Pławski A., Słomski R.....                                               | 101 |
| 17. FRAKCJONOWANIE W ŻELU POLIAKRYLOAMIDOWYM I DETEKcja FLUORESCENCJI FRAGMENTÓW DNA<br>ZAWIERAJĄCYCH POWTÓRZENIA MINISATELITARNE – Słomski R., Kowalska K., Słomska K., Jura J.,<br>Szalata M..... | 106 |
| 18. BEZPOŚREDNIE SEKWENCJONOWANIE PRODUKTU PCR Z ZASTOSOWANIEM STARTERÓW<br>ZNAKOWANYCH INDODIKARBOCYJANINO (CY5) FOSFOROAMIDEM - Pławski A., Lipiński D.,<br>Kala M., Słomski R.....               | 112 |
| 19. ANALIZA SEKWENCJI DNA METODĄ IZOTERMICZNĄ KLONÓW WYSELEKCJONOWANYCH Z BIBLIOTEKI<br>CDNA ŁUBINU ŻÓŁTEGO – Nuc K., Słomski R.....                                                                | 116 |
| 20. WYKRYWANIE MUTACJI PUNKTOWYCH W GENIE SUPRESOROWYM <i>APC</i> CZŁOWIEKA METODĄ<br>HETERODUPLEKSÓW – Pławski A., Lipiński M., Słomski R.....                                                     | 119 |

## OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW UŻYWANYCH W OPRACOWANIU

|                  |                                                                                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1D               | – symboliczne oznaczenie pierwszego kierunku w elektroforezie dwuwymiarowej                                                                         |
| 2D               | – symboliczne oznaczenie elektroforezy dwuwymiarowej (dwukierunkowej)                                                                               |
| 4G10             | – przeciwciało monoklonalne rozpoznające ufosforylowaną formę tyrozyny                                                                              |
| <sup>125</sup> I | – izotop jodu o masie atomowej 125                                                                                                                  |
| <sup>131</sup> I | – izotop jodu o masie atomowej 131                                                                                                                  |
| <sup>14</sup> C  | – izotop węgla o masie atomowej 14                                                                                                                  |
| <sup>3</sup> H   | – izotop wodoru o masie atomowej 3 (tryt)                                                                                                           |
| <sup>32</sup> P  | – izotop fosforu o masie atomowej 32                                                                                                                |
| <sup>35</sup> S  | – izotop siarki o masie atomowej 35                                                                                                                 |
| 9D10             | – przeciwciało monoklonalne anty-titina (supernatant komórkowy)                                                                                     |
| A                | – symbol nukleotydu <b>adenozyny</b>                                                                                                                |
| ACD              | – antykoagulant w skład którego wchodzi: kwas cytrynowy, cytrynian sodowy i cukier glukoza, nazwa zwyczajowa: ( <i>ang. acid citrate dextrose</i> ) |
| ADP              | – nukleotyd dwufosforan adenozyne                                                                                                                   |
| AMP              | – nukleotyd monofosforan adenozyne                                                                                                                  |
| ATP              | – nukleotyd trójfosforan adenozyne                                                                                                                  |
| BSA              | – albumina wołowa ( <i>ang. bovine serum albumin</i> )                                                                                              |
| bp               | – oznaczenie liczby par zasad DNA ( <i>ang. base pair</i> )                                                                                         |
| C                | – symbol nukleotydu <b>cytozyny</b>                                                                                                                 |
| C                | – procentowy udział bis-akrylamidu w całkowitej ilości akrylamidu                                                                                   |
| CAPS             | – 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid                                                                                                        |
| cDNA             | – jednoniciowa postać DNA, będąca kopią RNA, uzyskana w wyniku działania odwrotnej transkryptazy                                                    |
| CHAPS            | – 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propane sulfonate                                                                                         |
| DATD             | – N,N' - diallyltartardiamide                                                                                                                       |
| DMEM             | – medium hodowli komórkowej                                                                                                                         |
| DNA              | – kwas deoksyrybonukleinowy                                                                                                                         |
| DTT              | – 1,4-ditiotreitol                                                                                                                                  |
| EDTA             | – kwas etylenodiaminotetraoctowy (wersenian dwusodowy) ( <i>ang. ethylenediamine tetraacetic acid</i> )                                             |
| dpi              | – jednostka rozdzielczości optycznej skanera ( <i>ang. dot per inch</i> )                                                                           |
| FBS              | – wołowa surowica płodowa ( <i>ang. fetal bovine serum</i> )                                                                                        |
| Fc               | – fragment cząsteczki immunoglobuliny nie zawierający miejsc rozpoznających antygen                                                                 |
| FCS              | – cielęca surowica płodowa ( <i>ang. fetal calf serum</i> )                                                                                         |
| G                | – symbol nukleotydu <b>guaniny</b>                                                                                                                  |
| HAT              | – dodatek do medium hodowli komórkowej ( <i>ang. hypoxanthine, aminophtherin and thymidine</i> )                                                    |
| HPCE             | – wysokosprawna elektroforeza kapilarna ( <i>ang. high performance capillary electrophoresis</i> )                                                  |
| HUVEC            | – ludzkie komórki endotelialne ( <i>ang. human umbilical vein endothelial cells</i> )                                                               |
| IEF              | – rodzaj elektroforezy wykorzystujący różnicę wartości punktu izoelektrycznego rozdzielanych makrocząsteczek ( <i>ang. iso electro focusing</i> )   |
| IFN-γ            | – interferon gamma                                                                                                                                  |
| IgG              | – immunoglobulina G                                                                                                                                 |

|               |                                                                                                                                                 |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IgM           | – immunoglobulina M                                                                                                                             |
| IODO-BEADS    | – odczynnik, w postaci styrenowych kuleczek z immobilizowaną formą chloraminy, stosowany do znakowania białek promieniotwórczym izotopem jodu   |
| K             | – symboliczny zapis tysiąca (kilo), umownie w notacji biologicznej stosuje się dużą literę, choć układ SI rezerwuje dla tego celu małą literę k |
| M             | – symboliczny zapis miliona (mega)                                                                                                              |
| Mab           | – symboliczne oznaczenie przeciwciała monoklonalnego ( <i>ang. monoclonal antibody</i> )                                                        |
| MHC           | – ciężki łańcuch miozyny ( <i>ang. miosine heavy chain</i> )                                                                                    |
| MW            | – masa cząsteczkowa ( <i>ang. molecular weight</i> )                                                                                            |
| NP-40         | – detergent niejonowy nonident P-40                                                                                                             |
| pI            | – punkt izoelektryczny - taka wartość pH, w której wypadkowy ładunek elektryczny cząsteczki jest równy zeru ( <i>ang. isoelectric point</i> )   |
| PBS           | – wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej fosforanami, pH 7,4 ( <i>ang. phosphate buffered saline</i> )                       |
| PCR           | – reakcja łańcuchowa oparta na zastosowaniu polinukleazy ( <i>ang. polinuclease chain reaction</i> )                                            |
| PLCγ2         | – enzym fosfolipaza Cγ2                                                                                                                         |
| PMSF          | – <b>p</b> henyl <b>m</b> ethylsulfonyl <b>f</b> luoride - inhibitor proteaz serynowych                                                         |
| RPMI          | - medium do hodowli komórek                                                                                                                     |
| SDS           | – silny detergent jonowy ( <i>ang. sodium dodecyl sulfat</i> )                                                                                  |
| SDS-PAGE      | – żelowa elektroforeza płytowa wykonywana w akrylamidzie w obecności SDS ( <i>ang. plate acrylamide gel electrophoresis</i> )                   |
| Sephadex G-25 | – złożo do filtracji żelowej                                                                                                                    |
| SSCP          | – technika badania polimorfizmu DNA ( <i>ang. single-strand conformation polymorphism</i> )                                                     |
| T             | – symbol nukleotydu tyminy                                                                                                                      |
| T             | – procentowa zawartość akrylamidu i bis-akrylamidu w żelu                                                                                       |
| TBS           | – wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej Trisem, pH 7,4 ( <i>ang. Tris buffered saline</i> )                                 |
| TBST          | – TBS z dodatkiem detergentu Tween 20                                                                                                           |
| TCA           | – kwas tróchlorooctowy ( <i>ang. trichloroacetic acid</i> )                                                                                     |
| TEMED         | – N,N,N',N'-tetrametylenediamine                                                                                                                |
| Tris          | – 2-amino-2-hydroxymetylo-1,3-propanediol                                                                                                       |
| Triton X-100  | – niejonowy detergent (polyethylene glycol tert-octylphenyl ether)                                                                              |
| Tween 20      | – niejonowy detergent (polyoxyethylenesorbitan monolaurate)                                                                                     |
| U             | – symbol nukleotydu uracylu                                                                                                                     |

## WSTĘP

Olbrzymia popularność technik elektroforetycznych we wszystkich dziedzinach dotyczących nauk o życiu nakłada na producentów i dystrybutorów sprzętu do elektroforezy zwyczajowy obowiązek dostarczania bieżącej i pełnej informacji o tych technikach, ich możliwościach i nowych aplikacjach. Obowiązek ten realizowany jest całą gamą środków, poczynając od dostarczania użytkownikowi katalogów produktów firmy, not aplikacyjnych, publikacji w firmowych periodykach, filmów instruktażowych czy szkoleń. Oferta ta dostępna jest zwykle w języku angielskim i nie zawsze trafia do osób oczekujących na szybką i pełną informację w języku polskim. Dotyczy to głównie początkujących pracowników badawczych, których znajomość zagadnień technicznych oraz języka naukowego jest jeszcze niepełna. Specjalnie z myślą o tych użytkownikach technik elektroforetycznych przygotowane zostało niniejsze opracowanie. Nie oznacza to jednak, że doświadczeni badacze nie znajdą w opracowaniu nowych pomysłów i informacji. Autorami przykładów są pracownicy nauki dobrze posługujący się technikami elektroforetycznymi, żeby nie powiedzieć eksperci w tej dziedzinie. Przykłady zostały dobrane i przedstawione z myślą o przekazaniu możliwie dużej porcji informacji w dość skrótowej formie publikacji. Stąd pełny opis czynności niezbędnych do wykonania wzbogacony o uwagi wskazujące niebezpieczeństwo związane z wykonywaniem poszczególnych czynności lub pozwalające ominąć błędy w postępowaniu.

Opracowanie niniejsze nie stanowi w żadnym razie konkurencji w stosunku do uznanych podręczników i monografii w zakresie elektroforezy. Jest pewnym uzupełnieniem dostępnej literatury, wzbogaconym dokładnym wyspecyfikowaniem warunków przeprowadzenia doświadczenia oraz opisem oczekiwanych wyników. Jako lekturę pozwalającą na stosunkowo łatwe przyswojenie wiedzy w tej dziedzinie chcielibyśmy wskazać monografię Reinera Westemeiera *Electrophoresis in Practice*, 2<sup>nd</sup> edition, A Wiley Company, Weinheim 1997.

Z powodu ograniczonej objętości niniejszego opracowania zrezygnowano z opisu aparatury, materiałów eksploatacyjnych, akcesoriów oraz odczynników stosowanych w zaprezentowanych technikach elektroforetycznych. Wszystkie produkty firmy Amersham Biosciences zaznaczone są w tekście wytłuszczoną czcionką. Pełną informację o tych produktach można znaleźć w aktualnym katalogu firmy lub na stronie internetowej [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com).

W zakończeniu wstępu edytorzy opracowania wyrażają swoje podziękowanie autorom przykładów, którzy zechcieli znaleźć nieco czasu aby podzielić się swym doświadczeniem z innymi. Chcemy również podziękować Panu Andrzejowi Reńskiemu, Dyrektorowi polskiego przedstawicielstwa firmy Amersham Biosciences, za zaproszenie nas do przygotowania tego opracowania.

Łódź, Warszawa, październik 2002 rok

## ELEKTROFOREZA JAKO TECHNIKA SEPARACJI MAKROCZĄSTECZEK

Wraz z rozwojem wiedzy o budowie materii pojawiła się potrzeba rozdzielania cząsteczek wykazujących zróżnicowane właściwości. Opracowano szereg metod, opierających się na wykorzystaniu różnych zjawisk fizycznych, w celu separacji makrocząsteczek ze względu na ich cechy. Spośród tych metod najbardziej popularnymi technikami stały się techniki elektroforetyczne. Techniki te pozwalają osiągnąć niespotykany gdzie indziej poziom rozdzielczości, a w połączeniu z technikami immunobarwienia, również niedościgniony poziom selektywności. Jedynym niedostatkim tych technik jest zawężenie ich użyteczności do makrocząsteczek obdarzonych niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym.

Elektroforeza jest zjawiskiem elektrokinetycznym, w którym pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego przemieszczają się makrocząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym. Prędkość przemieszczania się naładowanej elektrycznie makrocząsteczki zależy od jej ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów ruchu środowiska. Wykorzystując te zależności można dokonać szybkiej separacji różnych makrocząsteczek przy zastosowaniu stosunkowo prostych urządzeń i przy relatywnie niskim nakładzie kosztów. Te względy zdecydowały o powszechności zastosowań technik elektroforetycznych.

Głównym obszarem zastosowań elektroforezy są: biochemia białek i kwasów nukleinowych, biologia molekularna, farmakologia, medycyna sądowa, weterynaria, diagnostyka medyczna oraz kontrola jakości żywności. Należy również wspomnieć, że wykorzystanie technik elektroforetycznych umożliwiło uzyskanie pełnej sekwencji DNA człowieka w niedawno zakończonym projekcie genomiki (*ang. genomics*). Wszystkie powszechnie stosowane techniki sekwencjonowania DNA w końcowym swym etapie opierają się bowiem o elektroforezę.

Odczytanie sekwencji genomu człowieka, choć ogłoszone jako olbrzymi sukces, nie pozwala na pełne wykorzystanie zapisanej w DNA informacji dla celów diagnostyczno-terapeutycznych. Okazuje się, że ze znajomości samej sekwencji DNA nie wynikają jeszcze funkcjonalne właściwości białek, gdyż te podlegają zwykle zmianom posttranslacyjnym, co oznacza ich różnorodną modyfikację zachodzącą po syntezie i będącą pod kontrolą innych białek. Co więcej, informacja zapisana w cząsteczce DNA nie pozwala na przewidywanie interakcji pomiędzy poszczególnymi białkami lub ich grupami, a taka właśnie interakcja makrocząsteczek białkowych pozwala na realizację regulacji większości procesów wewnątrzkomórkowych. W końcu sama ekspresja genu poddana jest regulacji poprzez odpowiednie białka i jest przede wszystkim wynikiem oddziaływania sygnałów z otoczenia komórki z odpowiednimi receptorami i efektorami komórkowymi. Wszystkie te procesy wydają się być w większości niezależne od informacji zapisanej w DNA, bądź ich związek z zakodowaną informacją jest dla nas na obecnym etapie poznania niedostępny. W tej sytuacji powołany został do realizacji nowy program badań zwany proteomiką (*ang. proteomics*). Program ten, opierający się w swych podstawach na technikach elektroforezy dwukierunkowej (*ang. 2D electrophoresis*), jest w odróżnieniu od projektu genomiki bardziej filozofią poznania niż ściśle określonym sposobem postępowania prowadzącym do osiągnięcia precyzyjnie sformułowanego celu. W projekcie genomiki uczestniczyły właściwie tylko dwa duże zespoły naukowe (z jednej strony Firma Celera Genomics, USA - pod przewodnictwem dr. J.C. Venter'a, a z drugiej strony współpracujące zespoły uniwersyteckie pod kierunkiem prof. F. Collins'a), które prowadząc niezwykle intensywne współzawodnictwo nie pozostawiły miejsca na udział pomniejszych grup i zespołów. W proteomice, przynajmniej na początku realizacji tego programu, praktycznie każdy może

znaleźć miejsce dla siebie i dla stosowanych przez swój zespół technik badawczych. Wspólnym mianownikiem tych badań jest możliwość separacji, identyfikacja i uzyskanie w czystej postaci wybranego białka lub grupy białek funkcjonujących w danej komórce.

Jak wynika z przedstawionego powyżej krótkiego i dość wyrywkowego opisu najważniejszych zastosowań elektroforezy, należy docenić jej rolę we współczesnym laboratorium. Chociaż dostępne są liczne opracowania opisujące samą ideę elektroforezy jak i jej szczegółowe zastosowania, to najczęściej są to pozycje przygotowane w języku angielskim. Celem tego opracowania jest przybliżenie problemów związanych z elektroforezą głównie początkującym pracownikom nauki, choć z uwagi na zawarte w opracowaniu przykłady zastosowań elektroforezy, zaprezentowane przez doświadczonych naukowców, opracowanie może być pomocnym również w prowadzeniu i projektowaniu badań przez bardziej doświadczonych eksperymentatorów.

## PODSTAWY TEORETYCZNE

Przyłożenie pola elektrycznego do wodnego roztworu elektrolitu zawierającego makrocząsteczki obdarzone niezerównoważonym ładunkiem elektrycznym (makrojonów) zawsze powoduje ruch jonów, zarówno elektrolitu, jak i makrojonów, w kierunku elektrod o przeciwnym znaku ładunku elektrycznego. Przemieszczeniu jonów i makrojonów towarzyszą zjawiska fizyczne określane mianem elektrolizy oraz elektroforezy. Należy wyraźnie rozróżnić te procesy. Elektroliza jest procesem zachodzącym przy powierzchni elektrod i polega na odkładaniu się substancji, pochodzących z elektrolitu, na elektrodach pod wpływem przepływającego prądu. Procesy te opisywane są ilościowo prawami elektrolizy Faradaya. Elektroforezą nazywa się procesy elektrokinetyczne zachodzące w objętości elektrolitu i polegające na przemieszczaniu się jonów i makrojonów w polu elektrycznym. W klasycznym ujęciu elektroforezy, opracowanym dla koloidów, mowa jest o ruchu fazy rozproszonej w stosunku do fazy rozpraszającej pod wpływem pola elektrycznego. Zjawisko to opisane zostało przez Smoluchowskiego i Sterna w początkach XIX w. Od tego czasu znacznie wzbogaciła się nasza wiedza o budowie materii oraz o procesach zachodzących w środowisku wodnym pod wpływem pola elektrycznego. Dlatego też do zjawiska elektroforezy włączono ruch wszelkich jonów poddanych działaniu pola elektrycznego w tym środowisku.

Zarówno proste jony jak i makrojonów w środowisku wodnym występują w postaci uwodnionej, co oznacza, że posiadają otoczkę hydratacyjną, będącą w istocie rzeczy uporządkowanym układem dipoli wodnych związanych z jonem dość słabymi siłami oddziaływania elektrostatycznego. Zasięg tego uporządkowania, choć niewielki, to w całkiem poważny sposób wpływa na możliwość ruchu jonów i makrojonów w otaczającym środowisku, a właściwości otoczki hydratacyjnej zależą zarówno od rozmiaru jonu i zgromadzonego na nim niezerównoważonego ładunku elektrycznego, jak i od właściwości elektrolitu, tj. jego siły jonowej oraz wartości pH.

**Sila jonowa** - jest funkcją stężenia jonów komponujących elektrolit (bufor), a jej wartość ( $\mu$ ) definiuje się jako połowę sumy iloczynów stężeń molowych ( $c$ ) i kwadratu wartościowości ( $Z$ ) wszystkich jonów znajdujących się w roztworze ( $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2$ ). W początkowej fazie wzrostu wartości siły jonowej, gdy odległości pomiędzy jonami, a ściślej pomiędzy otoczkami jonów są duże, obserwuje się wzrost przewodności jonowej elektrolitu związany ze wzrostem liczby nośników ładunku elektrycznego. Jednak dalszy wzrost siły jonowej prowadzi do tak dużego zagęszczenia jonów i ich otoczek

hydratacyjnych, że decydującą rolę w ich ruchu w polu elektrycznym zaczyna odgrywać tarcie występujące pomiędzy otoczkami. Przewodnictwo elektryczne elektrolitu w tych warunkach znacznie spada. Z tego powodu niezmiernie wagi nabiera odpowiedni skład elektrolitów przeznaczonych do elektroforezy. Przy zbyt wysokim stężeniu jonów następuje ograniczenie ich ruchliwości, przy zbyt niskim można zaobserwować niedobór nośników ładunku elektrycznego i związany z tym wzrost oporności elektrycznej. W warunkach stabilizowanej wartości płynącego prądu, wzrostowi oporności elektrycznej towarzyszy zawsze wzrost napięcia niezbędnego dla wymuszenia przepływu prądu oraz zwiększona ilość ciepła wydzielana w obrębie elektrolitu. Z drugiej jednak strony, rozpatrując ruch makrojonów, których separacji w polu elektrycznym oczekujemy, zachowany powinien być rozsądny stosunek liczby jonów do liczby makrojonów, tak aby przenoszony przez elektrolit ładunek elektryczny rozkładał się korzystnie na wszystkie obecne tam jony. Proponowane w publikowanych opracowaniach składy chemiczne buforów do elektroforezy z reguły spełniają wymagania stawiane im w odniesieniu do siły jonowej.

**Wartość pH** - będąca miarą stężenia jonów wodorowych w elektrolicie ma szczególnie istotne znaczenie w odniesieniu do białek i peptydów. Białka i peptydy posiadają własności amfoteryczne (dwufunkcyjne lub obojętne) co oznacza, że są obdarzone wypadkowym ładunkiem elektrycznym dodatnim lub ujemnym w zależności od warunków środowiskowych. Cecha amfoteryczności wynika z właściwości aminokwasów wchodzących w skład peptydów i białek, a konkretnie z właściwości reszt aminokwasowych, które mogą być zarówno zasadowe, jak i kwaśne. Przeważająca większość ładunku elektrycznego białek pochodzi z zależnej od wartości pH jonizacji bocznych łańcuchów grup karboksylowych oraz grup aminowych ( $-\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^- + \text{H}^+$ ;  $-\text{NH}_2 + \text{H}^+ \leftrightarrow -\text{NH}_3^+$ ). W związku z tym, wypadkowy ładunek elektryczny cząsteczki białka zależy od wartości pH i można znaleźć taką jej wartość przy której wypadkowy ładunek równy jest zeru. Tę wartość pH nazywa się punktem izoelektrycznym i oznacza symbolem pI. Każde białko charakteryzuje się jemu właściwym punktem izoelektrycznym. Może się zdarzyć, że w wyniku zachodzących modyfikacji posttranslacyjnych cząsteczki białka kodowane przez ten sam gen mogą charakteryzować się odmienną wartością pI. Przyczyną tego może być glikozylacja (przyłączenie obdarzonych ładunkiem elektrycznym bądź elektrycznie obojętnych cukrów), powstawanie mostków disiarczkowych czy też blokowanie wolnych grup aminowych i karboksylowych. Odmienną wartość pI (izoformy) mogą posiadać też te same białka będące produktem polimorficznego genu. Zawsze w środowisku o  $\text{pH} < \text{pI}$  białko obdarzone jest ładunkiem dodatnim i migruje w kierunku elektrody ujemnej. Aby elektroforetyczna separacja białek była skuteczna koniecznym jest utrzymywanie stałej wartości pH elektrolitu. Jednak z uwagi na zachodzącą elektrolizę wody ciągle generowane są jony  $\text{H}^+$  na katodzie i  $\text{OH}^-$  na anodzie. W związku z tym elektrolit przeznaczony do elektroforezy musi być buforowany. Nieco inaczej przedstawia się sytuacja w szczególnej technice elektroforetycznej wykorzystującej do rozdziału wartości pI białek (ogniskowanie izoelektryczne - *ang. isoelectric focusing IEF*). Sytuacja ta omówiona będzie w szczegółach poniżej.

Ponieważ kwasy nukleinowe nie posiadają właściwości amfoterycznych, nie dotyczą ich powyższe rozważania i dlatego ich separacja elektroforetyczna jest znacznie prostsza. Kwasy nukleinowe posiadają trwały ładunek ujemny, w warunkach elektrolitów stosowanych do elektroforezy, a zawdzięczają go naturze silnego kwasu szkieletu fosforanowego.

**Parametry elektryczne** - Zjawisko elektroforezy zachodzi dzięki obecności pola elektrycznego. Siła z jaką pole to oddziałuje na ładunek elektryczny jonu jest proporcjonalna do natężenia tego pola ( $E$  [V/m]), a ta wielkość jest z kolei proporcjonalna do napięcia  $U$  [V] przyłożonego do elektrod. W zakresie niskich sił jonowych istnieje prosta relacja wynikająca



z prawa Ohma regulująca zależność pomiędzy przyłożonym napięciem  $U$ , a płynącym w wyniku tego prądem  $I$  [A] oraz oporem elektrycznym (rezystancją)  $R$  [ $\Omega$ ] elektrolitu:  $V = I R$ . Podczas przepływu prądu elektrycznego, w wyniku wykonywania pracy przesunięcia ładunku elektrycznego przez pole, na opornościach obwodu tracona jest moc  $P$  [W]. Pracy tej towarzyszy wydzielanie się ciepła, zwanego ciepłem Joule'a. Ilość wydzielonego ciepła  $Q$  [J] można obliczyć korzystając z równania:  $Q = U I t$ . Oczywiście ciepło to jest wydzielane na wszystkich oporach obwodu, ale największy udział w tym zjawisku posiada elektrolit.

Zasilacze stosowane do elektroforezy zwykle mogą utrzymywać stałą wartość jednego z parametrów: prądu  $I$ , napięcia  $U$  lub mocy  $P$ . Dla pozostałych parametrów ustala się tylko górny limit wartości. W ciągu trwania elektroforezy oporność elektrolitu ulega zmianom. Zwykle obniża się ze wzrostem temperatury wynikającym z ciepła Joule'a. Oporność elektrolitu wzrasta jednak w wyniku ubywania jonów (elektroliza) oraz zmian rozkładu ładunku elektrycznego jonów w warunkach elektroforezy o nieciągłej wartości pH (*ang. discontinuous electrophoresis, disc electrophoresis*). W zależności od składu elektrolitu oraz wyboru stabilizowanego parametru obserwuje się wzrost lub spadek ilości wydzielanego ciepła. I tak w warunkach SDS-elektroforezy przy stałym prądzie wzrasta oporność układu i wraz z tym wzrasta ilość wydzielanego ciepła. Układ wymaga aktywnego odprowadzania ciepła. Z drugiej strony, gdy stabilizowane jest napięcie, ze wzrostem oporu następuje ograniczenie prądu, a w ślad za tym spadek ilości oddawanego ciepła. Układ nie wymaga termostatowania, ale znacznie wydłuża się czas trwania elektroforezy. W przypadku elektroforezy w warunkach stałego pH i stabilizacji prądu, wraz ze spadkiem oporności układu maleje ilość oddanego ciepła. W tych samych warunkach elektrolitu przy stabilizacji napięcia rośnie wartość prądu i w związku z tym wzrasta ilość wydzielanego ciepła. Wybór optymalnego składu elektrolitu (buforu) oraz stabilizacji wybranego parametru musi być poprzedzony analizą licznych zmiennych, w tym czasu trwania elektroforezy, ograniczenia dyfuzji molekuł czy strat aktywności biologicznej molekuł. Zwykle elektroforezę białek w żelu poliakrylamidowym prowadzi się przy stałym prądzie, kwasów nukleinowych przy stałym napięciu, a żele sekwencyjne poddaje się działaniu stałej mocy. Również dla ogniskowania izoelektrycznego wskazane jest stosowanie stałej mocy, ponieważ oporność żelu silnie wzrasta wraz z czasem trwania rozdzielania.

**Temperatura** - Utrzymywanie temperatury na zadanym poziomie, odpowiednim dla danego procesu, jest konieczne dla osiągnięcia zadowalających i powtarzalnych rezultatów elektroforetycznej separacji makromolekuł. Dla przykładu, podczas polimeryzacji akrylamidu wydzielane jest ciepło związane z zachodzeniem egzotermicznych reakcji chemicznych. Uwolnione ciepło może przyczynić się do powstawania prądów konwekcyjnych w całej objętości polimeryzującego akrylamidu i co za tym idzie mogą pojawiać się nieregularności w sieciowaniu i porowatości nośnika. Wpływ wydzielanego ciepła polimeryzacji jest często bagatelizowany w praktyce laboratoryjnej i jest to uzasadnione tak długo, jak długo przygotowywane żele są niezbyt gęste. Jednak w przypadku żeli 15% i gęstszych, oraz żeli gradientowych, zaniedbanie odprowadzania ciepła polimeryzacji skutkuje silnymi niejednorodnościami struktury nośnika i złymi wynikami separacji.

Nadmiar ciepła uwalnianego podczas samego procesu elektroforezy może również stanowić poważne problemy natury praktycznej. Często obserwuje się nierównomierne przemieszczanie się frontu elektroforezy, co ze względu na kształt deformacji bywa nazywane śmiejącym się rozdziałem. W tym przypadku makrojonny w centralnej części nośnika migrują znacznie szybciej niż ich odpowiedniki znajdujące się przy bocznych krawędziach nośnika. W sytuacji znacznego gradientu temperatury pomiędzy początkiem i końcem żelu można zaobserwować, że niektóre prążki migrują jako dublety, a inne są znacznie poszerzone.

Nadmiar ciepła może również prowadzić do denaturacji i inaktywacji separowanych białek, co w przypadku elektroforezy preparatywnej naraża eksperymentatora na duże straty. Przy zastosowaniu zbyt dużej mocy, można zaobserwować topnienie żeli agarozowych, a w innych rodzajach elektroforezy może dojść do pęknięcia szklanych płyt czy nawet uszkodzenia aparatu poprzez termiczne odkształcenia jego plastikowych elementów. Dlatego współcześnie użytkowane dobre aparaty do elektroforezy mają możliwość aktywnego odprowadzania lub rozpraszania nadmiaru ciepła z całej objętości żelu.

## RODZAJE NOŚNIKÓW ELEKTROFORETYCZNYCH

**Nośniki elektroforetyczne** - Rozdziały elektroforetyczne mogą być prowadzone bezpośrednio w objętości elektrolitu, rozwiązanie takie stosowane jest często w elektroforezie kapilarnej, lub w nośniku elektroforetycznym wypełnionym odpowiednim elektrolitem. W tym drugim przypadku nośnik elektroforetyczny (bibuła, azotan celulozy, agaroza, poliakrylamid i inne) nie tylko stabilizuje elektrolit ale często przyczynia się do lepszej separacji makrocząsteczek. Szczególnie zastosowanie porowatych nośników (agaroza, poliakrylamid) potęguje efekt separacji poprzez dodatkowe frakcjonowanie makrocząsteczek na zasadzie sita molekularnego.

Żele agarozowe i poliakrylamidowe mają postać przestrzennie usieciowanych struktur i choć zajmuje ona zaledwie około 0,5 - 1,0% objętości całego nośnika (reszta przypada na elektrolit) to jednak rozmiary porowatości porównywalne są z rozmiarami typowych makrojonów, a co za tym idzie, większe z nich doznają większych oporów ruchu w polu elektrycznym. Na efekt separacji ze względu na różną ruchliwość makrojonów, związaną z ich rozmiarami i uwodnieniem, nakłada się efekt separacji ze względu na opory ruchu w stosunku do nośnika. Ponieważ oba efekty działają w tym samym kierunku, separacja makrojonów w porowatym nośniku jest bardzo dobra. Jeszcze lepsze efekty separacji można uzyskać w porowatych nośnikach o narastającej, wraz z dystansem migracji, gęstości sieciowania. Mówimy wówczas o nośnikach (żelach) gradientowych. W nośnikach takich stosunkowo dobrze rozdzielane są zarówno duże makrocząsteczki białkowe lub ich kompleksy, jak i niewielkie peptydy. Akrylamid pozwala przygotować nośniki o bardzo gęstym usieciowaniu i niewielkich porach, co umożliwia separację makrocząsteczek białkowych o masach rzędu 5 K - 300 K lub polinukleotydów o wielkości 5 - 2 000 par zasad (*ang. base pairs - bp*). Nośniki agarozowe charakteryzują się znacznie uboższym usieciowaniem i większymi porami. Pozwala to na separację znacznie większych makrocząsteczek białkowych, przykładowo multimerycznych cząsteczek czynnika VonWillebranda (1-10 M) lub immunoglobulin IgM (1 M), oraz znacznie większych fragmentów kwasów nukleinowych (50 - 30 000 bp).

Przy poszukiwaniu nowego rodzaju nośnika należy zawsze pamiętać, że powinien on być elektrycznie obojętny. Występowanie związanego z nośnikiem ładunku elektrycznego prowadzi do niekontrolowanych oddziaływań makrojonów z tym ładunkiem i w rezultacie zmianę prędkości ich migracji, aż do całkowitego zatrzymania makrojonu. Jednocześnie istnienie takiego ładunku elektrycznego przyczynia się do migracji cząsteczek wody w kierunku katody. Proces ten nazwano elektroendoosmozą. Generalnie istnienie związanego z powierzchnią nośnika ładunku elektrycznego prowadzi do znaczącego obniżenia rozdzielczości elektroforezy.

**Żele agarozowe** - przygotowywane są z agarozy, wielocukru pochodzącego z agaru. Agarozę w postaci handlowej jest białym lub lekko żółtawym proszkiem. Rozpuszcza się bardzo, łatwo w gotującej się wodzie i pozostaje w stanie płynnym aż do temperatury około

40°C. Poniżej tej temperatury zestala się w postaci porowatego żelu. Po zestaleniu pozostaje w tej postaci nawet w podwyższonych temperaturach sięgających kilkudziesięciu °C. W temperaturze wrzenia wody ulega ponownie topnieniu. Rozmiary porowatości można regulować stosując agarozę w różnych stężeniach. Im wyższe jest stężenie agarozy, tym bogatsze jest usieciowanie i drobniejsze są pory. Zwykle przygotowuje się żele o stężeniach agarozy z przedziału 0,4-4,0% i stosuje się je w aparatach do elektroforezy poziomej. Zaletą żeli agarozowych jest łatwość i szybkość ich przygotowania oraz możliwość separacji dużych makrocząsteczek. Wadą zaś jest słaba wytrzymałość mechaniczna żeli oraz trudność ich utrwalania po rozdziale. Wyschnięte żele rozsypują się pod wpływem bardzo niewielkich sił.

**Żele poliakrylamidowe** - przygotowywane są z roztworu monomerów akrylamidu i substancji sieciujących (*ang. cross-linkers*). Należy zawsze pamiętać, że akrylamid w postaci monomerycznej jest bardzo silną neurotoksyną i nawet po procesie polimeryzacji stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ze względu na pozostałości swobodnych monomerów w objętości żelu. Jako substancję sieciującą stosuje się najczęściej N,N'-metylenebisakrylamid (bis-akrylamid). Reakcję polimeryzacji, będącą w istocie wolnorodnikową reakcją polimeryzacji, można zainicjować chemicznie lub fotochemicznie. Przy chemicznej inicjacji procesu najczęściej stosuje się nadsiarczan amonu w obecności katalizatora N,N,N',N'-tetrametyletylenodiaminy (TEMED). Fotochemiczne wyzwolenie procesu polimeryzacji zachodzi w obecności ryboflawiny pod działaniem długofalowego światła UV i jest katalizowane przez TEMED. Ze względu na wydzielanie się znacznych ilości ciepła podczas polimeryzacji akrylamidu, dla właściwego przebiegu procesu należy przestrzegać odpowiedniego dozowania substancji inicjujących i katalizujących, tak aby czas polimeryzacji nie był krótszy od 30 minut. W szczególnych przypadkach, gdy zawartość akrylamidu przekracza 15%, należy zapewnić efektywne odprowadzanie powstałego ciepła poprzez umieszczenie kasety z polimeryzującym żelem w łaźni wodnej. Gęstość sieciowania oraz rozmiary porów można regulować poprzez odpowiedni dobór stężenia akrylamidu i bis-akrylamidu. Właściwości żelu przyjęto opisywać dwoma parametrami. Najczęściej mówi się o całkowitym (*ang. total*) stężeniu akrylamidu:

$$T [\%] = ((\text{akrylamid} + \text{bis-akrylamid}) [\text{g}] / \text{objętość} [\text{ml}]) \times 100$$

Dopełniającym parametrem jest wagowy stosunek ilości substancji sieciującej do sumy akrylamidu i substancji sieciującej:

$$C [\%] = (\text{bis-akrylamid} [\text{g}] / (\text{akrylamid} + \text{bis-akrylamid}) [\text{g}]) \times 100$$

Ze wzrostem wartości T maleje średni rozmiar porów. Natomiast minimalny rozmiar porów, przy zadanej wartości T, uzyskuje się dla wartości C = 5%. Powyżej i poniżej tej wartości rozmiary porów wzrastają.

Jeżeli przedmiotem separacji jest mieszanina białek o bardzo mocno zróżnicowanych masach, wskazanym jest zastosowanie żelu gradientowego. Jest to żel o narastającej, wraz z dystansem migracji, gęstości sieciowania. Na jego wejściu rozmiary porów są duże i pozwalają migrować zarówno dużym jak i znacznie mniejszym makrocząsteczkom. W tym obszarze oddzielane są duże makromolekuły od małych oraz dochodzi do różnicowania ruchliwości dużych makromolekuł. Wraz ze wzrostem dystansu migracji usieciowanie wzrasta i maleją rozmiary porów. W ten obszar nie wnikają już duże makromolekuły i dochodzi do dalszej separacji średnich i małych cząsteczek. Przy dalszym wzroście gęstości sieciowania rozmiary porów stają się bardzo małe i umożliwiają migrację i separację tylko najmniejszych makrocząsteczek.

## RODZAJE KOMÓR ELEKTROFORETYCZNYCH

Ze względu na sposób umieszczenia nośnika elektroforetycznego można wyróżnić elektroforezę kapilarną (*ang. capillary electrophoresis*), elektroforezę pionową (*ang. vertical electrophoresis*) oraz elektroforezę poziomą (*ang. horizontal electrophoresis*).

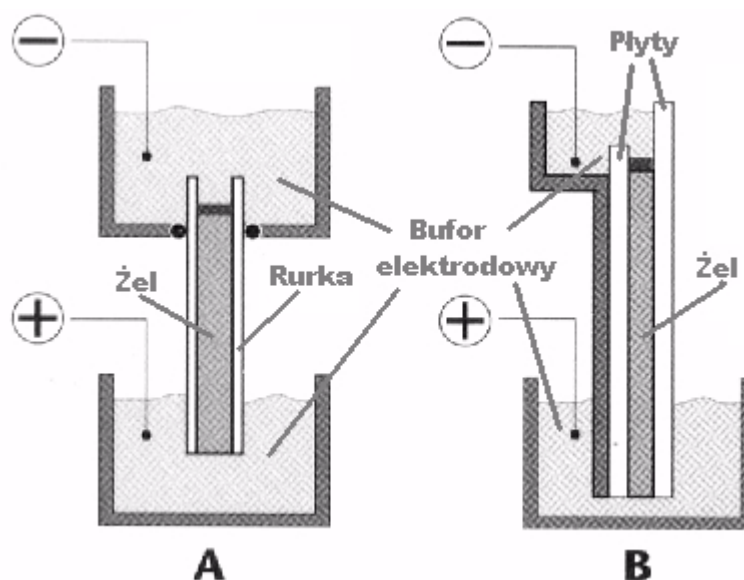
**Elektroforeza kapilarna.** W elektroforezie kapilarnej, określanej często skrótem HPCE (*ang. high performance capillary electrophoresis*) elektrolit wypełnia kapilarę o wewnętrznej średnicy 50 - 100  $\mu\text{m}$  i długości 20-30 cm. Oba końce kapilary zanurzone są w zasobnikach z odpowiednimi elektrolitami. Sama kapilara wypełniona jest swobodnym elektrolitem (elektroforeza swobodna) lub porowatym nośnikiem (elektroforeza na nośniku). Do obu końców kapilary przykłada się wysokie napięcie co skutkuje pojawieniem się we wnętrzu kapilary pola elektrycznego o wartości natężenia około 1kV/cm i prądu rzędu 10 mA. Przeznaczeniem elektroforezy kapilarnej są rozdziały analityczne i mikropreparatywne. Ilość nanoszonego materiału do analizy jest bardzo niewielka - rzędu pojedynczych nanogramów. Objętość aplikowanej próbki waha się zwykle w przedziale 2-4 nl ( $2\text{-}4 \times 10^{-9}$  l). Czas rozdziału jednej próbki wynosi około 10-20 minut. Detekcja rozdzielonych grup makrocząsteczek realizowana jest u ujścia kapilary przy pomocy detektora o konstrukcji zbliżonej do przepływowego detektora stosowanego w chromatografii cieczowej.

**Elektroforeza pionowa** - jest najpowszechniej stosowaną techniką. W technice tej nośnik elektroforetyczny wypełnia szklane rurki (elektroforeza rurkowa) lub znajduje się pomiędzy dwoma płytkami rozdzielonymi przekładkami dystansowymi (*ang. spacer*) (elektroforeza płytowa). Na rysunku 1 pokazano schematycznie oba rodzaje elektroforezy pionowej.

Rys. 1.

Schematyczne przedstawienie rodzajów elektroforezy pionowej.

- A. elektroforeza rurkowa (*ang. tube electrophoresis*)
- B. elektroforeza płytowa (*ang. slab electrophoresis*)



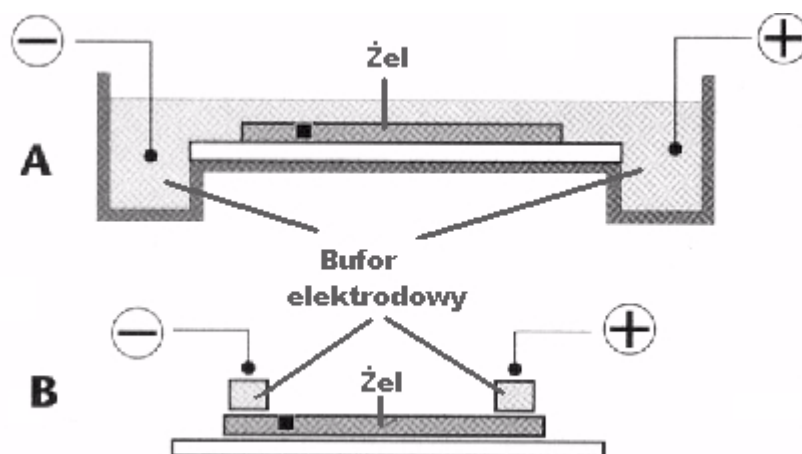
Jak łatwo zauważyć, górna część nośnika musi być przykryta warstwą buforu elektrodowego (elektrolitu). Rozwiązanie takie ma naturalną tendencję do wyciekania buforów z górnego naczynia, co wymaga uwagi laboranta podczas trwania rozdziału. Brak kontaktu elektrolitu z żel powoduje przerwanie obwodu elektrycznego i w związku z tym przerwanie procesu elektroforezy. Inną niedogodnością tego rozwiązania jest trudność

z odprowadzeniem ciepła generowanego przez przepływający prąd. Dotyczy to szczególnie elektroforezy rurkowej. W przypadku elektroforezy płytowej możliwe jest odprowadzanie ciepła przez ściankę kontaktującą się z jedną z płyt. Zaletą tego typu rozwiązania jest zwykle stosunkowo niska cena dostępnych na rynku aparatów.

**Elektroforeza pozioma** - jest rodzajem elektroforezy w którym nośnik umieszczony jest w płaszczyźnie poziomej (rys. 2). Zaletą tego rozwiązania jest brak wycieków elektrolitu oraz możliwość łatwego odprowadzenia ciepła generowanego w trakcie przepływu prądu. Elektroforeza półsucha, w której bufor elektrodowy zamknięty są w zestalonej agarozie lub w warstwach bibuły filtracyjnej, pozwala ponadto na znaczne ograniczenie zużycia chemikaliów niezbędnych do przygotowania buforów.

Rys. 2.

Schematyczne przedstawienie elektroforezy poziomej  
A. elektroforeza zanurzeniowa  
(ang. *submarine electrophoresis*)  
B. elektroforeza półsucha  
(ang. *semi-dry electrophoresis*)



## RODZAJE ELEKTROFOREZY

Metody elektroforetyczne stosowane w praktyce są pochodnymi lub kombinacją trzech podstawowych rodzajów separacji. Są to: elektroforeza strefowa (ang. *zone electrophoresis*), izotachoforeza (ang. *isotachphoresis*) oraz ogniskowanie izoelektryczne (ang. *isoelectric focusing*).

**Elektroforeza strefowa** - podstawowy i najszersze stosowany rodzaj elektroforezy. Odbywa się w nośniku, w którym elektrolit ma w całej objętości stałą wartość pH. Różnica dystansów migracji poszczególnych makrojonów, w ciągu określonego czasu, w bezpośredni sposób wynika z różnicy w ruchliwości elektroforetycznej tych jonów w nośniku w obecności pola elektrycznego.

**Izotachoforeza** - w tym rodzaju elektroforezy rozdział odbywa się w nośniku, w którym występuje nieciągłość wartości pH. Makroiony separowanej próbki migrują w obszarze pomiędzy dwoma systemami elektrolitów o różnej wartości pH i różnej ruchliwości jonów elektrolitu. Elektrolit wiodący (ang. *leading electrolyte*) zawiera jony o dużej ruchliwości elektroforetycznej, znacznie przewyższającej ruchliwość makrojonów. Z kolei elektrolit zamykający (ang. *tailing electrolyte*) zawiera jony o bardzo niskiej ruchliwości elektroforetycznej, zwykle znacznie niższej od ruchliwości makrojonów. W obszarze pomiędzy tymi dwoma elektrolitami znajdują się separowane makroiony. Wszystkie jony - wiodące, zamykające oraz makroiony - migrują w tym obszarze z tą samą

prędkością ale w ściśle określonym porządku. Najpierw przemieszczają się jony wiodące, a za nimi najszybsze makrojon. Potem kolejno makrojon zgodnie z ich malejącą ruchliwością i w końcu jony zamykające. Wynikiem tego rodzaju elektroforezy jest uporządkowanie makrojonów zgodnie z ich malejącą ruchliwością elektroforetyczną, przy czym separacja ta zachodzi w bardzo małym obszarze będącym granicą dwóch systemów elektrolitów. Używa się w ten sposób dodatkowy efekt zagęszczania makrojonów w małej objętości.

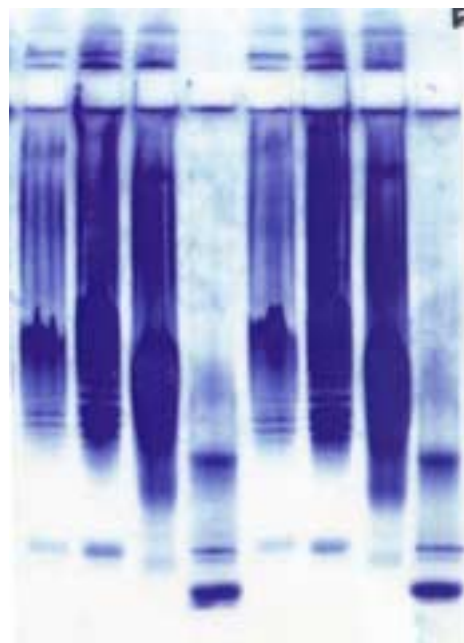
**Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)** - odbywa się w nośniku, w którym wartość pH buforu zmienia się w sposób ciągły od wartości najwyższej przy katodzie do najniższej przy anodzie. Ustalenie się gradientu pH możliwe jest dzięki zastosowaniu specjalnych nośników pH zwanych amfolinami. Amfoteryczne substancje (białka, peptydy) migrują w polu elektrycznym w kierunku elektrod o znaku przeciwnym ich ładunkowi. Napotykając jednak po drodze zmieniające się wartości pH elektrolitu zatrzymują się w miejscu, w którym  $pH = pI$ . W elektrolicie o wartości pH równej wartości  $pI$  wypadkowy ładunek makrocząsteczki równa się zero i obojętna elektrycznie makrocząsteczka zatrzymuje się nie doznając działania sił pola elektrycznego. Używa się w ten sposób separację molekuł białkowych zgodnie z ich wartościami  $pI$ .

Elektroforeza strefowa może występować w różnych odmianach, z których najczęściej używana jest:

**Elektroforeza natywna** - to rodzaj elektroforezy prowadzony zwykle w poliakrylamidzie w warunkach, w których makrocząsteczki pozostają niezdenaturowane. Zaletą tego typu separacji elektroforetycznej jest możliwość odzyskania cząsteczek białkowych w stanie pełnej aktywności biologicznej. Wadą zaś jest stosunkowo słaba rozdzielczość metody.

**Rys. 3.**

Przykład elektroforezy białek w warunkach natywnych. Analizie poddano białka wyekstrahowane z różnych odmian jęczmienia. Separację przeprowadzono w żelu **CleanGel 25S** uwodnionym w buforze do natywnej elektroforezy pH 5,0, zawierającym mocznik i niejonowy detergent.



**Elektroforeza w obecności SDS** - ten rodzaj elektroforezy jest najczęściej stosowany dla separacji makromolekuł białkowych. Zastosowanie SDS (siarczan dodecylu sodu) - substancji powierzchniowo czynnej - przyczynia się do znacznego poprawienia rozdzielczości techniki elektroforetycznej. Potraktowanie cząsteczki białka przez SDS skutkuje powstaniem



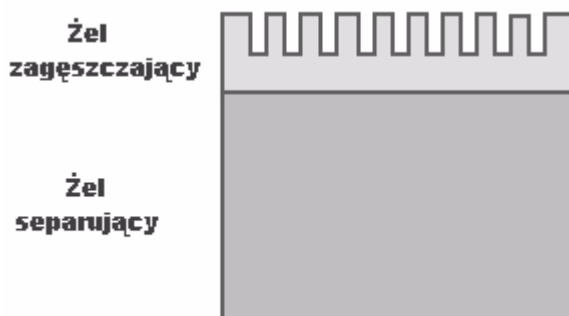
kompleksów białko-SDS o ustalonym stosunku ładunku elektrycznego do masy. Wykazano, że 1g białka wiąże 1,4g SDS. W kompleksie takim SDS skutecznie maskuje oryginalny ładunek białka normalnie występujący w danym elektrolicie. Właściwość ta pozwala na łatwe i dokładne oznaczenie mas cząsteczkowych rozdzielonych białek. Obecność SDS przynosi szereg korzyści:

- zdecydowana większość białek jest rozpuszczalna w elektrolitach zawierających SDS, szczególnie po redukcji mostków disiarczkowych
- separacja białek odbywa się zgodnie z ich masami cząsteczkowymi
- barwienia kompleksów białko-SDS jest znacznie wydajniejsze niż samego białka
- obecność SDS skutecznie eliminuje enzymatyczną degradację białek w trakcie separacji.

**Elektroforeza nieciągła** - połączenie izotachoforezy z elektroforezą strefową prowadzi do jeszcze lepszych rezultatów separacji białek. Nośnik elektroforetyczny składa się z dwóch kontaktujących się ze sobą części wypełnionych elektrolitami o różnym składzie i różnej wartości pH (rys. 4) (*ang. discontinue electrophoresis or disc-electrophoresis*). W górnej części nośnika znajduje się żel zagęszczający, czasami określany jako ogniskujący, (*ang. stacking gel*), w którym realizuje się izotachoforeza. Uporządkowane i zagęszczone tam cząsteczki białka wchodzi do drugiej części nośnika zwanej żelem separującym (*ang. running gel*). W tym żelu zachodzi elektroforeza strefowa.

**Rys. 4.**

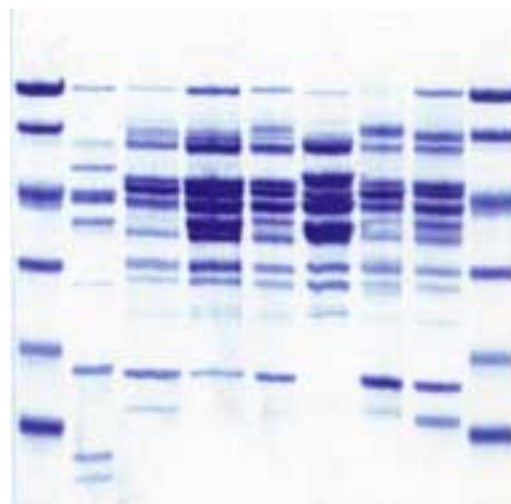
Schemat żelu do elektroforezy nieciągłej. Skład elektrolitów i wartość pH obu żeli oraz ich porowatości różnią się



W wyniku połączenia obu metod uzyskuje się bardzo ostre prążki zawierające białka o tej samej ruchliwości elektroforetycznej, co często jest interpretowane jako białka o tej samej masie cząsteczkowej (rys 5).

**Rys. 5.**

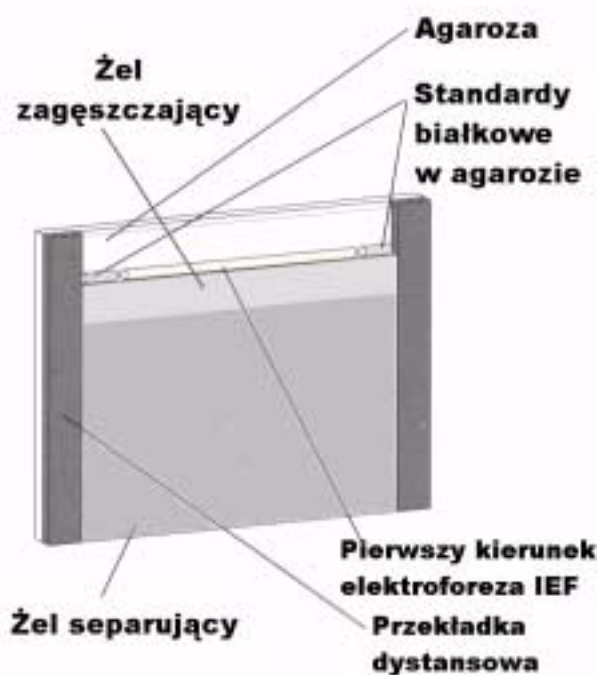
Przykład elektroforezy w obecności SDS. Analizie poddano białka zwierzęce i ryb ekstrahowane z różnych tkanek. Rozdział wykonano w żelu **ExcelGel Homogenous 15**. Dwie skrajne ścieżki zawierają standardy mas cząsteczkowych, co pozwala przyporządkować białkom na pozostałych ścieżkach odpowiednie masy cząsteczkowe.



**Elektroforeza dwukierunkowa (2D)** - jest to połączenie dwóch, a czasami wszystkich trzech podstawowych rodzajów elektroforezy. Procedura rozpoczyna się od separacji białek techniką ogniskowania izoelektrycznego. Ten rodzaj separacji wykonuje się przy pomocy elektroforezy rurkowej (elektroforeza pionowa) lub na paskach nośnika w elektroforezie poziomej i zwany jest pierwszym kierunkiem (wymiarom) elektroforezy 1D (*ang. first dimension or 1D*). Po wykonaniu tego etapu procedury nośnik zawierający rozdzielone białka przenoszony jest na elektroforezę płytową w celu wykonania separacji według mas cząsteczkowych (rys. 6). Na tym etapie może być stosowana elektroforeza nieciągła, w skład której wchodzi izotachforeza oraz elektroforeza strefowa, ale często bywa stosowana tylko elektroforeza strefowa. Po zakończeniu procedury 2D i wybarwieniu żelu uzyskuje się dwuwymiarową mapę rozkładu białek, gdzie współrzędnymi są wartości pI oraz masy cząsteczkowe MW poszczególnych cząsteczek zawartych w odrębnych wybarwionych obszarach (*ang. spots*) (rys. 7). Można w ten sposób rozdzielić, na jednym żelu, kilka tysięcy białek znajdujących się w danym rodzaju komórek. Metoda ta pozwala na stosunkowo łatwą analizę zmian ekspresji genu kodującego analizowane białko (białka) i jest wiodącą techniką zaadoptowaną na potrzeby programu proteomiki.

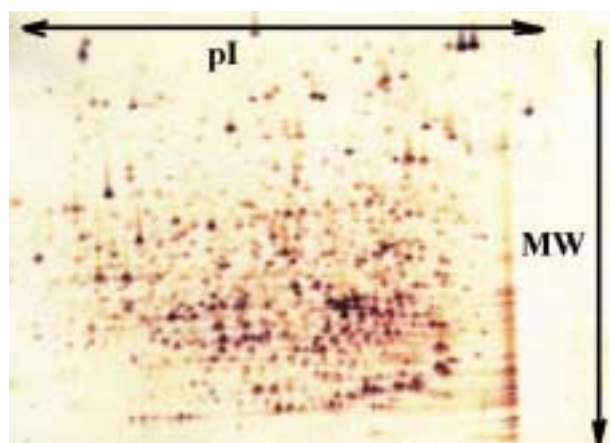
**Rys. 6.**

Schemat wykonania elektroforezy 2D. Białka rozdzielone techniką ogniskowania izoelektrycznego (1D) przenoszone są na elektroforezę płytową gdzie realizuje się drugi kierunek elektroforezy separujący białka według ich mas cząsteczkowych (2D).



**Rys. 7.**

Przykład elektroforezy dwukierunkowej. Białka ekstrahowane z mysiej wątroby rozdzielane były w pierwszym kierunku (1D) przy pomocy **ImmobilineStrip pH 3-10**, a w drugim kierunku (2D) w żelu SDS-ExcelGel XL.





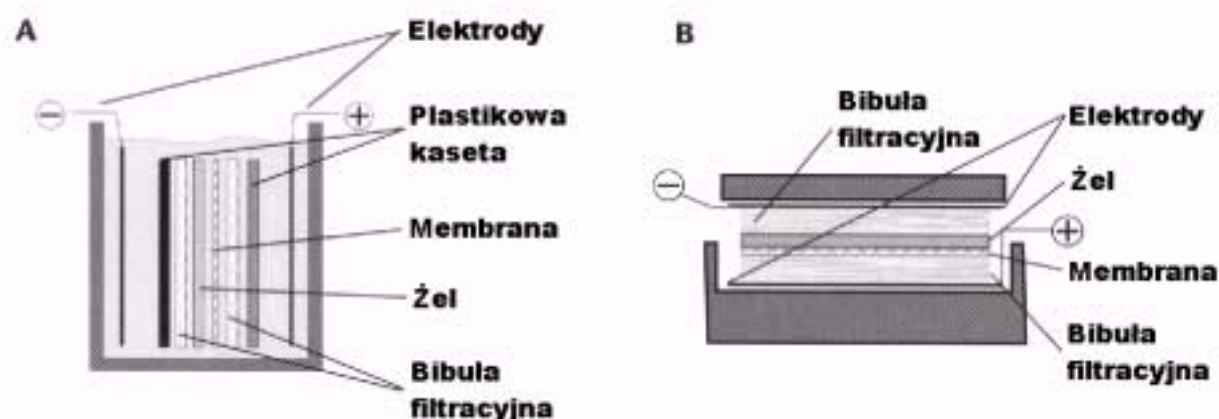
**Immunoelktroforeza** - opiera się na zjawisku precypitacji wielocząsteczkowych kompleksów antygen-przeciwciała i pozwala na detekcję obecności antygeny oraz określenie ilości tego antygeny w próbce. W praktyce stosuje się trzy rodzaje techniki:

- immunoelktroforeza przeciwbieżna, w której elektrolit ma tak dobraną wartość pH (około 8,6) aby immunoglobuliny nie posiadały niezerównoważonego ładunku elektrycznego i nie podlegały działaniu sił pola elektrycznego. Próbkę zawierającą antygen nanosi się przy katodzie aby migrowała w kierunku anody. Przy anodzie zaś nanosi się przeciwciała, które kierują się w kierunku katody dzięki zjawisku elektrosomozy. W miejscu kontaktu przeciwciała z antygenem dochodzi do powstawania wielocząsteczkowych kompleksów i ich precypitacji. Jest to widoczne bez barwienia jako mleczno-opalizujące linie. Po wybarwieniu linie precypitacji widoczne są na tle innych prążków.
- Elektroforeza strefowa z immunodyfuzją, w której najpierw prowadzi się zwykłą separację strefową (często w warunkach natywnych), a po zakończeniu rozdziału z obu stron w kierunku prostopadłym do separacji elektroforetycznej podaje się na nośnik przeciwciała. W wyniku dyfuzji rozdzielonych białek oraz naniesionych przeciwciała dochodzi do kontaktu antygeny z przeciwciałem i powstawania wielocząsteczkowych kompleksów, które precypitują w miejscu powstania w postaci charakterystycznych łuków. Metoda pozwala również na identyfikację antygeny a intensywność linii precypitacji i odległość od naniesionego przeciwciała świadczy o ilości antygeny.
- Immunoelktroforeza rakietowa - prowadzona jest w nośniku elektroforetycznym wysyconym badanym przeciwciałem w warunkach  $pH=pI$  przeciwciała. W kierunku od katody do anody elektroforetycznie migruje próbka zawierająca antygen. W miejscu kontaktu antygen-przeciwciała dochodzi do precypitacji wielocząsteczkowych kompleksów. W wyniku tego powstają charakterystyczne linie o kształcie startującej rakiety. Technika pozwala określić ilość antygeny przez porównanie powierzchni zawartej pod krzywą. Technika ta doczekała się szeregu modyfikacji, w tym separacji dwukierunkowej.

**Sekwencjonowanie DNA** - polega na elektroforetycznej separacji produktów chemicznej syntezy DNA (Maxam i Glibert) lub produktów działania polimerazy DNA (Sanger i Coulson). W obu przypadkach, dzięki zastosowaniu czterech reagentów losowo blokujących syntezę nici DNA (dla syntezy chemicznej w miejscach G, A+G, C, C+T, w syntezie enzymatycznej w miejscach A, C, G, T) uzyskuje się cztery zestawy fragmentów o różnych długościach. Separacja tych fragmentów w warunkach denaturujących (jednoniciowe DNA) pozwala na dokładne określenie długości tych fragmentów, a przez to określenie sekwencji DNA. Przy manualnym sekwencjonowaniu stosuje się znakowanie starterów lub nukleotydów izotopami  $^{32}P$  lub  $^{35}S$ , i następującą po elektroforezie autoradiografię. W automatycznych sekwenatorach, w których produkty reakcji nanosi się do automatycznej separacji i detekcji, stosuje się barwniki fluorescencyjne pobudzane do świecenia światłem lasera. Informacja o separacji zbierana jest wtedy w czasie rzeczywistym przez odpowiednie detektory fluorescencji. Obecnie coraz częściej wprowadza się znaczniki fluorescencyjne do manualnego sekwencjonowania DNA.

**Transfer elektroforetyczny** - szczególnym przypadkiem zastosowania elektroforezy jest elektroforetyczne przenoszenie (transfer elektroforetyczny) na membrany wiążące białka (azotan celulozy, PVDF i inne) cząsteczek białkowych rozdzielonych uprzednio w żelu. Głównym celem transferu jest identyfikacji cząsteczek technikami immunobarwienia (*ang. immunoblotting*). Na rysunku 8 przedstawiono schematycznie ideę transferu

elektroforetycznego. Transfer wykonywany w technice elektroforezy pionowej jest obecnie najczęściej stosowany w praktyce laboratoryjnej, choć nie jest wolny od poważnych wad. Do wykonania transferu potrzeba szczelnego pojemnika zawierającego znaczną ilość elektrolitu. Podczas prowadzenia transferu prąd elektryczny płynie całą objętością elektrolitu i tylko niewielka jego część przepływa przez żel. Generowana jest duża ilość ciepła, które trzeba odprowadzić na zewnątrz. Stąd konieczność prowadzenia transferu w chłodniach. Ograniczenie emisji ciepła możliwe jest tylko przez obniżenie wartości płynącego prądu, a co za tym idzie wydłużenie czasu trwania transferu do kilku- kilkunastu godzin. Często bywa też, że zbyt długo prowadzony transfer powoduje przeniesienie białek poza membranę i jego



**Rys. 8.** Schemat transferu elektroforetycznego. A - Transfer wykonywany w technice elektroforezy pionowej. B - transfer wykonywany w technice elektroforezy poziomej półsuchej.

rozcieńczenie w elektrolicie, czyli ich utratę. Wolny od większości tych wad jest transfer prowadzony w technice półsuchej w warunkach elektroforezy poziomej. Technika ta potrzebuje niewielkiej ilości elektrolitu uwięzionego w bibułach filtracyjnych, których rozmiar i kształt można dopasować do żelu i membrany. Wtedy prąd płynie praktycznie tylko przez żel, przyczyniając się do bardzo efektywnego przenoszenia cząsteczek białkowych z żelu na membranę. Czas trwania takiego transferu jest rzędu kilku- kilkunastu minut, a ilość wytworzonego ciepła jest z powodzeniem odprowadzana przez masywne elektrody grafitowe. Co więcej, jeżeli zdarzy się, że transfer trwa zbyt długo i białka zostaną przeniesione poza docelową membranę, to znajdują się one w bibule filtracyjnej i można je z łatwością odzyskać. Aby jednak nie dopuścić do takiej sytuacji wystarczy pomiędzy bibułę a docelową membranę położyć worek dializacyjny przepuszczający małe jony ale zatrzymujący makrojon przy membranie.

## PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ELEKTROFOREZY

Odpowiednie przygotowanie próbek jest równie ważne jak właściwa polimeryzacja żelu oraz sporządzenie elektrolitów. Każdy rodzaj elektroforezy wymaga innych warunków przygotowania próbek. Ale we wszystkich przypadkach separowana próbka nie może zawierać zbyt dużej ilości soli, która w postaci zjonizowanej powoduje zakłócenie migracji

makrojonów, przyczyniając się do powstawania smug i niejednorodności prążków. Należy również pamiętać, że separacja makrojonów zależy również od ich ilości w próbce. Zbyt mała ilość makrojonów, powoduje trudności w ich detekcji, a zbyt duża ich ilość pogarsza warunki separacji, prążki są zbyt rozległe i nakładają się na siebie. Ilość makrocząsteczek poddających się prawidłowej separacji zależy od wielu czynników, a najbardziej od grubości nośnika, szerokości ścieżki, objętości nanoszonej próbki oraz od liczby różnych makrocząsteczek w próbce. Jako regułę należy przyjąć, że dobry rozdział w warunkach elektroforezy nieciągłej może zostać osiągnięty tylko wtedy, gdy objętość próbki nie przekracza 10% objętości ścieżki, a ilość makrocząsteczek przypadających na prążek znajduje się w przedziale 1-10 µg. Dobrym sposobem postępowania jest obciążanie próbki dobrze rozpuszczalną substancją pozbawioną ładunku elektrycznego. Dodatek taki pozwala na umieszczenie próbki bezpośrednio na powierzchni żelu bez zbędnego mieszania jej z elektrolitem. Jest to szczególnie istotne w przypadku elektroforezy pionowej. Probka powinna być zabarwiona tak, aby można było obserwować jej nanoszenie na nośnik. Eliminuje to możliwość pomyłkowego naniesienia dwóch lub więcej próbek na tę samą ścieżkę rozdzielu. Jednocześnie barwnik może informować o właściwej wartości pH w próbce. Poniżej podane są podstawowe informacje o przygotowaniu próbek dla poszczególnych rodzajów elektroforezy oraz separowanych makrocząsteczek - białek i kwasów nukleinowych.

**Elektroforeza natywna białek** - należy zwrócić uwagę aby próbka była całkowicie rozpuszczona ale w buforze nie powodującym denaturacji separowanych makrocząsteczek. Probka powinna być przygotowywana i przechowywana w niskiej temperaturze w celu zabezpieczenia jej składników przed degradacją proteolityczną. W tym samym celu można do próbki dodać inhibitorów proteaz serynowych (PMSF i EDTA) do końcowego stężenia 1 mM. Probka powinna być pozbawiona nadmiaru soli poprzez dializę lub filtrację żelową. Dobrze aby skład elektrolitu próbki był zbliżony do tego, który znajduje u wejścia do nośnika elektroforetycznego. Gęstość próbki można podwyższyć przez dodanie glicerolu (10%) i zabarwić przy pomocy 0,25% błękitu bromofenolu (*ang. bromophenol blue*).

**Elektroforeza w obecności SDS** - białka zawarte w próbce powinny być zdenaturowane przez dodanie 1-2% SDS (w pH 7,0 - 9,0) i gotowane w ciągu 3-4 minut. W celu rozbicia wiązań disiarczkowych do próbki należy dodatkowo dodać czynnika redukującego: 1% merkaptotanol lub DTT (ditiotreitól) oraz 10 mM EDTA. Probka powinna być wcześniej odsolona (dializa lub filtracja żelowa) i zrównoważona elektrolitem wypełniającym nośnik na który będzie naniesiona. Do próbki można dodać glicerolu (10%) oraz błękitu bromofenolu (0,25%), uzyskując w ten sposób wyższą gęstość próbki i jej intensywne zabarwienie. Bezpośrednio przed naniesieniem na żel próbkę należy odwirować aby usunąć wszystkie nierozpuszczone składniki.

**Ogniskowanie izoelektryczne** - próbka powinna być pozbawiona soli i substancji buforujących przez zastosowanie dializy lub filtracji żelowej. Jedynie w niezbędnych przypadkach, gdy białka nie są rozpuszczalne w czystej wodzie, można próbować pozostawić próbkę w buforze sprzyjającym rozpuszczeniu białka. Jednak stężenie jonów i substancji buforujących powyżej 50 mM może być przyczyną kłopotów w uzyskaniu dobrej separacji makrocząsteczek.

**Elektroforeza natywna DNA** - przygotowanie próbki jest stosunkowo proste. Zaleca się rozcieńczenie przygotowanego DNA w elektrolicie wypełniającym nośnik w miejscu, na które próbka będzie naniesiona i dodanie EDTA (1 mM). Dla ułatwienia obserwacji do próbki można dodać błękitu bromofenolu.

## BARWIENIE, DOKUMENTACJA ORAZ ANALIZA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA

Ukończenie rozdziału elektroforetycznego czy transferu nie kończy procedury separacji. Większość białek i kwasów nukleinowych nie jest widoczna w świetle białym. Niezbędne jest ich wybarwienie (wizualizacja) w żelach lub na membranach, tak aby uzyskać informację o dystansie ich migracji i ich ilości w prążku lub spocie (obszarze zawierającym białko w rozdziale 2D). Postępowanie to pozwala na przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej separowanych makrocząsteczek.

**Barwienie** - stosowanych jest wiele metod wizualizacji żeli i membran. Białka najczęściej wybarwia się stosując naturalne barwniki, takie jak błękit kumassi (*ang. Coomassie Brilliant Blue*) czy czern amidową. Barwnik dodawany jest zwykle do roztworu utrwalającego po położeniu białka w żelu (denaturacja i unieruchomienie molekuł), po czym nadmiar barwnika jest wymywany. Pozostaje tylko barwnik związany z białkami. Czułość takiej detekcji białek jest stosunkowo dobra. Można w ten sposób znaleźć 1 µg białka w prążku. Znacznie bardziej czułą metodą jest barwienie srebrem. Metoda ta pozwala oznaczyć 10 ng białka w prążku. Przy pomocy srebra można również wybarwić kwasy nukleinowe oraz oligonukleotydy, a czułość detekcji zbliżona jest również do 10 ng DNA na prążek.

**Barwienie fluoroforami** - tradycyjnie oligonukleotydy barwione są przy pomocy bromku etyldyny, barwnika wykazującego właściwości fluorescencyjne. Obraz separacji makrocząsteczek może być wtedy uwidoczniiony w świetle UV (około 300 nm). Ten sposób barwienia wymaga dużej ostrożności ze strony laboranta ze względu na silnie karcinogenne właściwości bromku etyldyny. Obecnie dostępne są liczne barwniki fluorescencyjne pozwalające na uwidocznienie białek i oligonukleotydów po zakończeniu elektroforezy lub wybarwienie makrocząsteczek przed separacją. Wszystkie te znaczniki uwidaczniają położenie prążków w świetle UV lub rzadziej w świetle widzialnym. Czułość detekcji jest porównywalna z barwieniem srebrem lub jest nieco lepsza.

**Znakowanie radioizotopowe** - Bardzo wysoką czułość detekcji można uzyskać stosując znakowanie izotopami radioaktywnymi. Białka i peptydy zwykle znakuje się izotopami jodu  $^{125}\text{I}$  lub  $^{131}\text{I}$ , rzadziej izotopami węgla  $^{14}\text{C}$ , wodoru  $^3\text{H}$  lub siarki  $^{35}\text{S}$ . Oligonukleotydy najczęściej znakowane są izotopem fosforu  $^{32}\text{P}$  lub siarki  $^{35}\text{S}$ . Znakowanie makrocząsteczek radioizotopami odbywa się zawsze przed procesem separacji elektroforetycznej, często na etapie ich syntezy. Przy pracy z radioizotopami należy zawsze zachować szczególną ostrożność gdyż przez nieuwagę może dojść do niebezpiecznej dla zdrowia kontaminacji organizmu. Praca z izotopami promieniotwórczymi musi być prowadzona w odpowiednich pracowniach pod nadzorem inspektora ochrony przed promieniowaniem.

**Immunobarwienie** - jest techniką pozwalającą na wysoce selektywne barwienie białek i peptydów na membranach przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie, enzymatycznie lub radioizotopowo. W zależności od rodzaju znakowania przeciwciał mówimy o detekcji immunofluorescencyjnej, immunoenzymatycznej lub radioimmunologicznej. W technice tej istnieje możliwość zastosowania znakowanych białek A lub G, które specyficznie rozpoznają i wiążą się z fragmentem Fc immunoglobulin IgG. Technikę immunobarwienia nazywa się często techniką Western immunoblottingu i stosuje się dla detekcji białek. Analogiczną technikę dla detekcji fragmentów

oligonukleotydów na membranie lub w żelu nazywa się hybrydyzacją, a znakowane fragmenty sondami molekularnymi.

**Barwienie enzymatyczne** - jest bardzo szczególnym rodzajem wizualizacji enzymów, które w wyniku katalizy produkują barwny substrat. Ten rodzaj barwienia jest równie selektywny jak immunobarwienie ale jego zastosowanie ograniczone jest tylko do tych przypadków gdy wizualizacja dotyczy białek enzymatycznych.

**Dokumentacja rozdziałów** - najprostszą formą dokumentacji rozdziałów elektroforetycznych wykonanych w żelach poliakrylamidowych jest ich wysuszenie pomiędzy warstwą bibuły i celofanu lub pomiędzy dwoma warstwami celofanu. Wysuszony w ten sposób żel można przechowywać dowolnie długo bez widocznego uszczerbku w jakości tego dokumentu. Żele poliakrylamidowe przygotowane na folii można suszyć bez okrywania celofanem. Trudności pojawiają się wtedy, gdy trzeba wysuszyć żel o zawartości akrylamidu powyżej 15%. Odwodnienie żelu powoduje silne jego obkurczenie i w rezultacie pękanie. Można temu przeciwdziałać wypierając z żelu wodę glicerolem. Żele takie pozostają jednak nieco lepkie i muszą być okryte folią.

Żele agarozowe nie poddają się jednak tej formie dokumentowania. Najprostszym sposobem utrwalenia informacji zawartej w żelu agarozowym jest sporządzenie jego fotografii. Technikę tę można zastosować również do żeli poliakrylamidowych. Membrany po transferze elektroforetycznym i barwnej wizualizacji makrocząsteczek można przechowywać równie długo jak wysuszone żele poliakrylamidowe z tą jednak różnicą, że membrany muszą być chronione od światła.

Makrocząsteczki znakowane radioizotopowo, lub uwidaczniane metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem substratów chromogennych, pozwalają stosować technikę autoradiografii lub autoluminescencji. Wykorzystuje się do tego celu filmy fotograficzne (rentgenowskie) pozostawione na określony czas w kontakcie z radioaktywnym lub luminoaktywnym żelem albo membraną. Naświetlanie filmu odbywa się w światłoodpornej kasecie wyposażonej często w specjalne ekrany wzmacniające sygnał świetlny.

Od kilku lat do dokumentacji rozdziałów elektroforetycznych oraz membran stosuje się z powodzeniem kamery cyfrowe, a uzyskany obraz przechowywany jest w formie elektronicznej w pamięci komputera lub na dyskiecie. Kamery cyfrowe pozwalają na uzyskanie i przetworzenie obrazu żeli i membran wizualizowanych barwnie, z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych lub substratów chromogennych. Konkurencyjną metodą okazało się wprowadzenie skanerów optycznych, umożliwiających przetwarzanie na formę elektroniczną obrazu żeli i membran z detekcją makrocząsteczek metodami barwnymi, z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych, substratów chromogennych oraz radioizotopów. Obecnie uważa się, że dzięki bardzo dużemu zakresowi liniowości detekcji sygnału, metody wykorzystujące skanery optyczne pozwalają na znaczne obniżenie progu detekcji makrocząsteczek oraz dokładniejszą analizę ilościową uzyskanego obrazu.

**Analiza ilościowa i jakościowa** - Analiza jakościowa, mająca na celu pokazanie obecności danego białka i określenie jego względnej migracji w nośniku elektroforetycznym może być wykonana przez proste porównanie położenia poszczególnych prążków i słowne opisanie zaobserwowanego obrazu. Dokładna analiza ilościowa i jakościowa wymaga jednak zastosowania pewnych technik rachunkowych, uwzględniających zarówno informację o położeniu analizowanych prążków, jak i o intensywności wybarwienia tych prążków. Do tego celu stosuje się technikę densytometriowania analizowanego żelu, membrany lub ich elektronicznie przetworzonych obrazów. Uzyskane w ten sposób dane liczbowe pozwalają na:

- określenie masy cząsteczkowej (MW), wartości punktu izoelektrycznego (pI) lub liczby par zasad analizowanej makrocząsteczki w porównaniu z zastosowanymi wzorcami;
- określenie ilości molekuł w określonym prążku lub spocie na podstawie porównania ze znaną ilością tych molekuł w prążkach na sąsiednich ścieżkach lub w spotach uzyskanych w rozdzielach 2D w takich samych warunkach;
- określenie sekwencji nukleotydów w żelach sekwencyjnych

## PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ

Pod ogólną nazwą elektroforeza kryje się szereg odmian technik wykorzystujących różnorodny sprzęt laboratoryjny, stosujących różne nośniki elektroforetyczne, separujących peptydy i białka oraz kwasy nukleinowe. W prezentowanych poniżej przykładach czytelnik odnajdzie bardzo zróżnicowane techniki elektroforetyczne. Wszystkie przykłady stanowią oryginalne osiągnięcia autorów i zostały dobrane w ten sposób aby uzupełnić dostępne na rynku typowe noty aplikacyjne.

Zawarte w niniejszym opracowaniu przykłady pokazują zastosowanie najczęściej stosowanej techniki elektroforetycznej - elektroforezy strefowej białek (przykłady: 1, 2, 3, 4, 5, 12, 13 i 16) i kwasów nukleinowych (przykłady: 14, 15) z pewną odmianą elektroforezy strefowej stosowanej do analizy sekwencyjnej DNA (przykłady: 17,18,19,20). Analiza białek w technice izoelektroogniskowania (IEF) pokazana jest w przykładach 6, 7 i 8, a pełna elektroforeza dwukierunkowa, zawierająca w sobie zarówno technikę IEF (pierwszy kierunek) jak i elektroforezę strefową (drugi kierunek) znalazła swój opis w przykładach 9, 10 i 11. Przykłady 12 i 13 pokazują możliwości półsuchego transferu elektroforetycznego na membranę białek rozdzielonych uprzednio w żelu. Przykład 12 ilustruje jak szybko i efektywnie można dokonać transferu bez znaczących strat białek i peptydów, a przykład 13 pokazuje możliwość transferu elektroforetycznego z żelu agarozowego - technikę stosunkowo mało znaną. Transfer elektroforetyczny opisany został również w innych przykładach (2,3,10), gdzie stanowił dopełnienie stosowanych technik elektroforetycznych, umożliwiając jednoznaczną identyfikację białek i peptydów z zastosowaniem immunobarwienia. W prezentowanych przykładach stosowane są różnorodne techniki wizualizacji separowanych makrocząsteczek, poczynając od barwienia przy pomocy błękitu Commassie (przykłady: 1,3,4,5,6,8,11,12,13 i 16), srebra (przykłady: 7,10,14 i 15), Czerni amidowej (przykład 10), Paragon blue (przykład 12), poprzez specyficzne barwienie enzymatyczne (przykłady: 7 i 9) oraz immunoenzymatyczne (przykłady: 2,3,10 i 13). Stosowane są również techniki barwienia fluorescencyjnego (przykłady: 17,18,19 i 20), luminescencyjnego (przykład 10) oraz technika radiografii (przykład 1) stosująca znakowanie radioaktywne.

Inną klasyfikacją przykładów może być pochodzenie analizowanego materiału. Obecnie najwięcej publikacji dotyczy badań nad materiałem pochodzenia ludzkiego. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w prezentowanych przykładach. Materiał pochodzący z ludzkich komórek jest obiektem badań 9 spośród 20 przykładów (1,2,3,6,11,14,17,18 i 20), podczas gdy pozostałe przykłady dotyczą badania materiału zwierzęcego (4,5,10,12 i 13), roślinnego (7,9,19) oraz mikroorganizmów (8,15 i 16).

Techniki elektroforetyczne znajdują swoje miejsce tak w badaniach podstawowych (przykłady: 1,2,7,9 i 11), klinicznych (przykłady: 3 i 14) jak i w badaniach dla celów diagnostycznych (przykłady: 6,10,15 i 17) czy prognostycznych (przykłady: 18 i 20). Badania użytkowe również z powodzeniem stosują techniki elektroforetyczne (przykłady: 4,5,8,12,16 i 19).

Należy zwrócić uwagę na niezwykle czułość detekcji rozdzielanych makrocząsteczek - analiza białek zawartych w pojedynczym pyłku kwiatowym (przykłady: 7 i 9), oraz rozdzielczość osiąganą w technice 2D, gdzie możliwa jest jednoczesna analiza od kilku do kilku tysięcy białek i peptydów, szczególnie z wykorzystaniem wielkopłytkowego systemu **EttanDAL**T (przykład 11). Nie bez znaczenia jest stosunkowa łatwość kojarzenia poszczególnych technik elektroforetycznych w celu realizacji założonego zadania. Zwraca uwagę łączenie elektroforezy strefowej lub immunoelektroforezy z transferem elektroforetycznym (przykłady: 2,3,12 i 13) oraz immunoelektroforezy z elektroforezą strefową i późniejszym transferem elektroforetycznym (przykład 10). Należy również docenić



możliwości adaptacyjne, do szczególnych celów, komercyjnie oferowanych zestawów elektroforetycznych (przykłady: 7,8 i 9).

W zakończeniu tego krótkiego komentarza do przykładów należy wyspecyfikować zastosowany sprzęt oferowany przez firmę Amersham Biosciences. Rozdziały elektroforetyczne w elektroforezie strefowej oraz IEF prowadzone były w komorach do elektroforezy poziomej **Multiphor II** (przykłady: 1,6 i 8) lub w komorach do elektroforezy pionowej **SE25 MightySmall** (przykłady: 2,3,4,5 i 16) z wykorzystaniem zasilaczy serii **EPS3500** (przykłady: 1,3,6,7,8,9 i 10), **EPS600** (przykłady: 4,5,13 i 16) oraz **EPS300** (przykład 2). Ponadto do rozdziałów elektroforetycznych wykorzystano automatyczny system **PhastSystem** (12,13 i 14) zawierający zintegrowany zasilacz wysokonapięciowy. Do elektroforezy dwukierunkowej wykorzystywano zarówno komorę do elektroforezy poziomej **Multiphor II** (przykład 10), jak nowoczesny zestaw serii **EttanDalt** składający się z: **EttanDalt IPGphor** - do rozwijania pierwszego kierunku, oraz **EttanDalt twelve** - do drugiego kierunku (przykład 11). Transfer elektroforetyczny realizowany był z zastosowaniem zestawów do techniki w warunkach półsuchych: **NovaBlot Kit** (przykłady 2 i 3) **PhastTransfer Kit** (przykład 12) oraz **Semi-Dry** (przykłady 10 i 13). Termostatowanie rozdziału elektroforetycznego możliwe jest z zastosowaniem cyrkulatora termostatuującego serii **Multitemp** (przykłady: 6,8 i 10), a barwienie żeli może być realizowane z użyciem **GelStainer - Hoefer Processor Plus** (przykład 16). Do dokumentacji i analizy rozdziałów elektroforetycznych stosowano systemy serii **ImageMaster** (przykłady: 1,2,3,4,5,7,9,11,12 i 13) a fluorescencyjnie znakowane makrocząsteczki były wizualizowane przy pomocy skanera fluorescencyjnego serii **Typhoon** (przykład 3). Ilość białą lub kwasów nukleinowych w próbce z łatwością oznaczano przy pomocy spektrofotometru **GeneQuant Calculator** (przykłady 3 i 12), a analizę sekwencyjną DNA oraz analizę fragmentów wykonano z pomocą automatycznego sekwenatora DNA z serii **ALF Express** (przykłady: 17,18,19 i 20).

Firma Amersham Biosciences dostarcza również wszystkie materiały, akcesoria i odczynniki niezbędnych do realizacji dobrych jakościowo rozdziałów elektroforetycznych. Produkty te, podobnie jak aparatura, w tekście opracowania zaznaczone zostały wytłuszczoną czcionką, a pełną o nich informację można znaleźć w aktualnych katalogach firmy Amersham Biosciences lub na stronie internetowej [www.amershambiosciences.com](http://www.amershambiosciences.com).

## Przykład 1.

### DETEKCJA FOSFORYLACJI BIAŁEK POWIERZCHNIOWYCH BŁON KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA Z UDZIAŁEM EKTOKINAZ BIAŁKOWYCH

Pawłowska Z.

Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, e-mail: [pawlow@zdn.am.lodz.pl](mailto:pawlow@zdn.am.lodz.pl)

## Wprowadzenie

Proces fosforylacji białek jest podstawowym mechanizmem postranslacyjnej regulacji w układach biologicznych. Jest on jednym z głównych mechanizmów składających się na odpowiedź komórki na fizjologiczne czynniki regulujące jej funkcję. Ten podstawowy proces regulujący różnorodne funkcje komórkowe jest katalizowany przez enzymy – kinazy białkowe. Wykazano już istnienie kinaz białkowych (ektokinaz) na powierzchni wielu typów komórek. Wykrycie zewnątrzkomórkowej fosforylacji białek powierzchniowych komórek śródbłonna ludzkiego zapoczątkowało badania nad identyfikacją i charakterystyką białek fosforylowanych przez ektokinazy. Do opisanych tutaj badań użyto komórek śródbłonna ludzkiego izolowanych z żyły pępowinowej oraz linii nieśmiertelnionych komórek śródbłonna. Identyfikację tych białek znacznie ułatwiło zastosowanie systemu do elektroforezy poziomej **Multiphor II** z użyciem gotowych żeli gradientowych.

## Material:

- 1 Komórki śródbłonna ludzkiego izolowane z żyły pępowinowej (HUVEC).
- 2 Linia komórek śródbłonna EA.hy 926 otrzymana w darze z Uniwersytetu w North Carolina w USA.
- 3 Standardy elektroforetyczne (broad range: 200 K, 116.2, 97.4, 66.2, 42.7, 31, 21.5, 14 K).
- 4 Żele poliakryloamidowe **ExcelGel™ SDS**, gradient 8-18%.
- 5 Płytki do hodowli komórkowej firmy (Costar).
- 6 Filmy do autoradiografii X-OMAT AR (Eastman Kodak Company).
- 7 Folia spożywcza (Saran Wrap).

## Aparatura:

- 1 Inkubator płytek do hodowli komórkowej.
- 2 System do elektroforezy poziomej **Multiphor II**.
- 3 Zasilacz **EPS 3500**.
- 4 System do analizy i dokumentacji żeli **Image Master VDS ver. 2.0**

## Odczynniki:

- 1 Pożywki do hodowli komórkowej (GIBCO): RPMI, DMEM, FBS, bufor PUCK'a, HAT, płodowa surowica cielęca (FCS).
- 2 Bufor do reakcji fosforylacji KRB (Krebs-Ringer buffer; pH 7.4): 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,28 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glukoza, 25 mM HEPES i 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- 3 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP.

- 4 Bufor do próbek 6x (1,2g SDS, 1,2 ml  $\beta$ -ME, 3,6 g sacharoza, 1,25 ml 3M Tris-HCl, 4 ml EDTA 150 mM i 0,24 ml 0,5% bromophenol blue uzupełniono do 10 ml wodą destylowaną, pH 6,75).
- 5 Interferon gamma IF $\gamma$  (Sigma).
- 6 Barwnik do żeli: Commassie Brilliant Blue.
- 7 Płukacz do żeli: wodny roztwór 40% metanolu i 10% kwasu octowego.
- 8 Wodny roztwór 10% kwasu octowego.
- 9 Wodny roztwór 10% gliceryny.

### **Przygotowanie próbek do elektroforezy:**

- Przygotowanie komórek ludzkiego śródbłonka:
  - a/ komórki HUVEC (human umbilical vein endothelial cells).  
Komórki te izolować z żyły pępowinowej wg. metody Jaffe i in. (1), a następnie hodować w pożywce RPMI, w obecności 20% FCS, na 48-studzienkowych płytkach do hodowli komórkowej (Costar), w których następnie prowadzić także reakcje fosforylacji.
  - b/ Hodowla linii komórek śródbłonka ludzkiego. Unieśmiertelnione komórki śródbłonka ludzkiego hodować podobnie jak HUVEC, lecz z użyciem pożywki DMEM z dodatkiem 10% surowicy wołowej oraz HAT (hypoxanthine, aminophthalin and thymidine).
- Przed eksperymentem komórki przemyć 3-krotnie buforem KRB.
- Reakcje fosforylacji zapoczątkować przez dodanie [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP.
- Reakcje zatrzymać poprzez dodanie do studzienek buforu do próbek.
- Próbkę po reakcji fosforylacji, zebrane ze studzienek do hodowli komórkowej, natychmiast ogrzać do temperatury 95°C, inkubować w ciągu 5 min.
- Tak przygotowane próbki zastosować do rozdzielów elektroforetycznych.

### **Uwaga:**

- 1 Ze względu na stosowanie znacznika promieniotwórczego [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, doświadczenie mogą wykonywać tylko osoby przeszkolone w zakresie pracy ze źródłami promieniotwórczymi, z zachowaniem odpowiednich reguł pracy oraz odpowiednich osłon. Wszystkie czynności z próbkami zawierającymi preparat promieniotwórczy należy wykonywać w rękawiczkach ochronnych; zaleca się stosowanie okularów oraz masek ochronnych.
- 2 Przeprowadzenie reakcji fosforylacji bezpośrednio na płytkach, na których komórki były hodowane zapewniło spełnienie podstawowego warunku fosforylacji zewnętrznej - użycie do reakcji komórek nienaruszonych.

### **Przygotowanie systemu do pracy**

- Przygotować: gumowe rękawiczki, nożyczki, wodę destylowaną, 70% etanol, żele, bufony, aplikator próbek, pojemnik na odpady promieniotwórcze.
- Przed rozpoczęciem rozdzielu białek należy przemyć etanolem podstawę, na której będzie umieszczany żel, płytę szklaną oraz elektrody (bardzo delikatnie, wzdłuż elektrod).

### **Warunki rozdzielu elektroforetycznego:**

Napięcie: 600 V  
 Natężenie prądu: 50 mA

Moc: 30 W  
Czas rozdziału około 1.5 godz. Rozdział przerywano po zbliżeniu się „frontu” rozdzielanych próbek do buforu anodowego.

### **Przebieg doświadczenia:**

#### **A. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji fosforylacji:**

- Po reakcji fosforylacji białka komórek śródbłónka rozdzielić w poliakrylamidowym żelu gradientowym **ExcelGel™ SDS, 8-18%** w warunkach podanych powyżej.
- Żele i bufor umieścić w aparacie **Multiphor II** zgodnie z instrukcją producenta, objętość nanoszonej próbki: 30 µl.
- Po zakończeniu rozdzielania elektroforetycznego żele wyjąć i poddać barwieniu.
- Po odbarwieniu żele pozostawić na 2 godziny w 10% kwasie octowym, a następnie na 1 godzinę w 10% glicerynie.
- Wybarwione żele wysuszyć w temperaturze pokojowej i poddać autoradiografii

#### **Uwaga:**

3 *Podczas barwienia i odbarwiania żele delikatnie mieszać.*

#### **B. Autoradiografia:**

- Wysuszone żele elektroforetyczne pokryć folią spożywczą (Saran Wrap).
- Do detekcji ufosforylowanych białek powierzchniowych użyć filmów firmy Kodak.
- Analizę densytometryczną autoradiogramów przeprowadzić przy użyciu skanera optycznego, o rozdzielczości nie gorszej niż 300 dpi, oraz programu **Image Master VDS ver. 2.0**.

### **Postępowanie po zakończeniu doświadczenia:**

Usunąć bufor oraz aplikator do specjalnego pojemnika na odpady. Podstawę oraz płytę szklaną umyć wodą destylowaną. Przemyć elektrody wodą destylowaną, a następnie 70% etanolem.

### **Oczekiwane wyniki:**

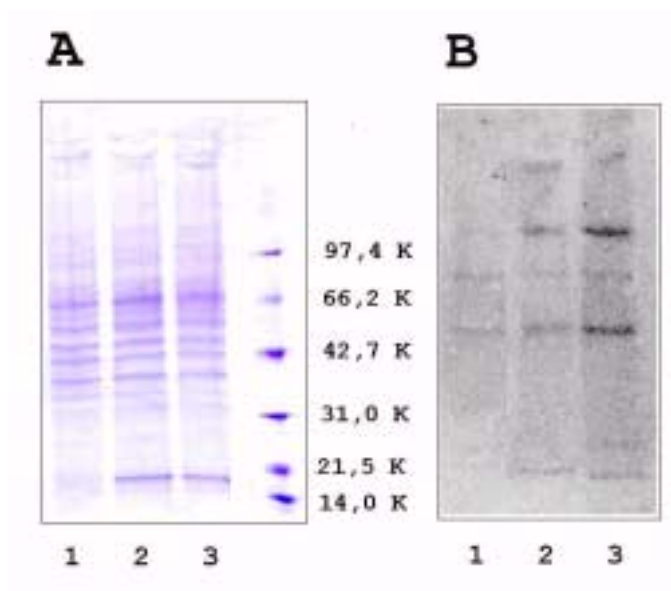
Białka komórkowe rozdzielone w żelu poliakrylamidowym 8-18% i wybarwione błękitem Coomassie przedstawione są na rys. 1.1A (HUVEC) oraz rys. 1.2A (EA.hy 926). Wyraźnie widoczne na żelu prążki o masie około 17 K odpowiadają IFN- $\gamma$ . Odpowiadające tym rozdziałom autoradiogramy przedstawiające produkty reakcji fosforylacji zewnątrzkomórkowej - ufosforylowane białka powierzchniowe komórek śródbłónka, przedstawione są na rys.1.1B (HUVEC) i rys. 1.2B (EA.hy926). Oprócz fosforylowanych białek endogennych, fosforylacji przez ektokinazę komórek śródbłónka ulega również dodany egzogennie IFN- $\gamma$  (dodatkowy pasek odpowiadający IFN- $\gamma$  widoczny na autoradiogramie).

### Rys. 1.1

Fosforylacja zewnątrzkomórkowa z udziałem ektokinazy białkowej w komórkach HUVEC.

**(A)** – rozdziel elektroforetyczny białek w żelu gradientowym 8-18%, wybarwionym błękitem Coomassie. Linia 1 odpowiada 10 min reakcji fosforylacji, linia 2 – 30 min, linia 3 – 30 min w obecności IFN- $\gamma$ .

**(B)** Autoradiogram odpowiadający żelowi z części (A).

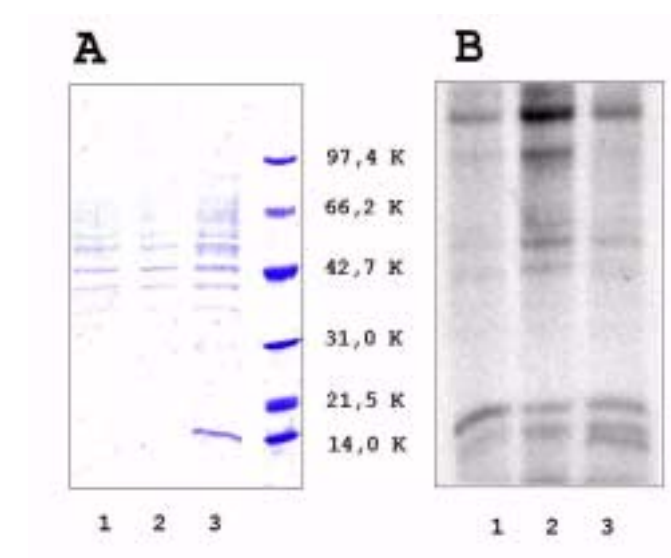


### Rys. 1.2

Fosforylacja zewnątrzkomórkowa z udziałem ektokinazy białkowej w komórkach śródbłónka EA.hy 926.

**(A)** – rozdziel elektroforetyczny białek w żelu gradientowym 8-18%, wybarwionym błękitem Coomassie. Linia 1 odpowiada 10 min reakcji fosforylacji, linia 2 – 10 min reakcji w obecności IFN- $\gamma$ , linia 3 – 30 min reakcji w obecności IFN- $\gamma$ .

**(B)** - Autoradiogram odpowiadający żelowi z części (A).



### Piśmiennictwo:

1. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. J. Clin. Invest. 52, 2745-2756 (1973).

## Przykład 2.

### FOSFORYLACJA BIAŁEK W PŁYTKACH KRWI STYMULOWANYCH KOLAGENEM

Kralisz U.

Zakład Biofizyki Medycznej i Molekularnej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, e-mail: [ulakr@yahoo.com](mailto:ulakr@yahoo.com)

#### Wprowadzenie:

Aktywacja płytek krwi przez wszystkie fizjologiczne czynniki aktywujące, w tym trombinę, kolagen, ADP, epinefrynę i  $\text{TxA}_2$ , prowadzi do wielu charakterystycznych zjawisk, takich jak zmiana kształtu płytek, uwalnianie składników z ziarnistości płytkowych do środowiska zewnątrzkomórkowego, wiązanie fibrynogenu do glikoproteiny (GP) IIb/IIIa oraz do agregacji płytek krwi (1). Zjawiska te regulowane są przez liczne procesy biochemiczne, w tym przez fosforylację reszt tyrozynowych białek płytek krwi. Fosforylacja ta odbywa się z udziałem białkowych kinaz tyrozynowych. Istnieje szereg danych wskazujących na niezmiernie istotną rolę białkowych kinaz tyrozynowych w regulowaniu funkcji płytek krwi: a) Czynniki stymulujące płytki krwi wywołują silną fosforylację wielu białek wewnątrzpłytkowych. Fosforylacja ta przebiega w kilku etapach, sugerując udział w nich różnych kinaz i/lub fosfataz. Czynniki aktywujące płytki wywołują podobną, ale nie identyczną fosforylację reszt tyrozynowych, co sugeruje, że receptory tych czynników działają przez częściowo podobne, ale nie identyczne szlaki przekazywania sygnału. b) Czynniki stymulujące płytki krwi wywołują aktywację białkowych kinaz tyrozynowych. c) Inhibitory kinaz powodują zahamowanie płytkowych funkcji (2, 3).

Aktywacja płytek przez kolagen różni się znacznie od aktywacji indukowanej przez inne czynniki. Po pierwsze, cykliczny AMP nie hamuje indukowanej kolagenem aktywacji płytek. Po drugie, aktywacja płytek kolagenem powoduje zależną od fosforylacji aktywację fosfolipazy  $\text{PLC}\gamma 2$ . Po trzecie, kolagen jest jedynym aktywatorem, którego receptory działają w sposób odzwierciedlający działanie receptorów immunologicznych na limfocytach (4,5). Poniżej przedstawiono próbę zidentyfikowania kinaz i ich substratów uwikłanych w proces aktywacji płytek krwi kolagenem.

#### Material:

- 1 Krew ludzka pobrana od zdrowych dawców, antykoagulowana ACD
- 2 Prostaglandyna  $\text{E}_1$ .
- 3 Kolagen typ I ze ścięgien końskich (Chrono-Log Inc.).
- 4 Standardy mas cząsteczkowych **Rainbow**: miozyna (200 K), albumina wołowa (69 K), ovoalbumina (46 K) anhydraza węglanowa (30 K), inhibitor tripsyny (21, 5 K), lizozym (14, 3 K).
- 5 N-etylomaleimid
- 6 PMSF (fenylometylosulfonylofluorek).
- 7 Ortowanadan sodu.
- 8 Przeciwciało monoklonalne 4G10 przeciwko fosfotyrozynie.
- 9 Przeciwciało monoklonalne przeciwko fosfoproteinie pp120.
- 10 IgG kozie, skierowane przeciwko mysim IgG, sprzężone z alkaliczną fosfatazą.
- 11 Substraty dla alkalicznej fosfatazy.

**Aparatura:**

- 1 Agregometr Labor Apact.
- 2 Aparat do elektroforezy pionowej **SE 250**
- 3 Zestaw do przygotowania żeli **SE 250 Gel Caster**.
- 4 Zasilacz **EPS 301**
- 5 Zestaw do półsuchego transferu białek **Multiphor II NovaBlot Unit**.
- 6 Program komputerowy do archiwizacji i ewaluacji żeli **ImageMaster VDS, ver. 2.0**
- 7 Skaner optyczny Mustek 1200 Pro.
- 8 Wirówka z rotorem horyzontalnym.

**Odczynniki:**

- 1 ACD - antykoagulant o składzie: 2 g glukozy, 2,5 g cytrynianu sodowego, 1,36 g kwasu cytrynowego rozpuszczone w 100 ml wody destylowanej.
- 2 Bufor A do przemywania płytek o składzie: 128 mM NaCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 7,5 mM NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 2,3 mM kwas cytrynowy, 4,8 mM cytrynian sodowy, 5,5 mM glukoza, 0,35 % albumina wołowa, pH 5,5.
- 3 Bufor B do zawieszenia płytek o składzie: 150 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glukoza pH 7,4.
- 4 Roztwór C: 40% akrylamid, 1,05% bis-akrylamid
- 5 Bufor D dla żelu separującego (4xstężony): 1,5 M Tris, 14 mM SDS, pH 8,8.
- 6 Bufor E dla żelu ogniskującego (4xstężony): 0,5 M Tris 14 mM SDS, pH 6,8.
- 7 Roztwór F: 10% nadsiarazan amonu - świeżo przygotowany.
- 8 Roztwór G 50% gliceryna.
- 9 TEMED
- 10 Bufor do lizy płytek krwi o składzie: 2% SDS, 0,062 M Tris-HCl, 0,01% błękit bromofenolowy, 10% glicerol, pH 6,8.
- 11 Bufor elektrodowy: 3 g Tris-HCl, 14,4 g glicyny, 1 g SDS rozpuszczone w 1 litrze wody destylowanej.
- 12 Bufor do transferu: 0,1 g SDS, 3 g Tris-HCl, 14, 4 g glicyny, 20% metanolu, rozpuszczone w 1000 ml wody destylowanej, pH 8,5.
- 13 Bufor TBS o składzie: 140 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7, 5.
- 14 Bufor do reakcji alkalicznej fosfatazy z jej substratami: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

**Otrzymywanie zawiesiny płytek krwi:**

- Krew pobierać na ACD w stosunku 1:9.
- Płytki krwi izolować z osocza zgodnie z uprzednio opisaną metodą (6), skrótowo przedstawioną poniżej.
- Plazmę bogatopłytkową otrzymać przez odwirowanie pełnej krwi przy 200 x g przez 20 min w 22°C.
- Do plazmy bogatopłytkowej dodać prostaglandynę E<sub>1</sub> (końcowe stężenie 1 µg/ml) oraz 0,2 M kwas cytrynowy w ilości potrzebnej do zakwaszenia plazmy do pH 5,5.
- Plazmę bogatopłytkową wirować przy 1000 x g przez 20 min w 22°C.
- Uzyskane osad płytkowy zawiesić w buforze i wirować przy 1000 x g, przez 10 min w 22°C.
- Otrzymany osad płytek przemyć dwukrotnie w buforze A.
- Przemyte płytki zawiesić w buforze B.
- Oznaczyć liczbę płytek krwi w zawiesinie przy pomocy metody fotometrycznej (7).
- Rozcieńczano zawiesinę płytek do liczby 4 x 10<sup>8</sup>/ml.

### **Agregacja płytek krwi:**

- Do kuwety pomiarowej, zawierającej mieszadelko, dodać 200  $\mu$ l zawiesiny płytkowej.
- Wyzwolić działanie agregometru ustalając kontrolę 100% i 0%.
- Dodać kolagen typ I ze ścięgien końskich w ilości 1  $\mu$ g/ml.
- Reakcję agregacji kończyć w założonym czasie: 30, 120 lub 180 sekund od momentu dodania kolagenu. W tym celu dodać do zawiesiny płytkowej buforu do rozpuszczania próbek (v:v 1:5).
- Do rozpuszczonej zawiesiny płytkowej dodać inhibitory proteaz: N-etylomaleimid oraz PMSF (po 2 mM) oraz inhibitora fosfataz: ortowanadan sodu (1 mM).
- Rozpuszczone próbki natychmiast gotować w 100°C przez 5 min i przechowywać w zamrażarce (-20°C) do momentu użycia do rozdzielów elektroforetycznych.

### **Rozdział elektroforetyczny:**

#### **Przygotowanie żelu:**

- Odłuścić szklane i termostatujące płytki 70% alkoholem i zestawić je stosując 1 mm przekładki dystansowe. Całość umieścić w zestawie do przygotowywania żeli.
- Przygotować 8% żel. W tym celu pobrać 1,5 ml odczynnika C (akrylamid - bis-akrylamid), 1,875 ml odczynnika D (running buffer), 75  $\mu$ l odczynnika F (nadsiarazan amonu), 63  $\mu$ l odczynnika G (gliceryna) i dopełnić wodą do 7,5 ml.
- Dokładnie ale delikatnie wymieszać i dodać 7,5  $\mu$ l TEMEDu, ponownie wymieszać i natychmiast wlać między przygotowane płytki kasety do elektroforezy.
- Delikatnie nanieść na powierzchnię wylanego żelu ok. 150  $\mu$ l alkoholu butylowego lub wody. Pozostawić na czas około 20 minut w celu spolimeryzowania.
- Dla przygotowania 3,5% strefy żelu ogniskującego (stacking gel) pobrać 90  $\mu$ l odczynnika C, 0,25 ml odczynnika E, 20  $\mu$ l odczynnika F, 1,15 ml wody.
- Usunąć z powierzchni spolimeryzowanego żelu uprzednio naniesiony alkohol lub wodę.
- Po dokładnym i delikatnym wymieszaniu składników żelu dodać 1  $\mu$ l TEMEDu, wymieszać i natychmiast nanieść między płytki
- Bezzwłocznie wsunąć między płytki grzebień i odczekać około 30 minut do ukończenia polimeryzacji.

#### **Uwaga:**

- 1 *Wszystkie czynności wykonywać w lateksowych rękawiczkach. Przy odważaniu akrylamidu, bis-akrylamidu i SDS stosować maskę i okulary ochronne.*
- 2 *Wykorzystany żel poliakrylamidowy traktować zawsze jako potencjalnie niebezpieczny dla ludzi. Składować wraz z innymi odpadami toksycznymi.*
- 3 *Polimeryzację żelu prowadzić w temperaturze pokojowej. W razie potrzeby przeprowadzenia polimeryzacji w niższych lub wyższych temperaturach, czas trwania polimeryzacji ulega odpowiedniej zmianie.*
- 4 *Do wszystkich buforów stosować dejonizowaną wodę z systemu Milipore Milli-Q dodatkowo odpowietrzaną.*

#### **Przygotowanie próbek:**

- Rozmrozić próbki w temperaturze pokojowej.
- Dodać do próbek  $\beta$ -merkaptotanolu do końcowego stężenia 5 % i zagotować je w 100°C przez 5 minut.
- Podobnie przygotować standardy białkowe Rainbow.



**Przygotowanie aparatu do elektroforezy:**

- Po spolimeryzowaniu żelu przenieść go wraz z płytkami do aparatu, w którym rozwijana będzie elektroforeza.
- Po umocowaniu żelu delikatnie wyjąć grzebień, a do dolnego i górnego zbiornika nalać buforu elektrodowego, tak aby zapewnić jego styk z żelem.
- Przy pomocy strzykawki z cienką igłą przemyć powstałe w żelu studzienki buforem elektrodowym.
- Nanieść próbki w odpowiednie studzienki, notując położenie próbek w protokole do elektroforezy.
- Podłączyć zestaw do zasilacza.

**Warunki elektroforezy:**

- Elektroforezę prowadzić w czasie 10-15 min przy 100 V, to jest do czasu aż białka opuszczą żel ogniskujący.
- Kontynuować rozdział w żelu separującym przy 150 V w czasie 20-25 min.
- Elektroforezę zakończyć gdy front rozdziału (barwnik) dotrze do dolnego końca żelu.

**Przygotowanie aparatu do transferu:**

- W systemie **Multiphor II** usunąć ruchome elektrody i płytę termostatuującą, a umocować dodatnią elektrodę grafitową z zestawu **NovaBlot**.
- Przyciąć 6 arkuszy bibuły filtracyjnej i arkusz nitrocelulozy o wymiarach 9x7 cm. Przycięte arkusze namoczyć w buforze do transferu.
- Nałożyć na anodę trzy namoczone arkusze bibuły, a na nie nałożyć namoczony arkusz nitrocelulozy.
- Przy pomocy plastikowego klina ostrożnie rozsunąć płytki i zdjąć z nich żel zawierający rozdzielone białka.
- Delikatnie przenieść żel na nitrocelulozę i nakryć go trzema arkuszami namoczonej bibuły.
- Przykryć i docisnąć górną (ujemną) elektrodę grafitową.

**Uwaga:**

- 5 *Zwracać baczna uwagę aby pomiędzy warstwami bibuły, nitrocelulozy i żelu nie pozostało uwiecznione powietrze. W miejscu gdzie obecne jest powietrze nie przepływa prąd i transfer nie zachodzi.*
- 6 *Wszystkie operacje z nitrocelulozą wykonywać przy użyciu pęsety.*

**Warunki transferu:**

- Transfer prowadzić przy gęstości prądu 0,5 mA na cm<sup>2</sup> (30 mA na żel) przez noc.

**Immunobarwienie:**

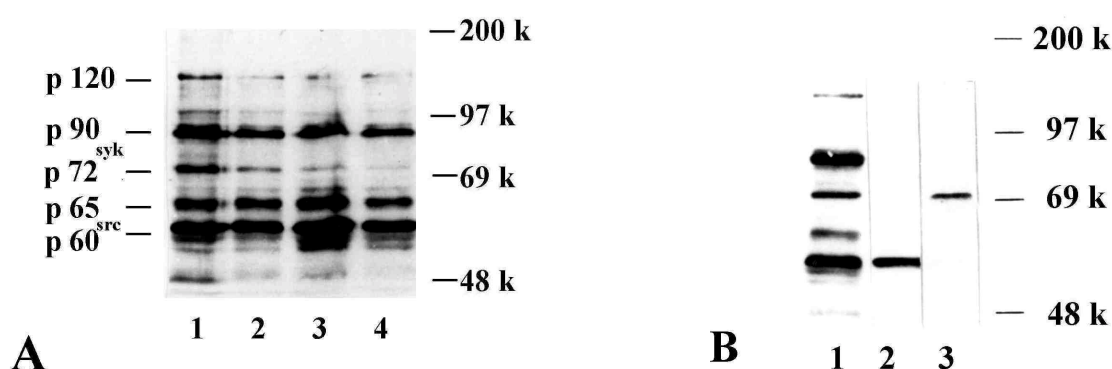
- Arkusz nitrocelulozy po transferze elektroforetycznym inkubować z 3 % odłuszczonym mlekiem rozpuszczonym w buforze TBS w czasie 1 godziny w temperaturze pokojowej.
- Następnie dodać z przeciwciało monoklonalne 4G10 do końcowego stężenia 1 µg/ml.
- Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.
- Po zakończonej inkubacji arkusze nitrocelulozy przemyć czterokrotnie buforem TBS (każde przemywanie w czasie 20 minut).
- Inkubować z drugim przeciwciałem (kozie IgG skierowane przeciwko mysim IgG) sprzężonym z alkaliczną fosfatazą. Inkubację kontynuować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.
- Czterokrotnie przemyć nitrocelulozę (przez 20 minut każde przemywanie).
- Wybarwić dodając substratów dla alkalicznej fosfatazy.

- Wysuszoną nitrocelulozę poddać skanowaniu.
- Uzyskany obraz poddać analizie przy pomocy programu **ImageMaster VDS**.
- Identyfikacji niektórych kinaz i ich substratów można dokonać stosując przeciwciała skierowane przeciwko tym kinazom i ich substratom. Przy ich uwidacznianiu postępować analogicznie jak powyżej.

### Oczekiwane wyniki:

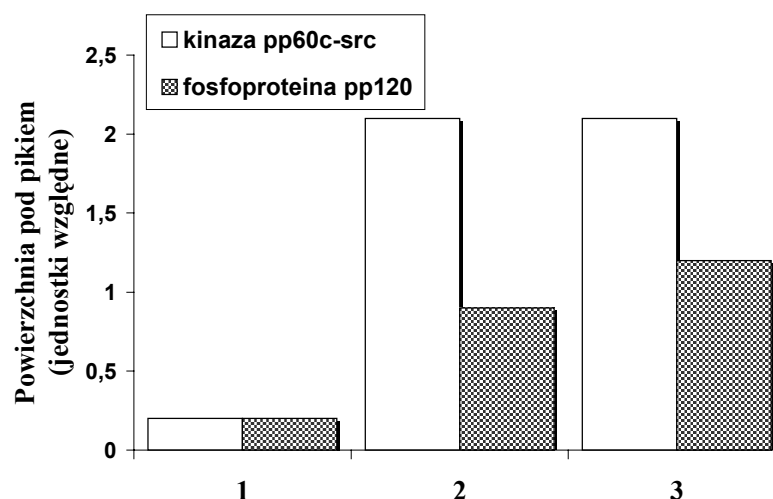
Fosforylacja białek na różnych etapach aktywacji płytek krwi wywołanej kolagenem pokazana jest na rys. 2.1A. Aktywacja płytek kolagenem wywołuje wzrost fosforylacji białek i po czasie 30 sekund, czyli po zakończeniu zmiany kształtu płytki z dyskoidalnego na kulisty, obserwuje się obecność 8 białek o masach cząsteczkowych 120, 82, 80, 67, 65, 60, 58 i 56 K, ufosforylowanych na tyrozynie. Po czasie 180 sekund, gdy występuje maksymalna agregacja, pojawiają się nowe białka o masach cząsteczkowych 90, 78, 70, 75 i 48 K z ufosforylowanymi resztami tyrozynowymi.

Identyfikacji niektórych kinaz i ich substratów dokonywano na podstawie ich mas cząsteczkowych oraz rozpoznania przez specyficzne przeciwciała. Rysunek 2.1B pokazuje identyfikację kinazy pp60<sup>c-src</sup> oraz jej substratu fosfoproteiny pp80/85. Analiza densytogramów pozwala na wykazanie zmian intensywności fosforylacji. Zmiany takie, obserwowane dla kinazy pp60<sup>c-src</sup> oraz jej substratu fosfoproteiny pp80/85 pokazane są na rys. 2.2. Fosforylacja kinazy pp60<sup>c-src</sup> jest bardzo szybka i osiąga maksimum już 30 sekund po dodaniu kolagenu do zawiesiny płytek krwi, pozostając na tym samym poziomie do czasu 180 sekund aktywacji. Fosforylacja pp80/85 jest wolniejsza, osiąga maksimum po czasie 60 sekund i nieco się zwiększa w czasie do 180 sekund.



**Rys. 2.1**

Fosforylacja białek podczas aktywacji płytek krwi kolagenem. Płytki krwi aktywowano kolagenem typ 1. Białka płytek krwi rozdzielano w 8 % żelach poliakrylamidowych i przenoszono na nitrocelulozę. A - Białka zawierające ufosforylowane reszty tyrozynowe uwidaczniano za pomocą monoklonalnych przeciwciał 4G10 skierowanych przeciwko fosfotyrozynie. Linie 1, 2, 3 odpowiadają płytkom stymulowanym przez 180, 120 i 30 sekund, linia 4 - płytki niestymulowane. Każda linia zawiera białka z  $1 \times 10^7$  płytek krwi. Markery mas cząsteczkowych pokazane są z prawej strony żelu. B - Białka błon płytek krwi aktywowanych przez 180 sekund rozdzielano w żelach poliakrylamidowych, przenoszono na nitrocelulozę i inkubowano z przeciwciałami dla fosfotyrozyny - linia 1, z przeciwciałami dla kinazy pp60<sup>c-src</sup> - linia 2 i z przeciwciałami dla fosfoproteiny pp80/85 - linia 3.



**Rys. 2.2**

Zawartość fosfotyrozyny w kinazie pp60<sup>c-src</sup> (słupki białe) oraz w fosfoproteinie pp80/85 (słupki zakreślone) analizowane za pomocą programu **ImageMaster VDS ver. 2**. 1- płytki niestymulowane, 2- płytki stymulowane przez 30 sekund, 3- płytki stymulowane przez 180 sekund.

#### **Piśmiennictwo:**

1. Clemetson K.I. Platelet activation: Signal transduction via membrane receptors. *Thromb. Haemost.* 1995; 74; 111-116.
2. Dhar A., Shukla S.D. Annotation. Tyrosine kinases in platelet signalling. *Br. J. Haematol* 1993; 84; 1-7.
3. Clark E.A. Shattil S.J., Brugge J.S. Regulation of protein tyrosine kinases in platelets. *TIBS* 1994; 19; 464-469.
4. Clemetson J.M., Polgar J., Magnenat E., Wells T.N.C., Clemetson K.J. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcγR and the natural killer receptors. *J. Biol. Chem.* 1999; 274; 29019-29024.
5. Watson S., Berlanga O., Best D., Frampton J. Update on collagen receptor interactions in platelets: Is the two-state model still valid. *Platelets* 2000; 11; 252-258.
6. Kralisz U., Cierniewski C.S. Association of pp60c-src with α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> in resting platelets. *Biochem. Mol.Biol. Int.* 1998; 45; 735-743.
7. Walkowiak B., Michalak E., Koziółkiewicz W., Cierniewski C.S. Rapid photometric method for estimation of platelet count in blood plasma or platelet suspension. *Thromb. Res.* 1989; 56; 763-766

### Przykład 3.

## OCENA POZIOMU FOSFORYLACJI BIAŁEK PŁYTEK KRWI AKTYWOWANYCH ADP U CHORYCH Z PRZEWLEKŁĄ NIEWYDOLNOŚCIĄ NEREK

<sup>1,2</sup>Walkowiak B., <sup>1</sup>Tański W., <sup>1</sup>Koziołkiewicz W.

<sup>1</sup>Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Instytutu Fizjologii i Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź,  
oraz

<sup>2</sup>Zakład Biofizyki Instytutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej, ul. Stefanowskiego 1/15, 90-924 Łódź, e-mail: [bogdan.walkowiak@csk.am.lodz.pl](mailto:bogdan.walkowiak@csk.am.lodz.pl)

### Wprowadzenie:

Przewlekłej niewydolności nerek, niezależnie od pierwotnej przyczyny wystąpienia schorzenia oraz sposobu leczenia, towarzyszy skaza krwotoczna. Przyczyn jej upatruje się w działaniu toksyn mocznicowych nagromadzonych w osoczu osób chorych. Pokazano, że płytki krwi pochodzące od osoby z przewlekłą niewydolnością nerek słabiej odpowiadają na działanie fizjologicznych agonistów, szczególnie na ADP, i wykazują znaczne upośledzenie w procesie agregacji (1). Inne doniesienia wskazują na zaburzenie w gospodarce i mobilizacji jonów wapnia oraz w ekspozycji na powierzchni płytek krwi receptora dla fibrynogenu (2,3). Przyczynę obniżonej ekspozycji receptora fibrynogenu można z kolei wiązać z obniżoną sztywnością błony płytkowej, co może wynikać z zaburzenia w pracy pomp jonowych i obniżenia potencjału spoczynkowego błony (2,3). Skrótowno przedstawiony powyżej obraz skłania do hipotezy, że przekazywanie sygnałów zarówno przez błonę do wnętrza płytki krwi jak i w jej wnętrzu jest zaburzone. Zaburzenie przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych powinno znaleźć swoje odzwierciedlenie w zmienionym obrazie fosforylacji białek płytkowych biorących udział w procesie aktywacji płytek krwi.

### Material:

- 1 Osocze bogatopłytkowe pochodzące od:
  - pacjentów dializowanych,
  - pacjentów niedializowanych
  - grupy kontrolnej.
- 2 Mysie przeciwciała monoklonalne PY-20 rozpoznające ufosforylowaną formę tyrozyny, (Santa Cruz Biotechnology).
- 3 Standardy elektroforetyczne - presteined SDS-PAGE.
- 4 Izotop jodu I<sup>125</sup> (Polatom).
- 5 **Sephadex G-25** (Amersham Pharmacia Biotech).
- 6 Albumina wołowa (Sigma).
- 7 IODO-BEADS Iodination Reagent (Pierce).
- 8 Plastikowa pipeta jednorazowa 5 ml.
- 9 Probówki eppendorffa 1,5 ml.

### Aparatura:

- 1 System do elektroforezy pionowej **SE 250**.
- 2 System do elektrotransferu techniką półsuchą **Multiphor II NovaBlot kit**.
- 3 Zasilacz **EPS-3500**.
- 4 Termoblok do ogrzewania próbek do elektroforezy Type 17600 Thermodyne Dry-Bath.
- 5 Wirówka do probówek eppendorffa MPW-300.

- 6 Spektrofotometr **GeneQuant Calculator**.
- 7 Licznik promieniowania  $\gamma$  ZM 701 (Polon).
- 8 Skaner do bez filmowej autoradiografii **Typhoon**.
- 9 Skaner optyczny Mustek 1200 PRO
- 10 Program komputerowy do analizy obrazu **ImageMaster VDS ver. 3.0**

### Odczynniki:

- 1 Odczynniki do elektroforezy - wodne roztwory:
  - A. Roztwór akrylamidu: 40% akrylamid, 1,05% bis-akrylamid
  - B. Bufor dla żelu separującego (running gel) (4xstężony): 1,5 M Tris, 14 mM SDS, pH 8,8
  - C. Bufor dla żelu ogniskującego (4xstężony): 0,5 M Tris 14 mM SDS, pH 6,8
  - D. 10% nadsiarczan amonu (świeżo przygotowany)
  - E. 50% gliceryna
  - F. TEMED
  - G. Bufor elektrodowy (10 x stężony): 0,25 M Tris 1,92 M glicyna 35 mM SDS, pH 8,3
  - H. Bufor do próbek (4 x stężony): 62,5 mM Tris, 10% gliceryna, 2% SDS, 0,0025% błękit bromofenolowy, pH 6,8
  - I. Bufor do próbek redukujący z dodatkiem 5%  $\beta$ -merkaptetanolu
  - J. Do barwienia żeli: 0,5% Coomassie Brilliant Blue R 250
  - K. Do odbarwiania żeli: 10% kwas octowy, 50% metanol
- 2 Bufor TBS o składzie: 10 mM Tris, 0,14 M NaCl, pH 7,4
- 3 Bufor do transferu: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% CH<sub>3</sub>OH pH 8,3
- 4 Odczynniki do znakowania przeciwciał:
  - L. Bufor PBS: 3,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl, pH 7,4
  - M. Bufor fosforanowy: 3,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4
  - N. Roztwór jodku potasu: 1% KI
  - O. Odtłuszczone granulowane mleko wołowe.

### Przygotowanie próbek do elektroforezy:

- Do 250  $\mu$ l osocza bogatopłytkowego dodać 50  $\mu$ l buforu do próbek i ogrzewać przez 5 minut w temperaturze 95 °C.
- Probki zamrozić (- 70 °C) i przechowywać do czasu analizy.
- Probki do analizy po rozmrożeniu wirować 10 minut (wirówka MPW-300).
- Dodać 1 ml buforu do próbek i dokładnie wymieszać. W przypadku powstania agregatu starać się go rozpuścić przez wielokrotne pipetowanie.
- Probki ponownie wirować przez 10 minut.
- Określić stężenie białka w supernatancie (**GeneQuant Calculator**)
- Pobrać taką ilość supernatantu aby po zmieszaniu z buforem do próbek stężenie białka na poziomie 4,5 mg/ml (w 100  $\mu$ l)
- Do analizy elektroforetycznej pobrać 20  $\mu$ l (90  $\mu$ g białka) i dodać dodawano 5  $\mu$ l redukującego buforu do próbek, ogrzewać 5 minut w temperaturze 95 °C.

### Przygotowanie żelu poliakrylamidowego:

- Odtłuścić szklane i termostatujące płytki 70% alkoholem i zestawić je stosując 1 mm przekładki dystansowe. Całość umieścić w zestawie do przygotowywania żeli.
- Przygotować 8% żel homogeniczny (running gel). W tym celu pobrać 1,5 ml odczynnika A (akrylamid - bis-akrylamid), 1,875 ml odczynnika B (running buffer), 75  $\mu$ l odczynnika D (nadsiarczan amonu), 63  $\mu$ l odczynnika E (gliceryna) i dopełnić wodą do 7,5 ml.

- Dokładnie ale delikatnie wymieszać i dodać 7,5  $\mu$ l TEMEDu, ponownie wymieszać i natychmiast wlać między przygotowane płytki do elektroforezy.
- Delikatnie nanieść na powierzchnię wylanego żelu ok. 150  $\mu$ l alkoholu butylowego lub wody. Pozostawić na czas około 20 minut w celu spolimeryzowania.
- W celu przygotowania 3,5% strefy żelu ogniskującego (stacking gel) pobrać 90  $\mu$ l odczynnika (A), 0,25 ml odczynnika C, 20  $\mu$ l odczynnika D, 1,15 ml wody.
- Usunąć z powierzchni spolimeryzowanego żelu uprzednio naniesiony alkohol lub wodę.
- Po dokładnym i delikatnym wymieszaniu składników żelu dodać 1  $\mu$ l TEMEDu, wymieszać i natychmiast nanieść między płytki
- Bezzwłocznie wsunąć między płytki grzebień i odczekać około 30 minut do ukończenia polimeryzacji.

#### **Uwaga:**

- 1 *Wszystkie czynności wykonywać w lateksowych rękawiczkach. Przy odważaniu akrylamidu, bis-akrylamidu i SDS stosować maskę i okulary ochronne.*
- 2 *Wykorzystany żel poliakrylamidowy traktować zawsze jako potencjalnie niebezpieczny dla ludzi. Składować wraz z innymi odpadami toksycznymi.*
- 3 *Polimeryzację żeluprowadzić w temperaturze pokojowej. W razie potrzeby przeprowadzenia polimeryzacji w niższych lub wyższych temperaturach, czas trwania polimeryzacji ulega odpowiedniej zmianie.*
- 4 *Do wszystkich buforów stosowano dejonizowaną wodę z systemu Milipore Milli-Q dodatkowo odpowietrzaną.*

#### **Przygotowanie aparatu do elektroforezy:**

- Szklane i termostatujące płytki, przekładki dystansowe i grzebień dokładnie umyć w letniej wodzie z dodatkiem łagodnego detergentu, dokładnie opłukać wodą demineralizowaną.
- Przed zestawieniem płytek odtłuścić je 70% alkoholem.
- Między płytki wsunąć przekładki i całość umocować w zestawie do przygotowywania żeli.
- Po spolimeryzowaniu żelu przenieść go wraz z płytkami do aparatu, w którym rozwijana będzie elektroforeza.
- Po umocowaniu żelu delikatnie wyjąć grzebień, a do dolnego i górnego zbiornika nalać buforu elektrodowego, tak aby zapewnić jego styk z żelem.
- Przy pomocy strzykawki z cienką igłą przemyć powstałe w żelu studzienki buforem elektrodowym.
- Nanieść próbki w odpowiednie studzienki, notując położenie próbek w protokole do elektroforezy.
- Podłączyć zestaw do zasilacza.

#### **Warunki elektroforezy:**

- Elektroforezę prowadzić przy 80 mA prądu dla dwóch żeli, lub 40 mA dla pojedynczych żeli, przy limicie napięcia 250 V i mocy 7 W w temperaturze pokojowej.
- Czas trwania rozdziału nie powinien przekroczyć 2 godzin.
- Elektroforezę zakończyć gdy front rozdziału (barwnik) dotrze do anodowego końca żelu.

#### **Przygotowanie aparatu do transferu:**

- W systemie **Multiphor II** usunąć ruchome elektrody i płytę termostatującą, a umocować dodatnią elektrodę grafitową z zestawu **NovaBlot**.

- Przyciąć 6 arkuszy bibuły filtracyjnej i arkusz nitrocelulozy o wymiarach 9x7 cm. Przycięte arkusze namoczyć w buforze do transferu.
- Nałożyć na anodę trzy namoczone arkusze bibuły, a na nie nałożyć namoczony arkusz nitrocelulozy.
- Przy pomocy plastikowego klina ostrożnie rozsunąć płytki i zdjąć z nich żel zawierający rozdzielone białka.
- Delikatnie przenieść żel na nitrocelulozę i nakryć go trzema arkuszami namoczonej bibuły.
- Przykryć i docisnąć górna (ujemna) elektrodę grafitowa.

**Uwaga:**

- 5 *Zwracać baczność uwagę aby pomiędzy warstwami bibuły, nitrocelulozy i żelu nie pozostało uwiecznione powietrze. W miejscu gdzie obecne jest powietrze nie przepływa prąd i transfer nie zachodzi.*
- 6 *Wszystkie operacje z nitrocelulozą wykonywać przy użyciu pęsety.*

**Warunki transferu:**

- Transfer prowadzić przy gęstości prądu 1 mA na cm<sup>2</sup> żelu w czasie 1 godziny.

**Immunobarwienie nitrocelulozy:**

- Po zakończeniu elektrotransferu nitrocelulozę inkubować w czasie 3-6 godzin w buforze TBS z dodatkiem 0,5% odtłuszczonego mleka. Inkubację prowadzić w temperaturze 4°C delikatnie mieszając.
- Do naczynia z dodać radioznakowane przeciwciało monoklonalne anty fosfotyrozyna - <sup>125</sup>I-MAb PY-20 (5x10<sup>5</sup> cpm/ml) i inkubować w temp. 4°C w czasie 6-8 godzin.
- Po zakończonej inkubacji płyn inkubacyjny zlać do szczelnego zbiornika i przechowywać w magazynie izotopów.
- Nitrocelulozę przemywać 5 razy po 15 minut w buforze TBS z dodatkiem mleka i 0,5% Tritonu X-100. Następnie przemywać dwa razy w buforze TBS z dodatkiem mleka. W trakcie odmywania delikatnie mieszać.
- Arkusz nitrocelulozy wysuszyć i owinać cienką folią plastikową, a następnie poddać go autoradiografii.

**Uwaga:**

- 7 *Wszystkie czynności z radioznakowanymi białkami mogą być prowadzone tylko w pracowni izotopowej źródeł otwartych posiadającej aktualny atest.*
- 8 *Wszystkie płyny mające kontakt z nitrocelulozą traktowaną radioznakowanym przeciwciałem i samą nitrocelulozę traktować jako źródło promieniowania i przechowywać zawsze w magazynie izotopów lub odpadów promieniotwórczych.*
- 9 *Płyn inkubacyjny zawierający radioznakowane przeciwciało może być użyty ponownie w ciągu jednego tygodnia. Aby jednak wykluczyć procesy degradacji białek należy dodać substancji bakteriostatycznej (azydek sodu w końcowym stężeniu 0,01%).*

**Autoradiografia:**

- Przygotowany arkusz nitrocelulozy umieścić w kasie do autoradiografii.
- A. W przypadku autoradiografii klasycznej z zastosowaniem filmu rentgenowskiego (X ray film) położyć film na nitrocelulozę a następnie położyć ekran zwiększający intensywność ekspozycji (intensifying screen) i zamknąć kasę. Ekspozycję prowadzić najlepiej w temperaturze -70°C, co pozwala na uzyskanie ostrzejszego obrazu, przez okres jednego tygodnia.

- Po zakończeniu ekspozycji doprowadzić kasę do temperatury pokojowej, wyjąć film i wywołać go w automacie do filmów X lub ręcznie z zastosowaniem klasycznych odczynników fotograficznych. Film wysuszyć i zachować do dalszej analizy.

**Uwaga:**

*10 Wszystkie czynności przeprowadzić w ciemni fotograficznej.*

- B. W przypadku autoradiografii bez filmowej oczyścić ekran aby usunąć pozostałości poprzednich ekspozycji a następnie położyć go na nitrocelulozę i poddać ekspozycji.
- Czas trwania ekspozycji jest silnie uzależniony od intensywności promieniowania związanego z nitrocelulozą. Zwykle dla immunobarwienia wystarczają 2-3 doby.
  - Całość kasę wraz z nitrocelulozą i ekranem przechowywać do czasu wywołania obrazu przy pomocy skanera fosforescencji.

**Uwaga:**

*11 W przypadku autoradiografii bez filmowej wszystkie czynności mogą być przeprowadzone w świetle widzialnym.*

**Barwienie żeli:**

- Żele po transferze elektroforetycznym oraz żele przewidziane do wizualizacji barwnej barwić przy pomocy barwnika Coomassie Brilliant Blue. Celem barwienia żeli po transferze jest z ocena wydajności transferu.
- Żel przenieść do kuwety z barwnikiem (odczynnik J) i pozostawić na 10-12 godzin w temperaturze pokojowej.
- Przenieść żel do kuwety z odbarwiaczem (odczynnik K) i kilkakrotnie zmieniać odbarwiacz. Odbarwianie zakończyć po uzyskaniu wyraźnego obrazu prążków zawierających białka, zwykle po 4-5 godzinach.
- Żele przechowywać w odbarwiaczu do czasu przeniesienia obrazu do formatu elektronicznego lub wykonania fotografii.

**Skanowanie żeli i nośników obrazu autoradiografii:**

- Wybarwione żele oraz wywołane filmy rentgenowskie skanować przy pomocy skanera optycznego o rozdzielczości nie mniejszej niż 300 dpi (Mustek 1200 PRO)
- Obraz utrwalony na ekranie do autoradiografii bez filmowej wywołać przy pomocy skanera fosforescencji (**Typhoon**).

**Uwaga:**

*12 Obraz uzyskany przy pomocy autoradiografii bez filmowej pozwala na analizę w pełni ilościową. Skaner fosforescencji odczytuje zmianę zaczernienia w przedziale 5 rzędów wielkości, podczas gdy czułość filmu rentgenowskiego nieznacznie przekracza przedział 2 rzędów wielkości.*

**Analiza obrazów żeli i nitrocelulozy:**

- Uzyskane obrazy żeli i nitrocelulozy poddać densytometrii i analizie przy zastosowaniu programu **ImageMaster VDS ver. 3.0**.
- Uzyskane densytogramy i wynikające z nich liczbowe wartości zaczernień korespondujących z ilością białka na żelach barwionych, oraz intensywnością fosforylacji białek na tyrozynie uwidocznioną na nitrocelulozie, poddać analizie statystycznej.



### **Radioznakowanie przeciwciała monoklonalnego PY-20:**

- Namoczyć w wodzie 7 ml złoża Sephadex G-25. Pozwolić złożu pęcznieć przez 6 godzin.
- Przygotować 20 ml buforu PBS (odczynnik L) z dodatkiem 1% albuminy wołowej (BSA).
- Przygotować kolumnę (5 ml pipeta) poprzez umieszczenie w jej wylocie kawałka tkaniny nylonowej (skrawek pończochy).
- Zawiesić napęczniałe złożo w 10 ml buforu PBS-BSA i przenieść do przygotowanej kolumny.
- Pozwolić złożu na swobodną sedimentację ale nie dopuścić do zapowietrzenia kolumny.
- Przepuścić przez kolumnę pozostałe 10 ml buforu PBS-BSA.
- Odmyć nadmiar albuminy przepuszczając przez kolumnę około 50 ml buforu PBS.
- Do 1,5 ml próbówki eppendorfa podać 10 µl przeciwciała PY-20 (200 µg/ml), dodać 100 µl buforu fosforanowego (odczynnik M), 2 kuleczki IODO-BEADS, 10 MBq jodu  $^{125}\text{I}$ , zamieszać i inkubować 2 min. w temperaturze pokojowej
- Dodać 100 µl 1% roztworu KI (odczynnik N), zamieszać i odczekać 1 min.
- Nawarstwić delikatnie na złożo w przygotowanej kolumnie.
- Zbierać 0,5 ml frakcje wymywane buforem PBS.
- Oznaczyć radioaktywność w zebranych frakcjach. Znakowane białko powinno znajdować się we frakcjach 5-8, a niezwiązany z białkiem jod we frakcjach powyżej 13.

### **Uwaga:**

- 13 *Wszystkie czynności związane z radioznakowaniem białka muszą być przeprowadzone w pracowni izotopowej źródeł otwartych klasy co najmniej III. Pracować tylko pod sprawnym wyciągiem, a dla ochrony odziać fartuch laboratoryjny oraz rękawiczki lateksowe.*
- 14 *Po zakończonej pracy zawsze sprawdzić przy pomocy dozymetru stan stanowiska pracy ze względu na skażenie powierzchniowe. Sprawdzić czy kontaminacji nie uległy dłonie oraz czy tarczyca nie nagromadziła izotopu promieniotwórczego. W razie kontaminacji stanowiska pracy i/lub rąk należy postępować zgodnie z regulaminem pracowni w celu usunięcia kontaminacji. Przy stwierdzeniu kumulacji radioizotopu w tarczycy natychmiast poddać się kontroli lekarskiej.*

### **Oczekiwane wyniki:**

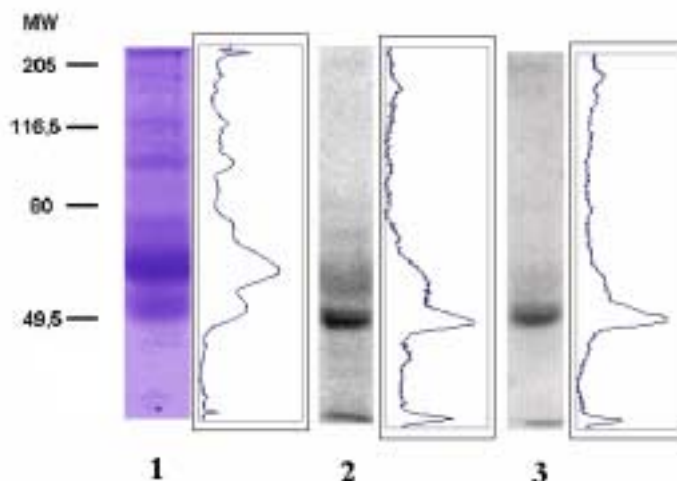
Na rysunku 3.1 przedstawiona jest przykładowa analiza prążków białek rozdzielonych w 8% żelu i barwionych barwnikiem Coomassie Brilliant Blue (ścieżka 1) a następnie densytometrowanych przy pomocy skanera optycznego. Obok pokazano wynik detekcji białek ufosforylowanych na tyrozynie przed aktywacją ADP (ścieżka 2) i po zakończeniu aktywacji i agregacji płytek krwi (ścieżka 3). Dobrze uwidocznionych jest pięć prążków. Pierwszy z prążków należy do białek o wysokiej masie cząsteczkowej, które nie opuściły żelu ogniskującego. Ostatni należy do białek i peptydów o bardzo niskiej masie cząsteczkowej, poruszających się w bezpośredniej bliskości frontu elektroforezy. Pozostałe ufosforylowane białka zgrupowane są w trzech głównych grupach o masach odpowiednio: 50 k, 55 k i 68 k.

**Rys. 3.1**

Przykład uzyskanych rozdzielów elektroforetycznych białek płytkowych i detekcji białek ufosforylowanych na tyrozynie.

Ścieżki:

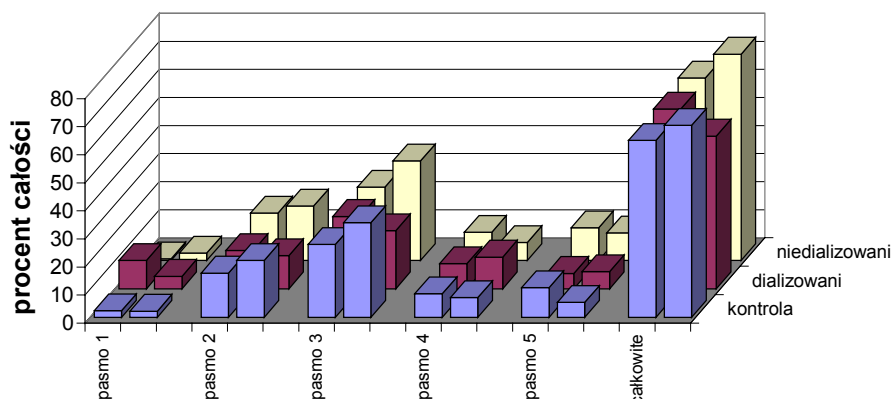
- 1- barwione białka płytkowe,
- 2-fosforylacja przed aktywacją,
- 3-fosforylowane w zagregowanych płytkach krwi.



Na rysunku 3.2 przedstawiono zbiorcze wyniki dotyczące poziomu fosforylacji białek płytkowych przed i po aktywacji ADP. W grupie kontrolnej w wyniku aktywacji ADP poziom fosforylacji białek pasma 2 i 3 wzrasta, a pasma 4 i 5 maleje. Białka pasma 1 nie zmieniają swojego niskiego poziomu fosforylacji. Bardzo podobnie zachowują się ufosforylowane białka płytek krwi osób chorych niedializowanych. Jedyną różnicę stanowi wzrost ilości ufosforylowanych białek o wysokiej masie cząsteczkowej (pasmo 1) nie mogących opuścić strefy żelu ogniskującego. W przypadku chorych poddawanych hemodializie obraz poziomu fosforylacji białek jest odwrotny w stosunku do kontroli i osób niedializowanych. Poziom fosforylacji białek pasma 2 i 3 nieznacznie obniża się w wyniku aktywacji ADP, a białek pasma 4 i 5 nieco wzrasta. Uwagę zwraca również wysoki poziom fosforylacji białek o wysokich masach cząsteczkowych (pasmo 1) w nieaktywowanych płytkach i obniżenie tego poziomu w wyniku aktywacji ADP. Również sumaryczny poziom fosforylacji białek w grupie osób dializowanych przedstawia odmienny charakter w stosunku do kontroli i grupy osób niedializowanych.

**Rys. 3.2**

Graficzna prezentacja zestawienia wyników dotyczących poziomu fosforylacji białek w nieaktywowanych płytkach krwi oraz w płytkach poddanych aktywacji ADP.



Uzyskane wyniki sugerują, że:

- 1 mechanizmy zaburzenia procesu agregacji płytek krwi w grupie osób dializowanych i niedializowanych są odmienne,
- 2 proces dializy, pomimo normalizacji większości parametrów biochemicznych i hematologicznych, indukuje znaczące zmiany w płytkach krwi mające swój obraz w jakościowej i ilościowej zmianie poziomu fosforylacji białek w płytkach niaktywowanych ADP, jak i po ich aktywacji,
- 3 poziom fosforylacji białek w płytkach niezaaktywowanych i kierunek zmian poziomu fosforylacji tych białek w wyniku aktywacji ADP nie odbiegają znacząco od stanu zarejestrowanego dla płytek kontrolnych,
- 4 poprzedni wniosek wskazuje na indukowanie znacznie silniejszych zmian w płytkach poddanych kontaktowi z dializatorem niż w płytkach podlegających wpływowi toksyn mocznicowych.

*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 4. P05A. 115. 14.*

#### **Piśmiennictwo:**

1. Deykin D. Uremic bleeding. *Kidney Int.* 1983; 24; 689-705.
2. Walkowiak B., Pawłowska Z., Michalak E., Cierniewski CS. Expression of fibrinogen receptor on platelets of uremic patients is correlated with the content of GPIIb and plasma level of creatinine. *Thromb. Haemostas.* 1994; 71; 161-168.
3. Walkowiak B., Borkowska E., Koziolkiewicz W., Michalec L., Sobol A., Cierniewski CS. Platelet membrane fluidity and intraplatelet  $Ca^{2+}$  mobilization are affected in uraemia. *Eur. J. Haematol.* 1997; 58; 350-356.

#### Przykład 4.

### ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK MIĘSA PRZY UŻYCIU SDS-PAGE Z DODATKIEM 8M MOCZNIKA

<sup>1</sup>Greaser M.L., <sup>2</sup>Pospiech E., <sup>1</sup>Fritz J., <sup>1</sup>Swartz D.R., <sup>2</sup>Grześ B.

<sup>1</sup>Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin-Madison, USA

<sup>2</sup>Instytut Technologii Mięsa Akademii Rolniczej w Poznaniu, e-mail: [pospiech@au.poznan.pl](mailto:pospiech@au.poznan.pl)

#### Wprowadzenie:

Rozdział białek na żelu poliakrylamidowym przy zastosowaniu SDS jako detergentu rozpuszczającego próbę i umożliwiającego separację białek na podstawie ich mas cząsteczkowych jest jedną z najczęstszych i najprostszych technik elektroforetycznych. Dodatek mocznika w stężeniu 8M pozwala na uzyskanie nieco innych rozdziałów białek niż w przypadku klasycznej PAGE. Dodatek mocznika powoduje złamanie podstawowej zasady rozdziału SDS-PAGE, tj. separacji białek tylko w oparciu o różnicę mas cząsteczkowych. W określonych sytuacjach technika z zastosowaniem mocznika pozwala na dokładną analizę produktów degradacji białek, a to z uwagi na częściową poprawę rozdzielczości takich rozdziałów. Poniżej prezentujemy zastosowanie techniki SDS-PAGE w odniesieniu do analizy białek komórek mięśniowych.

#### Materialy:

- 1 Próbki z mięśnia – przemycie miofibryle, wyciek wirówkowy i osady powstałe po odwirowaniu wycieku swobodnego z mięsa składowanego w chłodni.
- 2 Celofan lub folia Mylar.

#### Aparatura:

- 1 Aparat do rozdziału elektroforetycznego: **SE 250 Mighty Small II**.
- 2 Zestaw do przygotowywania żeli: **SE 275 Mighty Small 4-Gel Caster**.
- 3 Zasilacz prądu stałego **EPS 600**.
- 4 Zestaw do archiwizacji żeli **ImageMaster VDS**.
- 5 Zestaw do suszenia żeli.

#### Odczynniki:

- 1 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine)
- 2 Roztwór akrylamidu dla żelu rozdzielającego: 30% T – 0,15% C.
- 3 Roztwór akrylamidu do żelu zagęszczającego - 10% T, 15% C.
- 4 3M Tris, pH 8,8
- 5 0,125 M Tris, pH 6,8
- 6 10% SDS
- 7 Bufor do elektroforezy stężony (5x) – 0,25 M Tris (Trizma base) – 1,92 M glycine – 0,5% SDS.
- 8 Nadsiarazan amonu 10%. Przechowywać w zamrażarce w -20°C w fiolkach na 0,5 ml.
- 9 Bufor próbek “A” - 8 M mocznika, 2 M tiomocznika, 0,025M Tris-HCl, pH 6,8, 3% SDS, 75 mM DTT i 0,05% błękitu bromofenolowego.

- 10 Bufor próbek "B" - 0,05 M Tris (pH 6,8) - 75 mM DTT - 3% SDS - 10% glicerolu - 0.1% błękitu bromofenolowego.
- 11 75% gliceryna (dla żelu rozdzielającego) i 50% gliceryna (dla żelu zagęszczającego).
- 12 Roztwór utrwalający i barwiący – wodny roztwór 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% kwas octowy lodowaty.
- 13 Roztwór odbarwiający – wodny roztwór 10% metanolu, 7,5% kwasu octowego
- 14 Roztwór błękitu bromofenolowego dla żelu zagęszczającego – 0,1% błękit bromofenolowy, 30% gliceryna, 1% SDS.
- 15 Adsorbent jonowy bead resin (Fisher Rexyn 300)

#### **Przygotowanie roztworów akrylamidu:**

##### **A. dla żelu rozdzielającego:**

- Zważyć 29,85 g akrylamidu i 0,15 g bis - akrylamidu.
- Do zlewki dodać około 50 ml wody, mieszać aż do rozpuszczenia, dopełnić do 100 ml.
- Filtrować przez 0,45µ filtr (Millex - HA, Millipore Corporation).
- Przechowywać w temperaturze 4°C chroniąc od światła.

##### **B. dla żelu zagęszczającego:**

- Zważyć 4,25 g akrylamidu i 0,75 g DATD (N,N' - diallyltartardiamide).
- Do zlewki, dodać 25 ml wody, mieszać do rozpuszczenia, dopełnić do 50 ml.
- Filtrować i przechowywać jak powyżej.

#### **Uwaga:**

1 *Niebezpieczne odczynniki! Unikać kontaktu ze skórą.*

#### **Przygotowanie buforu A:**

- Odważyć 48 g mocznika (cz.d.a.) i 15,2 g tiomocznika.
- Do czystej 150 ml zlewki dodać 40 ml wody i umieścić w niej mieszadło magnetyczne.
- Dodać odważone odczynniki. Powoli podgrzewając mieszać aż wszystkie odczynniki się rozpuszczą. Postępować ostrożnie, unikać temperatur powyżej 40°C - podgrzewanie mocznika przyspiesza tworzenie się cyjanianów.

#### **Uwaga:**

2 *Nie dodawać zbyt dużo wody, gdyż mocznik i tiomocznik zajmują ponad połowę objętości.*

3 *Należy unikać zanieczyszczenia buforu A białkami z rąk i dlatego należy używać rękawiczek.*

- Dodać 10 g adsorbentu jonowego (Fisher Rexyn 300) i mieszać całość przez 15 min.
- Przefiltrować całość przez bibułę filtracyjną do 100 ml cylindra miarowego. Objętość powinna wynosić ok. 80 - 90 ml. Ostrożnie przemyć adsorbent dwukrotnie 5 ml wody dejonizowanej.
- Przenieść przefiltrowany roztwór podstawowy do czystego pojemnika (zlewki) na 150ml.
- Odważyć 0,303 g Trizma base i 3 g SDS.
- Dodać je do powyższego roztworu i mieszać aż do rozpuszczenia. Doprowadzić pH do 7,5 dodając 12 M HCl w porcjach po 100 µl powoli.
- Dodać 1,155 g stałego DTT i wymieszać do rozpuszczenia.
- Doprowadzić pH do 6,8 używając 20 µl porcji 2 M HCl. Jeśli jednak nastąpi spadek pH poniżej 6.8 należy doprowadzić pH do wymaganego poziomu za pomocą 2 M Tris base.
- Dodać 2 - 4 mg błękitu bromofenolowego i wymieszać go do rozpuszczenia.
- Przenieść roztwór do 100 ml kolbki i dodać wody do 100 ml. Filtrować przez filtr 0,45 µm.
- Bufor A przechowywać w 1 porcjach w temperaturze -75°C.
- Rozmrażać bezpośrednio przed użyciem.

### **Przygotowanie próbek:**

- 3 mg próbki (najczęściej przemyte miofibryle) rozpuścić w 100  $\mu$ l buforu do próbek próby "A"
- Próbkę wymieszać przy użyciu wortexu.
- Ogrzewać w 100°C przez 3 minuty. Można też stosować łagodniejsze ogrzewanie w 50°C przez 20 minut (zalecane przy wyciekach).
- Próbkę odwirować się przy 10 000 x g w czasie 15 sekund, celem usunięcia niezhydrolizowanych fragmentów komórek.

### **Przygotowanie systemu do pracy:**

#### **A. Przygotowanie żelu rozdzielającego:**

- Szklane i metalowe płytki oraz przekładki dystansowe dokładnie umyć w wodzie z dodatkiem detergentu, a następnie przepłukać wodą destylowaną.
- Bezpośrednio przed zastosowaniem płytki przetrzeć delikatnie ściereczką alkoholem etylowym.
- Zestawić cztery kasety stosując przekładki dystansowe o grubości 0,75 mm umieścić je w zestawie do przygotowywania żeli. Kasety umieścić w zestawie do przygotowywania żeli **SE 275 Mighty Small 4-Gel Caster**, rozdzielając je plastikowymi przekładkami.
- Do zlewki dodać: 8,654 g mocznika, 12,0 ml 30% roztworu akrylamidu dla żelu rozdzielającego, 3,2 ml 75% roztworu gliceryny, 6,0 ml 3 M Tris, pH 8.8, 0,20 ml 10% SDS.
- Całość ostrożnie ogrzewać (można w kuchence mikrofalowej) i mieszać do aż do rozpuszczenia mocznika.
- Roztwór ochłodzić (najlepiej na lodzie) i dodać: 0,10 ml 100 mg/ml nadsiarczuanu amonu i 0,016 ml TEMED-u.
- Intensywnie wymieszać i szybko przelać do uprzednio przygotowanego zestawu z kasetami.
- Do każdej kasety na wierzch swobodnego żelu nalać po 160  $\mu$ l izobutanolu.
- Żel pozostawić do spolimeryzowania w temperaturze pokojowej.
- Po zakończonej polimeryzacji usunąć izobutanol delikatnie przepłukać wodą destylowaną. Żele nadają się do natychmiastowego użycia. Można jednak wykorzystać je później przechowując w szczelnie zamykanym w woreczku foliowym w temp. 4°C.

#### **B. Przygotowanie żelu zagęszczającego:**

- Kasetę (kasety) z żelem rozdzielającym umieścić w aparacie **SE 250 Mighty Small II**.
- Przygotować grzebień o odpowiedniej ilości zębów.
- Do zlewki kolejno dodać: 0,750 ml 10% roztworu akrylamidu dla żelu zagęszczającego, 0,625 ml 0,125 M Tris, (pH 6.8), 0,507 ml wody destylowanej, 0,5 ml 5% roztworu gliceryny, 0,025 ml 10% roztworu SDS, 0,015 ml roztworu bromofenolu dla barwienia żelu zagęszczającego.
- Całość wymieszać i dodać: 0,015 ml 100 mg/ml nadsiarczuanu amonu, 0,012 ml TEMED.
- Zawartość zlewki wymieszać i natychmiast przelać do kasety nad żel rozdzielający (wystarczy wypełnić kasetę do około 2 mm poniżej górnej krawędzi płytki metalowej).
- Umieścić w kasiecie grzebień, zwracając uwagę aby usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza, które mogłyby się znaleźć w żelu.
- Pozostawić żel do polimeryzacji, która powinna nastąpić w czasie 15 - 20 minut.

### Elektroforeza:

- Bufor do elektroforezy rozcieńczyć 5 krotnie wodą destylowaną.
- Do buforu dodać  $\beta$ -merkaptoetanol w ilości 97,66 $\mu$ l na 250 buforu. Całość wymieszać.
- Nalać bufor do pojemnika za żelem i zasobników elektrodowych, dolnego i górnego. W przypadku użycia tylko jednego żelu drugą stronę aparatu uszczelnić płytką szklaną.
- Wyjąć grzebień i przepłukać buforem powstałe zagłębienia żelu (studzienki).
- Nanieść próbki w zagłębienia żelu górnego używając mikrostrzykawki lub automatycznej pipety zaopatrzonej w odpowiednie końcówki o bardzo wąskim zakończeniu.
- Po naniesieniu próbek nałożyć osłonę aparatu i podłączyć zestaw do zasilacza **EPS 600**.
- Ustalić wartość natężenia na 20 mA na jeden żel i rozpocząć rozdział elektroforetyczny.
- Separację zakończyć, gdy czoło rozdziału osiągnie położenie około 2 mm od dolnej krawędzi żelu.
- Rozłączyć aparat. Wyjąć kasetę i za pomocą szpatułki (najlepiej plastikowej) zdjąć płytkę szklaną.
- Za pomocą szpatułki oddzielić od całości warstwę żelu zagęszczającego i wyrzucić ją do odpadów.
- Żel przepłukać małą ilością wody destylowanej i szybko przenieść z płytki metalowej do zasobnika zawierającego roztwór utrwalacza i barwnika.
- Barwić przez okres 1 godziny w temperaturze pokojowej.
- Po upływie tego czasu żel odbarwiać przy pomocy roztworu odbarwiającego.

### Postępowanie po zakończeniu elektroforezy

- Płytki szklane i aluminiowe oraz płytki dystansowe umyć w wodzie z dodatkiem detergentu, a następnie przepłukać wodą destylowaną.
- Wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza.
- Celem zachowania elastyczności żelu zanurzyć go na chwilę w glicerynie.
- Żel umieścić między dwoma uprzednio namoczonymi arkuszami celofanu lub folii Mylar. Umieścić na płytce i docisnąć ramkę zestawu do suszenia żeli. Suszyć w strumieniu ciepłego powietrza.
- Żele mokre (bezpośrednio po odbarwieniu) lub żele wysuszone poddać archiwizacji i ewaluacji przy pomocy systemu **ImageMaster<sup>®</sup> VDS**.

### Uwagi:

- 4 Przy odważaniu akrylamidu zawsze stosować okulary, maskę ochronną i rękawiczki lateksowe.
- 5 Żel poliakrylamidowy stanowi zawsze potencjalne niebezpieczeństwo dla ludzi. W związku z tym wszelkie jego odpady należy składować wraz z innymi odpadami toksycznymi.
- 6 Stężenie białka w próbce powinno zawierać się w przedziale 2 do 8mg/ml.
- 7 Unikać ogrzewania prób przy wykorzystaniu buforu próby „A” w czasie dłuższym niż 5 minut w 100°C, gdyż mocznik tworzy cyjaniany, które reagują z białkami i zmieniają szybkość ich migracji w żelu.
- 8 Zastosowanie  $\beta$ -merkaptoetanolu w buforze elektrodowym poprawia rozpuszczanie białek i rozdział ich podczas elektroforezy ale jednocześnie redukuje mostki dwusiarczkowe.
- 9 Optymalny czas polimeryzacji wynosi 10 do 20 minut. Jeśli żel polimeryzuje szybciej należy zmniejszyć ilość nadsiarczanu amonu, jeśli dłużej - postąpić odwrotnie.
- 10 W przypadku używania mikrostrzykawki do nanoszenia prób należy pamiętać o przepłukiwaniu jej po każdej nałożonej próbce.

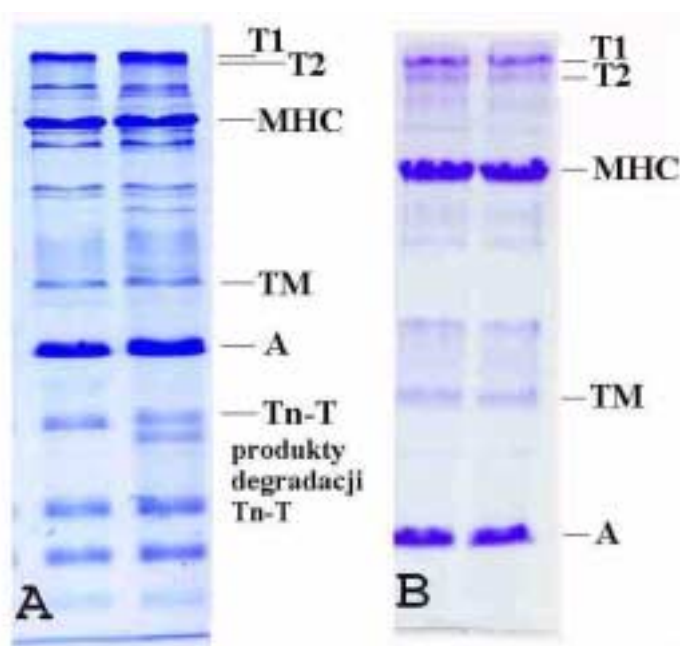
### Oczekiwane wyniki:

Obecność w żelu SDS-PAGE mocznika (8 M) powoduje, że tropomiozyna (TM) mająca niższą masę cząsteczkową od aktyny (33 K v.s. 42 K) migruje w żelu wolniej niż aktyna (znajduje się powyżej aktyny). Poniżej aktyny obserwuje się troponinę T (Tn-T) o masie 37 K, produkty jej rozpadu (28 – 30 K) i znacznie poniżej nich białka o mniejszej masie cząsteczkowej. Proces kruszenia mięsa wiąże się z degradacją troponiny T. Zastosowanie opisanych warunków rozdzielania pozwala na bardzo łatwą obserwację procesu degradacji tego białka. Pomimo wysokiego stężenia akrylamidu (15%) możliwy jest w tych warunkach rozdział białek z zakresu od 15 kDa do 4000 K (rys.4.1A). Zmniejszając stężenie akrylamidu do 8% można zwiększyć odstęp między białkami o najwyższych masach cząsteczkowych (rys. 4.1B). Ogranicza się jednak wówczas rozdział białek o masach poniżej 40 K. Wnikanie dużych cząsteczek białek do żelu o tak wysokim stężeniu akrylamidu możliwe jest ze względu na zmieniony stosunek bis-akrylamidu do akrylamidu. W przypadku zastosowanej metody wynosi on 1 : 200.

**Rys. 4.1**

Rozdział w żelu poliakrylamidowym (A - 15%, B - 8%), w obecności 8 M mocznika, białek miofibrili z mięśni świń.

- T1 - titina natywna;  
T2 - titina zdegradowana;  
TM - tropomiozyna;  
A - aktyna;  
Tn-T - troponina T



### Piśmiennictwo:

1. Laemmli, U. K. 1970. Nature 227:680.
2. Fritz, J., D.R. Swartz, and M.L. Greaser. 1989. Factors affecting polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight myofibrillar proteins. Anal. Biochem. 180:205.
3. Penny, I.F. and E. Dransfeld, 1979. Relationship between toughness and troponin T in conditioned beef. Meat Science, 3, 135-141.
4. Penny, I.F. and R. Ferguson-Pryce, 1979. Measurement of autolysis in beef muscle homogenates. Meat Science, 3, 121-134.



## Przykład 5.

### ELEKTROFOREZA BIAŁEK MIĘSA O MASIE POWYŻEJ 200 K W ŻELU AGAROWYM

<sup>1</sup>Greaser M.L., <sup>1</sup>Kumazawa Y., <sup>2</sup>Pospiech E.

<sup>1</sup>Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin-Madison, USA

<sup>2</sup>Instytut Technologii Mięsa Akademii Rolniczej w Poznaniu, e-mail: [pospiech@au.poznan.pl](mailto:pospiech@au.poznan.pl)

#### Wprowadzenie:

Zastosowanie agarozy w rozdzielaczach elektroforetycznych pozwala na dobry rozdział białek o bardzo dużych masach cząsteczkowych, co jest związane z dużą porowatością żeli agarozowych. Wykorzystanie agarozy do rozdzielania białek rozpuszczonych w SDS było dotychczas ograniczone ze względu na rozpuszczenie agarozy przez ten detergent. Modyfikacja metody pozwoliła na rozdzielanie w tym nośniku próbek dotychczas rozdzielanych tylko w żelach poliakrylamidowych. Żele agarozowe pozwalające na rozdział bardzo dużych białek mają dobre właściwości mechaniczne i są przezroczyste. Ograniczeniem metody jest to, że na jednym żelu można rozdzielić białka o masie w zakresie od 200 K do około 4000 K, a nie w całym spektrum mas cząsteczkowych białek występujących w analizowanych materiałach. Metoda ta była wykorzystywana do rozdzielania białek mięśni, zarówno przemitych miofibrili, jak i wycieku wirówkowego pozyskanego z nich, w tym szczególnie białek cytoszkieletarnych. Masa cząsteczkowa tych białek często przekracza 200 K, a niekiedy wynosi nawet ponad 3000 K.

#### Materiały:

- 1 Próbki z mięśnia zwierzęcego – przemitye miofibryle, wyciek wirówkowy i osady powstałe po odwirowaniu wycieku swobodnego z mięsa składowanego w chłodni.
- 2 Taśma samoprzylepna firmy Fisher
- 3 Arkusze celofanu lub folii Mylar.

#### Aparatura:

- 1 Zestaw do elektroforezy pionowej **SE-250**.
- 2 Zasilacz **EPS 600**.
- 3 Zestaw do dokumentacji żeli **ImageMaster<sup>®</sup> VDS**.
- 4 Zestaw do suszenia żeli

#### Odczynniki:

- 1 Bufor do sporządzania żelu rozdzielającego - 0,5 M Tris-base, 0,2 M kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,5.
- 2 Bufor do sporządzania żelu zagęszczającego - 0,125 M Tris base, wartość pH 6,8.
- 3 Bufor elektrodowy do prowadzenia rozdzielacza – 90 mM Tris-base, 90 mM kwas borowy, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, pH 8,5.
- 4 Roztwór utrwalający i barwiący – wodny roztwór 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% kwas octowy lodowaty.
- 5 Roztwór odbarwiający – wodny roztwór 10% metanolu, 7,5% kwasu octowego.
- 6 Bufor próby "A" - 8 M mocznik, 2 M tiomocznik, 0,025 M Tris-HCl, 3% SDS, 75 mM DTT i 0,05% błękitu bromofenolowego, pH 6,8 (stosować do rozpuszczania próbek tkanki mięśniowej i przemitych miofibrili).

- 7 Bufor próby "B" – 0,05 M Tris (pH 6,8), 75 mM DTT, 3% SDS, 10% glycerol, 0,1% błękit bromofenolowy.
- 8 Agaroz SeaKem<sup>®</sup> Gold (FMC BioProducts, Rockland, Me)
- 9  $\beta$ -merkaptotoetanol
- 10 70% wodny roztwór etanolu

### **Przygotowanie żeli rozdzielającego i zagęszczającego:**

#### **A. Przygotowanie żelu rozdzielającego:**

- 1,5 g agarozy zawiesić w 100 ml buforu zawierającego 0,5 M Tris, 0,2 M kwasu borowego, 1 mM EDTA (pH 8,5), umieścić w 250 ml kolbce Erlenmeyer'a i zamknąć kolbkę folią aluminiową, mocując ją na kołnierzu kolbki za pomocą gumki aptecznej.
- Roztwór mieszać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
- Zawiesinę agarozy ogrzewać do jej całkowitego rozpuszczenia. Ogrzewanie prowadzić ostrożnie, aby nie nastąpił wyciek agarozy.
- Po rozpuszczeniu całość jeszcze raz dobrze wymieszać i schłodzić początkowo w temperaturze pokojowej a następnie przechowywać w chłodni.

#### **B. Przygotowanie żelu zagęszczającego:**

- 0,5 g agarozy zawiesić 100 ml 0,125 M roztworu Tris o pH 6,8 w 250 ml kolbce Erlenmeyer'a.
- Dalej postępować jak w przypadku sporządzania żelu rozdzielającego.

### **Przygotowanie próbki**

- Do 3 mg próbki (najczęściej przebyte miofibryle) naważonej w 0,5 ml probówce Eppendorfa dodać 100  $\mu$ l buforu próby „A”. Całość wymieszać.
- Rozpuszczalne białka (np. wyciek wirówkowy) przenieść do próbówki Eppendorfa (10  $\mu$ l) i dodać 90  $\mu$ l buforu B.
- Ogrzewać w 100°C przez okres 3 minut. Można też stosować łagodniejsze ogrzewanie w 50°C przez 20 minut (zalecane przy wyciekach).
- Próbkę odwirować (15 sekund, 10,000 x g).
- Stężenie białka w próbce powinno zawierać się w przedziale 2 do 8 mg/ml.
- Nanieść 8 do 12  $\mu$ l próbki na żel.
- Próbkę przechowywać w zamrażarce do momentu analizy. Przed użyciem rozmrozić je w temperaturze pokojowej (30 minut) i odwirować.

### **Przygotowanie systemu do pracy:**

#### **A. Przygotowanie kasety do wylewania żelu:**

- Dokładnie umyte płytki, szklaną i aluminiową, przetrzeć delikatnie niepyłacym ręcznikiem papierowym nasyconym 70% etanolem.
- Zmontować kasetę z zastosowaniem 1,5 mm przekładek dystansowych.
- Kasetę usztywnić za pomocą dwóch klamer a następnie uszczelnić przy pomocy taśmy samoprzylepnej z firmy Fisher.
- Uszczelnianie kasety rozpocząć od jej dolnej części. W tym celu odciąć około 10 cm kawałek taśmy. Następnie taśmę położyć na stole laboratoryjnym częścią przylepną do góry. Na środku taśmy postawić kasetę i dokładnie ją docisnąć.
- Przymocować taśmę do krawędzi dolnej i bocznych kasety, tak aby zachodziła na te boki
- Założyć dodatkowe dwa kawałki taśmy, które będą zachodziły prostopadle na poprzednią.
- Po założeniu tych dwóch kawałków taśmy nałożyć jeszcze jedną o długości takiej samej jak w przypadku pierwszej i opasać nią kasetę na samym dole poczynając od około 2 cm

z tyłu kasety (płytką aluminiową), przechodząc następnie na płytkę szklaną (przednia część kasety) i kończąc ponownie z tyłu kasety.

- Założyć dwie dodatkowe pary klamer w górnej części kasety.
- Na płytce szklanej zaznaczyć markerem w odległości 2,3 cm od górnej krawędzi płytki linię, do której należy nalać żel rozdzielający.

#### **B. Przygotowanie żelu dolnego (rozdzielającego)**

- Przed nalaniem żelu kasety podgrzać do temperatury 65 - 70°C (około 15 minut).
- Do tej samej temperatury doprowadzić uprzednio sporządzony w kolbce żel rozdzielający oraz końcówkę pipety, która będzie użyta do dozowania żelu z kolbki do kasety.
- Po osiągnięciu potrzebnej temperatury możliwie szybko przenieść roztwór agarowy do kasetki.
- Pozostawić kasetkę na stole w temperaturze pokojowej na czas 15 do 30 minut.
- Po schłodzeniu kasety z żelem umieścić w woreczku foliowym i przechowywać w chłodni aż do użycia.

#### **C. Przygotowanie żelu górnego (zagęszczającego):**

- Kasety wyjąć z chłodni i pozostawić w temperaturze pokojowej na około 0,5 godziny, a następnie umieścić ją na około 15 minut w temperaturze 65°C.
- W termostacie umieścić żel zagęszczający uprzednio przygotowany w kolbce Erlenmeyer'a. Ponieważ jest on przechowywany w chłodni dlatego też przed włożeniem kolbki do termostatu należy również przetrzymać go przez około 0,5 godziny w temperaturze pokojowej.
- W termostacie umieścić grzebień i końcówkę pipety automatycznej stosowanej do zadawania żelu do kasety.
- Przygotować zestaw do elektroforezy Mighty Small II oraz klamry mocujące kasety.
- Gdy kasetka, żel i inne części umieszczone w termostacie uzyskają tę samą temperaturę wyciągnąć ją z niego i zdjąć szybko założone przed nalaniem żelu rozdzielającego taśmy uszczelniające.
- Po zdjęciu taśm kasety zainstalować w zestawie i założyć klamry mocujące.
- Nalać żel zagęszczający do kasety do wysokości około 2 – 3 mm poniżej górnej krawędzi płytki aluminiowej.
- Umieścić grzebień w kasecie zwracając uwagę na usunięcie wszystkich ewentualnych pęcherzyków powietrza, które niekorzystnie mogłyby wpływać na rozdział.
- Pozostawić aparat w temperaturze pokojowej przez około 15 do 20 minut celem zestalenia się agarowy.

#### **D. Przygotowanie zestawu do nanoszenia próbek:**

- Przygotować 250 ml buforu elektrodowego dodając do niego 97.66 µl β-merkaptioetanolu. Bufor powinien być schłodzonym.
- Po zestaleniu się żelu nalać bufor elektrodowy do pojemników elektrodowych.
- Zwykle w zestawie prowadzi się elektroforezę w dwóch kasetach. W przypadku dokonywania rozdzielania białek w jednej kasecie należy umieścić w miejsce drugiej płytkę, która będzie oddzielała bufor elektrodowy do elektrod przeznaczonych dla drugiej kasety.
- Przykleić szablon do płytki szklanej wskazując miejsce nanoszenia próbek wyznaczone przez wycięcia grzebień.
- Przed nanoszeniem próbek wyjąć grzebień z kasety.

### Przebieg doświadczenia

- Nanieść próbki w wycięcia żelu zagęszczającego.
- Aparat przykryć pokrywą i połączyć przewody z zasilaczem.
- Rozdział prowadzić przy stałym natężeniu prądu 10 mA na żel przez 5 – 6 godzin.
- Zakończyć rozdział gdy front barwnika osiągnie dolną krawędź kasety z żelem.

### Postępowanie po zakończeniu elektroforezy

- Rozmontować zestaw i korzystając z plastikowej szpatułki wydobyć żele z kasety.
- Przy pomocy szpatułki oddzielić żel zagęszczający od rozdzielającego. Żel zagęszczający wyrzucić do odpadów.
- Żelu rozdzielający umieścić w roztworze utrwalacza i barwnika na około 17 minut.
- Barwienie przeprowadzać w zamkniętych kuwetach umieszczając je na wytrząsarce lub kołysce.
- Umyć płytki szklane i aluminiowe oraz płytki dystansowe stosując detergent. Wyplukać wodą destylowaną i wysuszyć w strumieniu ciepłego powietrza.
- Odbarwiać żel aż do uzyskania jasnego tła i wyraźnie zaznaczonych pasm białek.
- Żel wysuszyć umieszczając go między dwoma wilgotnymi arkuszami celofanu lub folii Mylar. Do suszenia wykorzystać zestaw obejmujący plastikową płytkę i dopasowaną do niej ramkę.
- Celem zachowania elastyczności żelu, przed nałożeniem celofanu lub folii, rozprowadzić na jego powierzchni niewielką ilość gliceryny. Zapobiega to pękaniu żelu po wysuszeniu.
- Żele suszyć pod wyciągiem.
- Po wysuszeniu żele poddać archiwizacji używając systemu **ImageMaster® VDS**.
- Korzystając z elektronicznej postaci obrazu żelu dokonać analizy danych zawartych w tym obrazie przy pomocy programu **ImageMaster VDS ver. 2.0**.

Uwagi:

- 1 Zachować należyne środki ostrożności przy manipulacji żelem agarozowym gdyż łatwo ulega on destrukcji.
- 2 Unikać ogrzewania próbek w czasie dłuższym niż 5 minut w 100°C gdyż mocznik tworzy cyjaniany, które reagują z białkami i zmieniają szybkość ich migracji w żelu.

### Oczekiwane wyniki:

Poszczególne pasma białek powinny być wyraźnie rozdzielone pozwalając na łatwą ocenę ich rozdziału.

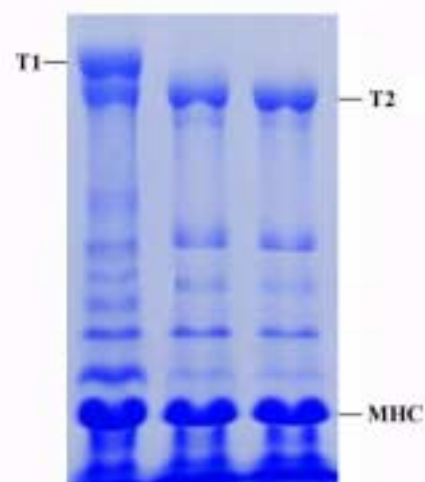
Rys. 5.1

Rozdział białek przemytych miofibryli mięśni świń w 1,5% żelu agarozowym:

T1 – titina natywna ok. 3700 K,

T2 – titina zdegradowana ok. 2400 K,

MHC – łańcuchy ciężkie miozyny 205 K



### Piśmiennictwo:

1. Wu M. & Kusukawa N. SDS agarose gels for analysis of proteins. BioTechniques. 1998: 24; 676-678.

## Przykład 6.

### OCENA FENOTYPÓW $\alpha_1$ -ANTYTRYPSYNY

Piłacik B.

Zakład Toksykologii i Kancerogenezy, Instytut Medycyny Pracy, ul. Św. Teresy 8,  
90-950 Łódź, e-mail: [anibas@imp.lodz.pl](mailto:anibas@imp.lodz.pl)

#### Wprowadzenie:

$\alpha_1$ -antytrypsyna ( $\alpha_1$ -AT) jest jednym z najważniejszych inhibitorów proteaz serynowych w ustroju człowieka. Genetycznie uwarunkowany niedobór  $\alpha_1$ -AT związany jest z rozedmą płuc ujawnianą w 3 i 4 dekadzie życia oraz zapaleniem wątroby u niemowląt. Wykryto 75 alleli  $\alpha_1$ -AT odpowiedzialnych za różnice ilościowe i jakościowe inhibitora. Niewielkie zmiany własności fizykochemicznych inhibitora pozwalają na różnicowanie odmian  $\alpha_1$ -AT drogą elektroforezy IEF w żelu poliakrylamidowym w gradiencie pH 4,2 do 4,9. Żel taki można przygotować dzięki zastosowaniu mieszaniny odpowiednich amfolitów. Allel Pi<sup>M</sup> występuje najczęściej w populacji ludzkiej i związany jest z normalnym stężeniem  $\alpha_1$ -AT w osoczu. Przedmiotem zainteresowania klinicystów jest allel Pi<sup>Z</sup> i związane z nim fenotypy Pi ZZ, Pi MZ, Pi SZ warunkujące obniżone stężenie aktywnej formy  $\alpha_1$ -AT w osoczu.

#### Materialy:

- 1 Osocze lub surowica ludzka.
- 2 Standardy elektroforetyczne IEF białka Pi M i Pi MZ.
- 3 Zestaw do przygotowania żeli **SDS&Native PAGE IEF Kit**.
- 4 **Repel-Silane**.
- 5 **GelBond PAG film** folia plastikowa o wym. 124x258 mm wiążąca poliakrylamid.
- 6 Bibuła Whatman 3 MM o wym. 10x5 mm lub **Paratex** (produkt APB).
- 7 Paski z bibuły Wh 3 MM lub f-my APB o wym. 10x250 mm do nasączania elektrolitem.
- 8 **Pharmalyte 40%, pH 4.2 - 4.9**.

#### Aparatura:

- 1 System elektroforezy **Multiphor II**.
- 2 Zasilacz **EPS 3500**.
- 3 Termostat **MultiTemp II**.

#### Odczynniki:

- 1 0,3 M roztwór chlorowodoru cysteiny, pH 7,4 zawierający: glicyna 150 mg, Na EDTA 9 mg, cysteina-HCL 94 mg, woda destylowana 2 ml.
- 2 30% roztwór akrylamidu: akrylamid 3,0 g, N-N metylenobisakrylamid 0,08 g, woda destylowana do 10 ml. Przechowywać w temp. 4°C.
- 3 0,1 M nadsiarczan amonu, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 114 mg, woda destylowana 5 ml. Sporządzić bezpośrednio przed użyciem.
- 4 5% roztwór akrylamidu zawierający amfolinę o stężeniu 2,5%: woda destylowana 19,1 ml, Pharmalyte pH 4,2-4,9 - 1,9 ml, roztwór akrylamidu 30% - 5,0 ml, glicerol 87% - 4,0 ml, N,N,N,N-Tetra methylethylenediamine (TEMED) 10 µl, nadsiarczan amonu 300µl. Nadsiarczan amonu dodawać bezpośrednio przed użyciem.
- 5 Roztwór anodowy, 0,04 M kwas glutaminowy w wodzie.

- 6 Roztwór katodowy, 0.1M NaOH w wodzie.
- 7 Roztwór utrwalający: kwas trójchlorooctowy 100 g, kwas sulfosalicylowy 50 g, woda destylowana 1000 ml.
- 8 Roztwór barwiący: Coomassie Brilliant Blue R 250 4.0 g, etanol 350 ml, woda destylowana 550 ml, kwas octowy stężony 100 ml. Ogrzać do temp. 60°C i przefiltrować.
- 9 Roztwór odbarwiający N<sup>o</sup> I: etanol 700 ml, woda destylowana 1100 ml, kwas octowy, lodowaty 200 ml.
- 10 Roztwór odbarwiający N<sup>o</sup> II: roztwór odbarwiający N<sup>o</sup> I - 100 ml, kwas octowy 5% - 100 ml, glicerol 87% - 20 ml. Glicerol dodać bezpośrednio przed użyciem.

**Uwaga:**

1 Przy odważaniu akrylamidu stosować okulary, maskę ochronną i rękawiczki lateksowe.

**Przygotowanie próbki:**

- Do 90 µl osocza lub surowicy dodać 10 µl roztworu chlorowodoru cysteiny. Pozostawić na noc w temp. 4° C.

**Przygotowanie żelu poliakrylamidowego:**

- Na szklaną powierzchnię płyty nanieść około 1 ml etanolu, nałożyć **GelBond PAG film** hydrofilową stroną do żelu.
- Nałożyć plastikową uszczelkę pokrytą pastą silikonową.
- Nałożyć szklaną płytę, której powierzchnia od strony żelu została wcześniej pokryta warstwą Repel-Silane.
- Utworzoną w ten sposób komorę spiąć klamrami i napełnić świeżo przygotowanym roztworem poliakrylamidu (5%).
- Aby zapobiec utlenianiu żelu, odcinek mający kontakt z powietrzem pokryć niewielką ilością izopropanolu lub wody destylowanej.
- Żel polimeryzuje całkowicie w temp. pokojowej przez 60 min. Komorę z żelem, której szczyt został uszczelniony taśmą, można przechowywać w temp. 4°C w okresie 1 tygodnia.
- Po usunięciu szklanych płyt, żel umocowany na plastikowym filmie jest gotowy do wykorzystania.

**Przebieg doświadczenia:**

**A. Przeprowadzenie elektroforezy:**

- Na 15 minut przed rozpoczęciem elektroforezy włączyć termostat i nastawić temperaturę 15°C.
- Na chłodzoną płytę aparatu wylać 5 ml 1% roztworu Triton-X 100.
- Umieścić żel na płycie aparatu.
- Paski bibuły długości żelu nasączyć roztworem elektrodowym odpowiednim dla anody i katody i umieścić na brzegach żelu.
- Przeprowadzić preelektroforezę: Warunki preelektroforezy: temperatura 15°C, napięcie 2000 V, prąd 150 mA, moc 10 W, czas trwania 30 min.
- Umieścić skrawki Paratexu na żelu w odległości 1 cm od lewego brzegu zachowując odległość 1-2 mm między skrawkami.
- Na skrawki bibuły nanieść 15 µl badanej surowicy, uprzednio zredukowanej cysteiną.
- Prowadzić elektroforezę w warunkach: temperatura 15°C, napięcie 2000 V, prąd 150 mA, moc 30 W, czas 60 min.
- Usunąć skrawki bibuły.
- Kontynuować elektroforezę w tych samych warunkach przez 90 min.

**B. Utrwalenie, barwienie i zabezpieczenie żelu:**

- Po zakończeniu elektroforezy umieścić płytkę z żelem w roztworze utrwalającym na okres 30-60 min.
- Następnie zalać płytkę z żelem roztworem odbarwiającym N<sup>o</sup> I i pozostawić na okres 30 min.
- Wybarwiać w roztworze Coomassie R-250 przez 20 min.
- Płukać w roztworze odbarwiającym N<sup>o</sup> I zmieniając kilka razy kąpiel, aż do odbarwienia tła.
- Pozostawić żel na noc w roztworze N<sup>o</sup> II.
- Odbarwiony żel umieścić w cieplarni w temperaturze 60° C i suszyć 60 min.
- Żel zabezpieczyć przyklejając plastikowy film.

**Postępowanie po zakończeniu doświadczenia:**

- Rozmontować układ, przemyć elektrody wodą destylowaną.

**Oczekiwane wyniki:**

Obserwowany wzór elektroforetyczny wszystkich homozygotycznych fenotypów  $\alpha_1$ -AT składa się z 5 widocznych pasm o różnej szybkości elektroforetycznej. W obrazie odmian heterozygotycznych, obserwujemy zmienną ilość pasm, w zależności od fenotypu, związaną z efektem nakładania. Rysunek 6.1 przedstawia obraz elektroforetyczny kilku odmian fenotypowych  $\alpha_1$ -AT: linie 2 i 9 - Pi M, linie 1 i 8 - Pi MZ, linie 4 i 5 - Pi Z, linie 3 i 6 - Pi FM, linia 7 - Pi MS.

**Rys. 6.1**

Rozdział elektroforetyczny, techniką izoelektroogniskowania, próbek osocza ludzkiego. Rozdział prowadzono w 5% żelu poliakrylamidowym w gradiencie pH 4,2-4,9. Zidentyfikowano fenotypy:

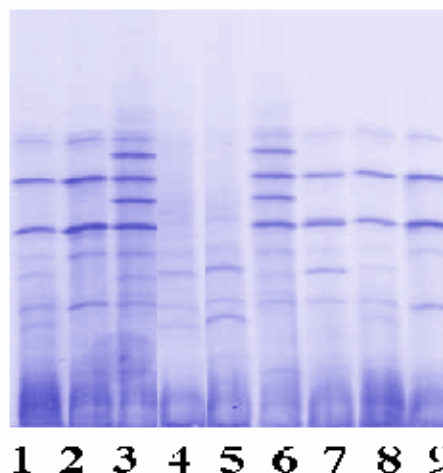
Pi M - linie 2 i 9,

Pi MZ - linie 1 i 8,

Pi Z - linie 4 i 5,

Pi FM - linia 3 i 6,

Pi MS - linia 7.

**Piśmiennictwo:**

1. Piłacik B. Określenie fenotypów  $\alpha_1$ -antytrypsyny metodą ogniskowania izoelektrycznego. Diagn.Lab. 1989: 6; 276-283.

## Przykład 7.

### ELEKTROFORETYCZNE ROZDZIAŁY BIAŁEK GENERATYWNYCH CZĘŚCI ROŚLIN

Kalinowski A., Radłowski M.

Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, e-mail: [akal@igr.poznan.pl](mailto:akal@igr.poznan.pl)

#### Wprowadzenie:

Żeńską częścią generatywną roślin jest słupek zbudowany ze znamienia, szyjki i zalążni, w której znajduje się jeden lub więcej woreczków zalążkowych z komórkami jajowymi czyli makrogametofitami. Męską część stanowią pylniki, produkujące ziarna pyłku (mikrogametofity) z komórkami plemnikowymi. Łatwość pozyskania dużej ilości mikrogametofitów, a także możliwość manipulacji pojedynczymi ziałami pyłku umożliwiają elektroforetyczne rozdziały oraz detekcję białek. Z uwagi na powyższe, podobne analizy z pojedynczych makrogametofitów są możliwe tylko w przypadku roślin szpilkowych (*Coniferae*). Elektroforetyczne analizy białek (enzymów) z pojedynczych ziaren pyłku są interesujące zarówno z punktu widzenia teoretycznego jak i praktycznego. Dojrzały pyłek jest wygodnym materiałem do badań porównawczych ze względu na jego haploidalność i ściśle wyrównane stadium fizjologiczne (1-3). Ziarno pyłku, podobnie jak pojedyncze znamię lub jego wydzielina, zawierają zbyt małą ilość białek by zastosować do ich rozdziału powszechnie używane metody elektroforetyczne. Wykonanie analiz z tego materiału lub materiałów o podobnej charakterystyce wymaga miniaturyzacji stosowanych dotąd technik.

### MIKROELEKTROOGNISKOWANIE (mIEF) BIAŁKA.

#### Materiały:

- 1 Dojrzały pyłek kukurydzy - *Zea mays* (wielkość ziarna 100  $\mu$ m).
- 2 Pojedyncze znamiona tytoniu - *Nicotiana glauca*.
- 3 Wydzielina z pojedynczych znamion tytoniu - *Nicotiana glauca*.
- 4 Pojedyncze znamiona kostrzewy łąkowej - *Festuca pratensis*.
- 5 Płyta chłodzona bieżącą wodą.
- 6 Płytki szklane o wymiarach 75×40×1mm,
- 7 Paski bibuły Whatmann 3 MM (75×15 mm),
- 8 Electrophoresis Film No E-1380 (Sigma),
- 9 Skrawki bibuły filtracyjnej (2×2 mm),
- 10 Celofan,
- 11 Mostek z platynowymi elektrodami wykonany dla metody mikro,
- 12 Binokular,
- 13 Dobrze wyostrzona pinceta ,
- 14 Bagietka szklana,

#### Aparatura:

- 15 Zasilacz **EPS 3500 XL**.
- 16 Lampa UV.
- 17 **Densytometr laserowy UltroScan XL**.
- 18 **Skaner Sharp JX-330**.
- 19 Programy komputerowe: **LabScan, Image Master 2-D Elite**.



**Odczynniki:**

- 1 100 ml wodnego roztworu - akrylamid/bisakrylamid (30g/0,8g)
- 2 Ampholine lub Servalyt o zakresie pH 3-10,
- 3 0,015 % wodny roztwór ryboflawiny,
- 4 0,25 M NaOH (katodowy bufor elektrodowy),
- 5 0,25 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (anodowy bufor elektrodowy),
- 6 1% wodny roztwór dithiotreitolu (DTT) jako bufor ekstrakcyjny,
- 7 1% wodny roztwór dithiotreitolu (DTT) z 0,02% Nonidet P-40 (NP-40) jako bufor ekstrakcyjny (tylko do ekstrakcji białek znamion *F. pratensis*),
- 8 12% kwas tróchlorooctowy (TCA),
- 9 10% etanol,
- 10 0,1% azotan srebra,
- 11 3% węglan sodu z 50 :1 formaldehydu na 100 ml wodnego roztworu ,
- 12 1% kwas octowy,
- 13 0,2 M bufor octanowy pH 5,1, zawierający w 25 ml 47,3 μM α-naftylofosforanu i 40,4 μM Fast Blue RR,
- 14 1,5 mM bufor fosforanowo-potasowy pH 6,0, zawierający w 25 ml 40,4 μM Fast Blue RR i 51,0 μM α-naftylooctanu rozpuszczonego uprzednio w 1,25 ml dwumetyloformamidu.

**Przygotowanie próbek :**

- Pojedyncze ziarna pyłku i wydzielinę znamienia rozdzielić bez przygotowań.
- Pojedyncze znamię *N. alata* homogenizować z 5 μl 1% DTT, a *F. pratensis* z 2 μl 1% ditiotreitolu i 0,02% NP-40.

**Przygotowanie systemu do pracy:****A. Przygotowanie żeli:**

- Na płytce szklanej ułożonej w pozycji horyzontalnej i zroszonej wodą umieścić Electrophoresis Film No E-1380, tak by jego hydrofobowa strona skierowana była do wnętrza przyszłej komory na żel a grubość żelu (0,4 mm) odpowiadała grubości plastikowych przekładek znajdujących się pomiędzy filmem a drugą płytką szklaną.
- Ułożone równolegle w odległości 26 mm przekładki plastikowe mają jednocześnie ograniczać drogę rozdziału.
- W utworzoną w ten sposób komorę (60mm x 26mm x 0,4mm) wlewać mieszaninę wody / akrylamidu / Ampholine / ryboflawiny (600:1 / 225:1 / 109:1 / 52:1) i polimeryzować pod światłem UV przez 25 min. Odległość żelu od lampy ustalić na 50 cm.
- Po polimeryzacji szybkę wraz z przylegającym do niej żelem oderwać od filmu, umieścić w zamkniętej komorze (np. plastikowa, kwadratowa szalka Petriego), zabezpieczyć przed wyschnięciem i przechowywano w temp. 4°C przez noc.

**B. Wychłodzenie płyt:**

- Na godzinę przed rozpoczęciem rozdziału płytę wychłodzić bieżącą wodą, a następnie umieścić na niej szybkę z żelem.

**C. Programowanie zasilacza:**

- Do mikroelektroogniskowania wykorzystać dwa z dziewięciu programów zasilacza.
- Pierwszy z nich, użyć do pre-elektroogniskowania. Zastosować tam dwa stopnie: 100 V - przez 10 min, 200 V - przez 15 min.

- Drugi użyć podczas właściwego elektroogniskowania. Zaprogramować cztery stopnie: 35 V -15 min., 100 V - 30 min., 150 V - 10 min. i 200 V - 5 min.

#### **Przebieg doświadczenia:**

- Na wychłodzonej płycie umieścić przygotowany poprzedniego dnia żel (na płycie szklanej).
- Paski bibuły Whatmann 3 MM, nasączone 0,25 M NaOH (katoda) i 0,25 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (anoda), dosunąć czołowo do żelu. Umieszczany na nich mostek elektrodowy musi być dostatecznie ciężki by zapewnić niezakłócony przepływ prądu.
- Przed naniesieniem prób prowadzić pre-elektroogniskowanie (program 1).
- Pojedyncze ziarna pyłku wybierano pod binokulem (100-krotne powiększenie), umieścić w żelu przy katodzie i rozgnieść pęsetą.
- Używając tej samej zaciśniętej pęsety, w to samo miejsce na żelu nanieść minimalną ilość 1% DTT w wodzie (obecność jonów w buforach ekstrakcyjnych powoduje zakłócenia rozdzielania).
- Żele z naniesionymi pyłkami pozostawić na 15 min w temperaturze pokojowej.
- W przypadku wydzieliny znamienia oraz znamion *N. alata* i *F. pratensis* próbki aplikować umieszczając na żelu nasączone ekstraktem białkowym skrawki bibuły filtracyjnej o wymiarach 2×2 mm.
- Po zakończonych rozdzielach żele wybarwiać azotanem srebra na obecność białek ogólnych lub specyficznie na wybrane enzymy.

#### **Wybarwianie białek azotanem srebra (4):**

- Utrwalić żel: 20-30 min. w 12% TCA.
- Poddać żel płukaniu: dwukrotnie po 5 min. w 10 % etanolu oraz trzykrotnie po 5 min. w wodzie.
- Barwić żel: 30 min. w 0,1 % azotanie srebra.
- Płukanie żel: 1 min. w wodzie.
- Wywołać barwę: do 10 min. w 3 % węglanie sodu z 50 µl formaldehydu na 100 ml roztworu.
- Wywołanie barwy przerwać kąpielą: 5 min. w 1 % kwasie octowym.
- Płukanie: dwukrotnie po 5 min. w wodzie.

#### **Wybarwianie na obecność kwaśnej fosfatazy:**

- Specyficzne barwienie przeprowadzić w 40°C inkubując żel w 25 ml 0.2 M buforu octanowego pH 5,1, zawierającym 47,3 µmola α-naftylofosforanu i 40,4 µmola Fast Blue RR.
- Reakcję prowadzić do intensywnego uwidocznienia prążków.
- Barwienie przerwać zanurzając żel w 1% kwasie octowym na 10 min.

#### **Wybarwianie na obecność esteraz:**

- Żel inkubować w 25 ml 1,5 mM buforu fosforanowo-potasowy pH 6,0 z dodatkiem Fast Blue RR (40,4 :mola) oraz α-naftylooctan (51,0 µmola, rozpuszczony uprzednio w 1,25 ml dwumetyloformamidu).
- Barwienie prowadzić w 37°C do uwidocznienia prążków.
- Reakcję przerywać zanurzając żel w 1% kwasie octowym na 10 min.

#### **Zabezpieczenie żeli do przechowywania:**

- Na wybarwione żele nałożyć wilgotny celofan, szklaną bagietką delikatnie usunąć pęcherzyki powietrza, a nadmiar celofanu podwinąć.

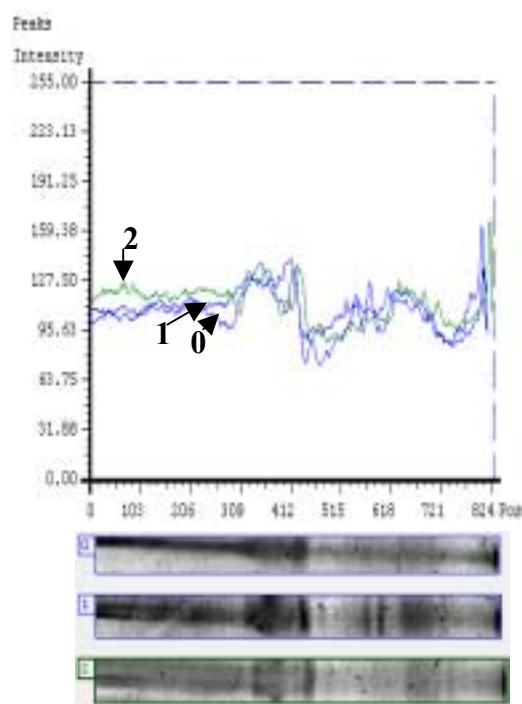
- Tak zabezpieczony żel pozostawić na gładkiej powierzchni w temperaturze pokojowej aż do wyschnięcia (około 24 godz.).
- Postępując w ten sposób, żele z wybarwionymi białkami czy enzymami można przechowywać nawet 10 lat bez utraty jakości wybarwienia.
- Dla udokumentowania wyników żele densytometrować przy pomocy densytometru laserowego **UltroScan XL** i przygotować elektroforegramy.
- Alternatywnie można zastosować system skanowania optycznego oparty na skanerze **SHARP JX-330** i oprogramowaniu **LabScan** i **Image Master 2-D Elite**.

#### Oczekiwane wyniki:

Obrazy białek z pojedynczych ziaren pyłku dwóch linii kukurydzy i ich mieszańców, otrzymane metodą mikro-elektroogniskowania i wybarwione azotanem srebra, wykazały istnienie wysokiego polimorfizmu. Populacje dwudziestu pyłków dla każdej z dwóch linii i trzydziestu pyłków ich mieszańców różniły się jakościowo i ilościowo (frekwencja prążków). Markery białkowe dla pojedynczych ziaren pyłku mogą być użyte do szybkiego rozróżniania roślin. Analiza białek, w tym enzymów, z pojedynczych pyłków, z uwagi na ich haploidalne stadium, pozwala na bezpośrednią interpretację genetyczną danych elektroforetycznych. Ograniczeniem prowadzenia podobnych doświadczeń jest średnica pyłku - nie mniejsza niż 40  $\mu\text{m}$ . Wielkość ta umożliwia jeszcze manualne operacje, a zawartość białek takiego pyłku pozwalała na ich wybarwienie i detekcję (rys. 7.1).

Rys. 7.1

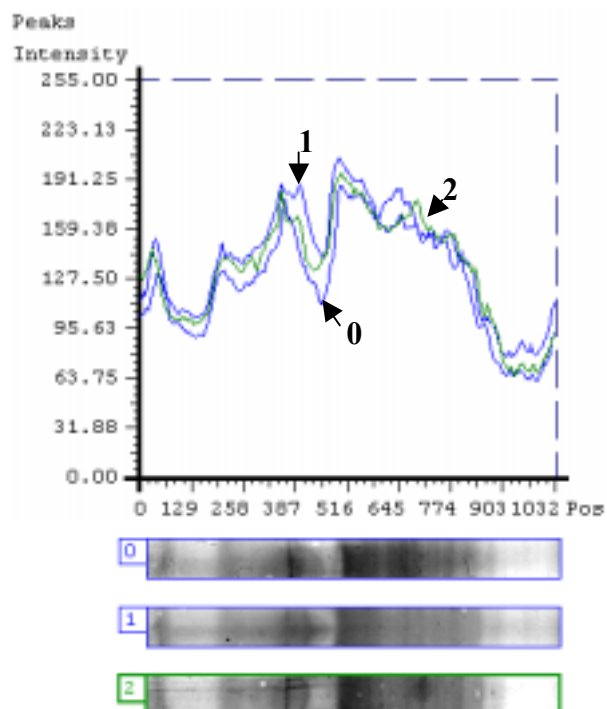
Białka z trzech pojedynczych ziaren pyłków *Zea mays* po rozdziale metodą mIEF i wybarwieniu azotanem srebra.



Metodą mIEF badano także polimorfizm peptydów pojedynczych znamion (5, 6) oraz wpływ obecności odmytych białek ścian pyłku (tzw. eluat) na zmiany białek znamion samoniezgodnych osobników *F. pratensis*. W pojedynczych znamionach, znamionach traktowanych eluatem pyłkowym i w eluacie pyłkowym wykryto 27 peptydów. Jeden z nich o punkcie izoelektrycznym (pI) w pH 5,0 wykryto tylko w znamionach traktowanych eluatem pyłkowym. Peptyd ten najprawdopodobniej odgrywa istotną rolę w zjawisku samoniezgodności u *F. pratensis* (Rys. 7.2).

**Rys. 7.2**

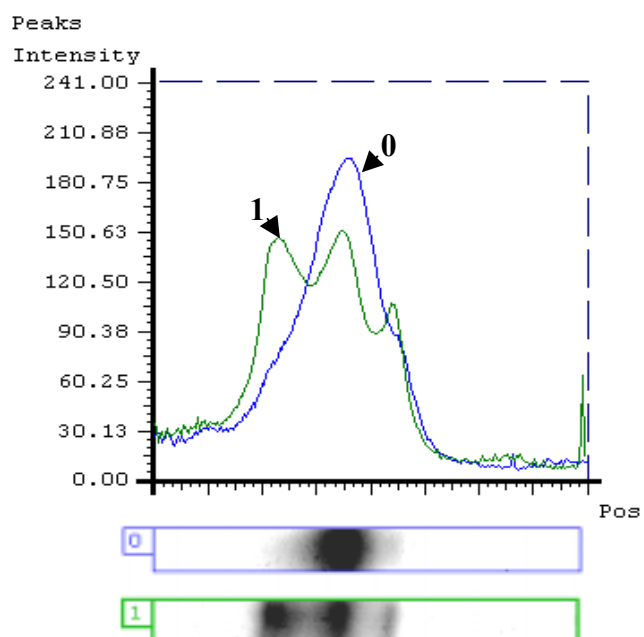
Białka z trzech pojedynczych znamion *Festuca pratensis* po rozdziale metodą mIEF i wybarwieniu azotanem srebra.



Zastosowanie mIEF do rozdzielów kwaśnej fosfatazy (ACP) i esteraz z pojedynczego znamienia *N. alata* miało charakter wstępny przed rozdzielami tych enzymów metodą dwukierunkowej elektroforezy. W znamieniu stwierdzono obecność trzech izoenzymów ACP, natomiast w wydzielinie obecny był tylko jeden z nich. W przypadku esteraz zaobserwowano, że niektóre izoformy są charakterystyczne tylko dla wydzieliny, inne tylko dla znamienia (Rys. 7.3 i 7.4).

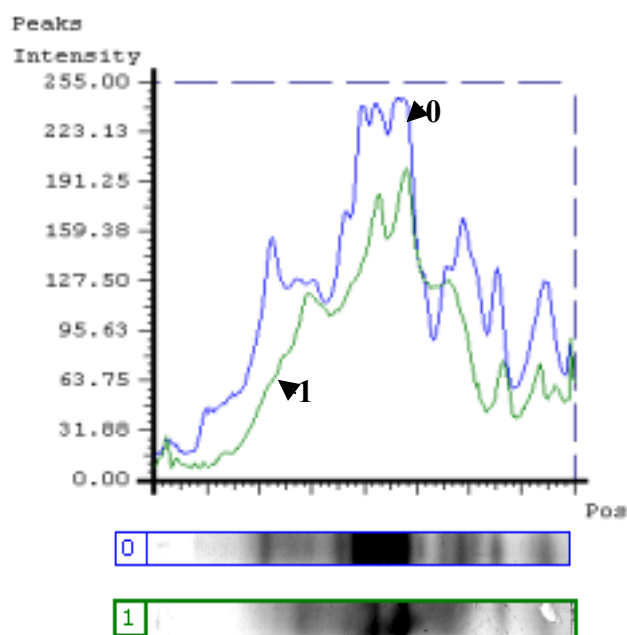
**Rys. 7.3**

Kwaśna fosfataza wydzieliny znamienia - 0 i pojedynczego znamienia -1 *Nicotiana alata* po rozdzielach metodą mIEF.



**Rys. 7.4**

Esterazy z pojedynczego znamienia - 0 i jego wydzieliny -1 u *Nicotiana glauca* po rozdzielach metodą mIEF.



Mikro-IEF można z powodzeniem użyć nie tylko do analiz generatywnych części roślin lecz również wtedy gdy dysponujemy bardzo ograniczoną ilością materiału. Tą właśnie metodą badano zmienność w obrębie jednej kolonii wątrobowca *Plagiochila porelloides*. W tym przypadku syntetyczny elektroforegram skonstruowano na podstawie obrazów esteraz, kwasnej fosfatazy, peroksydaz, diaforazy, dehydrogenazy kwasu jabłkowego, dehydrogenazy kwasu szikimowego i dehydrogenazy kwasu glutaminowego.

#### **Uwagi:**

- 1 Jest to szybka i tania metoda, wymagająca małej ilości odczynników do sporządzania żeli i mieszanin barwiących, może mieć zastosowanie do analiz małych próbek. Jest wysoce powtarzalna.
- 2 Metoda ta wymaga jednak dużej wprawy i zdolności manualnych.

#### **Piśmiennictwo:**

1. Mulcahy D.L., Robinson R.W., Ihara M., Kesseli R., J.Hered., 1981: 72; 353.
2. Gay G., Kerhoas C., Dumas C., Theor.Appl.Genet., 1986; 73; 47.
3. Kalinowski A., Doleżał K., Radłowski M., Klimko M., Bartkowiak S., *Biol.Bull.Poznań (Genetics)*, 1998: 35; 75.
4. Heukeshoven J., Dernick R., Electrophoresis, 1985: 6; 103.
5. Kalinowski A., Radłowski M., Bartkowiak S., Genet.Pol., 1996: 37A; 163.
6. Kalinowski A., Radłowski M., Zwierzykowski Z., Bartkowiak S., Genet.Pol., 1997: 451; 41.

## Przykład 8.

### KRZYWE MIARECZKOWANIA ELEKTROFORETYCZNEGO

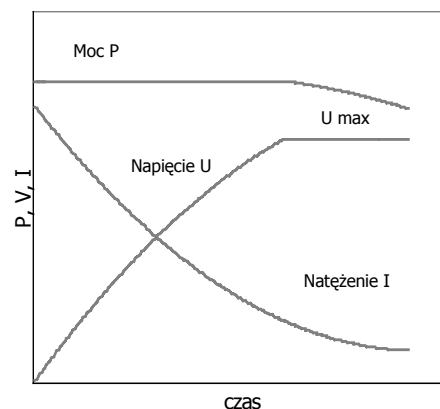
<sup>1</sup>Buchowiecka A., <sup>2</sup>Peltre G

<sup>1</sup>Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź,  
e-mail: [abuchowiecka@hotmail.com](mailto:abuchowiecka@hotmail.com)

<sup>2</sup>Unité d'Immuno Allergie, Institut Pasteur, Paryż

## Wprowadzenie

Miareczkowanie elektroforetyczne jest rodzajem poziomej dwuwymiarowej elektroforezy wywodzącej się z techniki ogniskowania elektroforetycznego. Kluczowe znaczenie dla tej metody ma uformowanie w medium separacyjnym stabilnego liniowego gradientu pH rosnącego w kierunku od anody do katody. W tym celu do nośnika dodawane są amfoteryczne elektrolity (amfolity) będące heterogeniczną mieszaniną izomerów alifatycznych oligoamino-oligokarboksyłowych kwasów o łagodnej gradacji ich pI, wysokiej pojemności buforowej, wysokim przewodnictwie w pI oraz nie wykazujące niekorzystnych oddziaływań z badanym materiałem biologicznym (1, 2). Miareczkowanie elektroforetyczne wykonuje się w kwadratowych żelach z umieszczonym centralnie podłużnym aplikatorem dla próbek. Żel umieszcza się między elektrodami tak, by rowek aplikatora był do nich prostopadły; w tym kierunku formuje się gradient pH przykładając do układu stałą moc odpowiednią do efektywności chłodzenia żelu. Cząsteczki amfolitów poruszają się w kierunku elektrody o znaku przeciwnym przyjmując bądź tracąc protony w wyniku czego ich wypadkowy ładunek powierzchniowy maleje a ruchliwość elektroforetyczna obniża się osiągając wartość zero w pH odpowiadającym wartości ich punktów izoelektrycznych. Przewodnictwo amfolitów, początkowo wysokie, obniża się w miarę migracji i tworzenia gradientu pH powodując spadek natężenia prądu i proporcjonalny wzrost napięcia w układzie zgodnie z zależnością  $P = U \cdot I$  (Rys. 8.1). Aby zapobiec przegrzewaniu się żelu w regionach o niskim przewodnictwie, należy ustawić górny limit napięcia ( $U_{\max}$ ) jakie może być przyłożone w trakcie procesu. W drugim etapie żel obraca się o 90° i wprowadza badaną próbkę do aplikatora, który tym razem jest ułożony równolegle do elektrod. Po przyłożeniu stałego napięcia amfolity zlokalizowane w swoich punktach izoelektrycznych pozostaną nieruchome, a białka próbki będą migrować z ruchliwością odpowiadającą wartościom pH w każdym punkcie żelu. W wyniku separacji i wybarwienia elektroforegramu powstaną krzywe podobne do klasycznych krzywych miareczkowania białek. Punkty przecięcia krzywych z rowkiem aplikatora wyznaczają wartości pI poszczególnych białek.



Rys. 8.1 Współzależność parametrów elektroforetycznego procesu formowania gradientu pH z udziałem amfolitów [1].

### **Materialy:**

- 1 Standardy elektroforetyczne do wyznaczania pI - **Broad pI Kit, pH 3,5 – 9,3.**
- 2 Preparat białek enzymatycznych wytwarzanych pozakomórkowo przez bakterie *Oerskovia xanthineolytica* otrzymany przez selektywne wysolenie z cieczy pochodowlanej oraz dializę wobec 0,02 M buforu cytrynianowego, pH = 5,4; stężenie białka 5mg/ml.
- 3 Agaroz - **Agarose for IEF.**
- 4 D-Sorbitol.
- 5 Amfolity - **Ampholine broad range pH 3,5 – 10.**
- 6 Błękit Coomassie R-250.
- 7 Repel Silane.
- 8 Nośnik do żeli agarozowych - **GelBond film for agarose.**
- 9 Paski grubej bibuły o szerokości około 7 mm jako rezerwuary roztworów elektrodowych - **IEF electrode strips.**
- 10 taśma typu Dymo tape o grubości 0,2 – 0,25mm.
- 11 Bibuła filtracyjna Whatman nr1

### **Aparatura:**

- 1 System do elektroforezy poziomej **Multiphor II.**
- 2 Zasilacz **EPS 3501.**
- 3 Termostat **MultiTemp III Thermostatic Circulator.**
- 4 Kołyska laboratoryjna

### **Odczynniki:**

- 1 Roztwory do wybarwiania elektroforegramu:
  - A- wodny roztwór 10% kwasu trójchlorooctowego i 5% kwasu sulfosalicylowego
  - B - etanol : kwas octowy : woda destylowana (3 : 1: 6).
  - C - 0,5% roztwór Coomassie R-250 w układzie (etanol : woda : kwas octowy) (9 : 9: 2)
- 2 Roztwory elektrodowe: 0,25 M kwas octowy (roztwór anodowy), 0,25 M NaOH (roztwór katodowy).
- 3 12% wodny roztwór sorbitolu.

### **Przygotowanie medium agarozowego:**

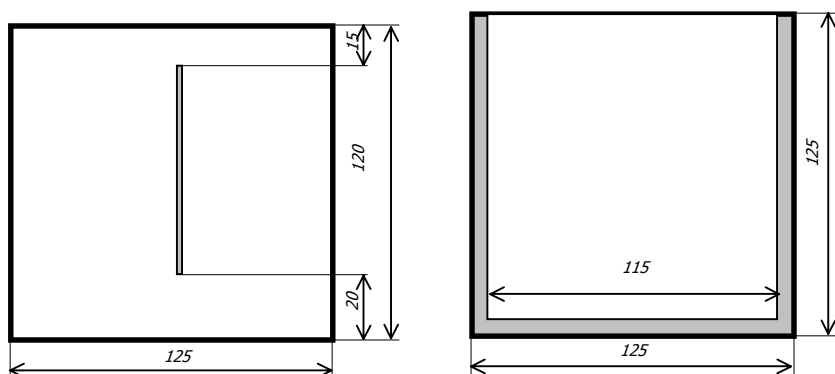
- Do 12% wodnego roztworu sorbitolu wsypać agarozę w ilości zapewniającej końcowe stężenie 0,8%.
- Poczekać aż agaroz opadnie ona na dno naczynia.
- Zawartość naczynia ogrzewać w temperaturze ok. 100°C do osiągnięcia wrzenia ciągle mieszając. Gotować 4 minuty.
- Klarowny roztwór inkubować w temperaturze około 70°C aż do momentu użycia.
- Amfolity dodać tuż przed wykonaniem płytki żelu.

### **Przygotowanie ultracienkich płytek żelu:**

#### **A. Zmontowanie kasety do uformowania żelu:**

- Kasety do wykonania płytek żelu można przygotować samodzielnie z dwóch płytek szklanych o rozmiarach 12cm x 12,5cm i 12,5cm x 12,5cm (Rys. 8.2).
- W centralnej części mniejszej płytki, równolegle do jej krótszej krawędzi, przylepić 8,5cm odcinek taśmy typu Dymo tape o grubości 0,2 – 0,25mm.

- Skalpelem przeciąć (w połowie szerokości) taśmę wzdłuż pozostawiając jeden fragment przylepiony do płytki, a drugi usunąć. Ślady kleju zmyć metanolem.
- Wypukły kształt nalepionego odcinka taśmy odwzorowany zostanie w żelu w postaci wgłębienia służącego do nanoszenia próby (tzw. aplikator próby).
- Czystą i odtłuszczoną roboczą powierzchnię płytki (z nalepioną taśmą) pokryć warstwą hydrofobową stosując gazik zwilżony **Repel Silane**. Czynność tę wykonać w rękawicach pod dygestorium. Jej celem jest zapobieżenie adhezji żelu do powierzchni szkła co gwarantuje wyjęcie żelu z kasety w stanie nienaruszonym.



**Rys. 8.2**

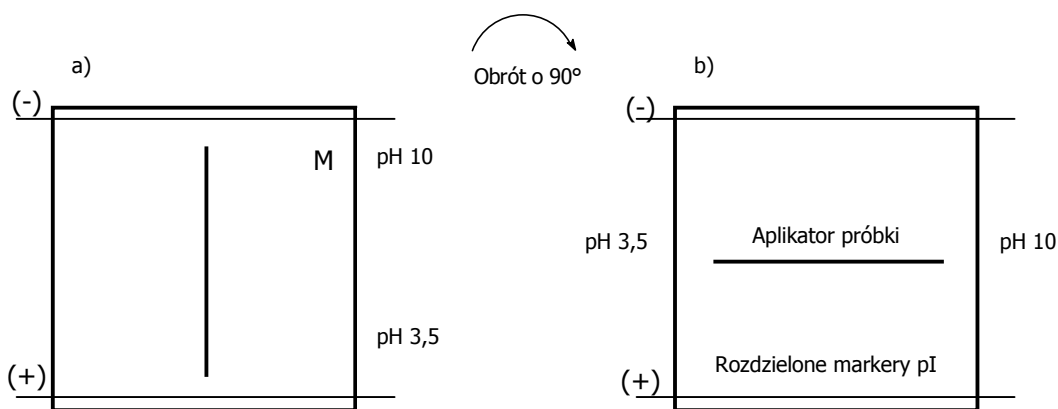
Wymiary płytek szklanych stosowanych do konstruowania kasety dla żeli do ETC.

- Na większej z płytek szklanych rozprzecznić około 1ml wody i przykryć ją odpowiednio przyciętym poliestrowym arkuszem **GelBond**, tak, aby jego strona hydrofobowa była w kontakcie z wodą.
- Górną, hydrofilową stronę **GelBond** (zazwyczaj chronioną arkuszem papieru) przykryć bibułą filtracyjną i odcisnąć nadmiar wody, powodując przylgnięcie plastiku do szkła.
- Z arkusza **GelBond**, którego grubość wynosi 0,2 mm, wyciąć parę przekładek dystansowych (*spacer'ów*) w kształcie litery „U” o zewnętrznym rozmiarze 12,5cm x 12,5cm i szerokości 5mm. Złożone i zlepione olejem silikonowym przekładki będą miały grubość 0,4mm, odpowiadającą planowanej grubości żelu separacyjnego.
- Zestawić kasetę poprzez spięcie klamrami przygotowanych płytek szklanych, roboczymi powierzchniami do środka, rozdzielonych przekładką dystansową.
- Przygotowaną kasetę ogrzewać w suszarce do temperatury około 70°C.
- Większa płytka wystaje o 0,5 cm ponad szczelinę w górnej części kasety. Przez tę szczelinę wprowadzić wcześniej przygotowane medium agarozowe.

#### **B. Wypełnienie kasety żelem:**

- Do próbki o pojemności 6 ml odmierzyć 5,7 ml gorącego medium agarozowego.
- Dodać 300μl 40% roztworu amfolitów o żądanym zakresie pH.
- Dokładnie wymieszać (końcowe stężenie amfolitów w mieszaninie wynosi 2%).
- Zdecydowanym ruchem wlać całą zawartość próbki przez szczelinę ogrzanej do 70°C kasety. Ułożyć kasetę poziomo. Odczekać aż żel stężeje.
- Żel agarozowy powinien być użyty następnego dnia. Można jednak kasetę z żelem przechowywać w lodówce, szczelnie zamkniętą w foliowym woreczku, około tygodnia.





**Rys. 8.3**

Sposób ułożenia żelu między katodą (-) i anodą (+) w pierwszym i drugim etapie procesu elektroforetycznego miareczkowania. M: elektroforetyczne standardy (markery) pI nanoszone na żel w celu zdefiniowania gradientu pH.

### **Przebieg doświadczenia:**

Miareczkowanie elektroforetyczne prowadzić w dwóch etapach: formowanie gradientu pH (pierwszy wymiar, Rys. 8.3a) i natywna elektroforeza w gradiencie pH (drugi wymiar, Rys.8.3b).

#### **A. Formowanie gradientu pH:**

- Włączyć system chłodzenia (+15°C).
- Żel wyjąć z kasety podważając i unosząc skalpelem mniejszą płytkę;
- Powierzchnię żelu dokładnie osuszyć brzegiem bibuły Whatman nr1.
- Na środek stolika chłodzącego nanieść około 1ml wody lub 0,5% wodnego roztworu glicerolu w celu zapewnienia dobrego kontaktu termicznego żelu z powierzchnią chłodzącą.
- Umieścić płytkę żelu, tak aby **GelBond** dokładnie przywierał do stolika, a aplikator próbki był prostopadły do elektrod (Rys. 3a). Nadmiar czynnika kontaktowego wysuszyć bibułą.
- Dwa paski grubej bibuły o szerokości około 7 mm (**IEF electrode strips**) przyciąć tak, aby były o około 4 mm krótsze od szerokości żelu i umieścić na płytce szklanej. Lekko nasączyć jeden z nich elektrolitem anodowym, a drugi katodowym.
- Tak przygotowane paski bibuły umieścić wzdłuż odpowiednich brzegów na żelu zwracając uwagę, aby nie wystawały poza żel.
- Ustawić elektrody na paskach bibuły zapewniając ich wzajemny kontakt.
- W prawym górnym rogu żelu, w odległości 1cm od anody, nanieść 2 µl roztworu markerów pI (bezpośrednio na żel lub na bibułę aplikacyjną).
- Na zasilaczu ustawić parametry limitujące proces:  $U_{\max}=1500\text{ V}$ ,  $I_{\max}=7\text{ mA}$ ,  $P_{\max}=7\text{ W}$  oraz parametr stały  $P = 2\text{ W} = \text{const}$ .
- Podłączyć przewody obu elektrod, zamknąć pokrywę aparatu.
- Włączyć zasilacz i obserwować żel. Na powierzchni żelu powinny pojawić się, widoczne zwłaszcza w pobliżu anody, delikatne, faliste linie gradientu. Proces można zakończyć po osiągnięciu co najmniej 1000 Vh.

### **B. Natywna elektroforeza w gradiencie pH:**

- Po wyłączeniu zasilania, otworzyć pokrywę aparatu i obrócić żel o 90° (Rys. 3b).
- Przenieść paski bibuły z elektrolitami na płytkę szklaną, a fragmenty żelu na których one spoczywały usunąć ostrym narzędziem.
- Umieścić paski bibuły z elektrolitami na żelu pod odpowiednimi elektrodami.
- W rowek aplikatora wprowadzić 40 µl badanego roztworu białek o stężeniu 5mg/ml
- Na zasilaczu ustawić stałe napięcie  $U = 600\text{ V}$  i prowadzić rozdział do osiągnięcia wartości 200 Vh (około 18 minut)

### **C. Wybarwianie elektroforegramu:**

- Natychmiast po zakończeniu procesu płytkę żelu zanurzyć w roztworze A. Powoduje to unieruchamienie białek oraz wymycie amfolitów.
- Utrwalanie prowadzi 30 – 60 minut, najlepiej ustawiając kuwetę z żelem na kołysce laboratoryjnej.
- Przemyć żel dwoma porcjami roztworu B (2 x 5 minut).
- Osuszyć żel. W tym celu ułożyć go na płytce szklanej, powierzchnię żelu przykryć kolejno odpowiednio przyciętym arkuszem bibuły Whatman nr 1, pięcioma arkuszami bibuły filtracyjnej oraz płytką szklaną, a następnie obciążyć 1 kg odważnikiem (np. litrową butlą z wodą) na około 5 minut.
- Usunąć warstwy bibuły filtracyjnej pozostawiając arkusz Whatman nr 1, wysuszyć żel gorącym powietrzem po czym usunąć bibułę.
- Zanurzyć wysuszony żel na 5 – 15 minut w roztworze barwiącym C (kołyska), po czym niezwiązany barwnik wypłukać wodą destylowaną.
- Otrzymany elektroforegram z widocznymi krzywymi miareczkowania i prążkami markerów pI suszyć na powietrzu.

### **D. Określenie gradientu pH:**

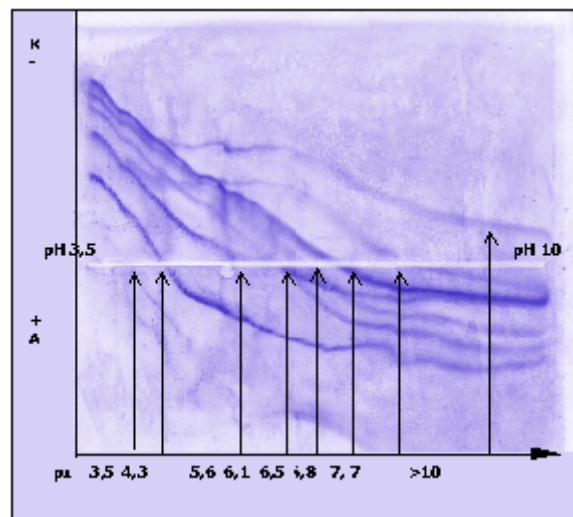
- Po zakończeniu pierwszego etapie procesu, uformowany w żelu gradient pH można określić przez bezpośredni pomiar elektrodą pH (2).
- Kalibracja żelu markerami pI umożliwia wykreślenie krzywej wzorcowej ujmującej zależność pI poszczególnych standardów elektroforetycznych od ich odległości od anody. Przez interpolację można wyznaczyć wartości pI dla badanych białek.

### **Oczekiwane wyniki:**

Krzywe miareczkowania elektroforetycznego dostarczają informacji na temat pH - zależnych właściwości białek, takich jak np.: stabilność, wzrost ruchliwości w pobliżu pI, zmiany konformacyjne lub właściwości wiązania ligandów. Metoda ta pozwala również wyznaczyć optymalne pH dla rozdziału białek w chromatografii jonowymiennej, chromatografii cieczowej lub elektroforezie preparatywnej (4, 5, 6, 7). Miareczkowanie elektroforetyczne często wykonuje się w 4% żelach poliakryloamidowych. Ponieważ amfolity mogą przeszkadzać w procesie polimeryzacji, procedura wymaga przygotowania „czystego” żelu, który suszy się i przed użyciem poddaje rehydracji w odpowiednim roztworze amfolitów (4). Znacznie wygodniejsze jest zastosowanie nośnika agarozowego, który jest nietoksyczny, łatwy do przygotowania, eliminuje efekt sita molekularnego oraz szybciej się wybarwia (8). Prezentowany elektroforegram (3) wykonany został w pracowni Dr Gabriela Peltra, l'Unité d'Immuno Allergie, Institut Pasteura, Paryż.

**Rys. 8.4**

Krzywe miareczkowania elektroforetycznego surowego preparatu  $\beta$ -1,3-glukanaz *Oerskovia xanthineolytica* wykonane w żelu agarozowym i wybarwione błękitem Coomassie R-250. Główną frakcję preparatu stanowią białka o punktach izoelektrycznych z przedziału pH 5,5 – 7. Obecne są również białka silnie kwaśne i silnie zasadowe. Zakresy pH, w których krzywe mają mocno wybarwiony i ostry rysunek wyznaczają granice obniżonej rozpuszczalności odpowiadających im białek (9), natomiast rozmyte linie sugerują obniżoną stabilność białek (5).



**Uwagi:**

- 1 Stosować odczynniki o elektroforetycznej czystości oraz wodę podwójnie destylowaną lub dejonizowaną.
- 2 Próbkę badaną powinna być klarowna (wirowanie lub filtracja) i nie zawierać soli (dializa).
- 3 Aby skrócić czas formowania gradientu pH proces można prowadzić dwustopniowo np.: najpierw przy niższej wartości mocy  $P_1 = 2\text{ W} = \text{const}$ , a następnie zwiększyć moc dwukrotnie  $P_2 = 4\text{ W} = \text{const}$ . Pojawienie się na szybko osłaniającej żel kondensatu pary wodnej sygnalizuje lokalne przegrzanie żelu w trakcie formowania gradientu. Należy wówczas zmniejszyć wartość mocy o jednostkę i kontynuować proces. Po zniknięciu kondensatu można powrócić do wyższej wartości mocy.
- 4 Jeśli elektroforezę prowadzimy równocześnie w dwóch jednakowych żelach należy zwiększyć dwukrotnie wartość mocy i odpowiednio zwiększyć limit napięcia i natężenia prądu; separację w drugim kierunku prowadzić przy napięciu  $U = \text{const}$  jak dla pojedynczego żelu.
- 5 Po wyłączeniu zasilania wszystkie operacje należy wykonać sprawnie, aby zminimalizować dyfuzję amfolitów w żelu prowadzącą do zaburzenia uformowanego gradientu pH.
- 6 Zadaniem roztworów elektrodowych jest zapobieganie procesom utleniania i redukcji jakim amfolyty i białka mogłyby ulegać na elektrodach. Wartości pH odpowiednich elektrolitów powinny być bliskie granicznym wartościom pH w pobliżu anody i katody. Wybór właściwych elektrolitów zależy głównie od gradientu pH w jakim chcemy prowadzić proces miareczkowania lub ogniskowania izoelektrycznego.

**Piśmiennictwo:**

1. Piljac V., Piljac G., Genetic Engineering. Centrifugation and Elektrophoresis, TIZ „Zrinski” - Xakovec, 1986.
2. Garfin D.E., Isoelectric focusing, Methods in Enzymology, 1990: 182; 459-477.
3. Buchowiecka A., Synteza oligosacharydów przez endo- $\beta$ -1,3-glukanazę *Oerskovia xanthineolytica*. praca doktorska, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, 1999.

4. Westermeier R., Electrophoresis in Practice, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim, 2.ed., 1997.
5. Richey J.S., Optimal pH conditions for ion exchangers on macroporous supports, Methods in Enzymology. 1984: 104; 223-233.
6. Escuredo P.R., Ayala A., Parrado J., Use of electrophoretic titration curves in the purification of a  $\beta$ -1,3-glucanase from *Oerskovia xanthineolytica*., Biotechnology Techniques. 1997: 11; 63-66.
7. Righetti, P.G., Krishnamoorthy, R., Lapoumeroulie C., Labie, D., Titration curves of polypeptide chains by combined isoelectric focusing-electrophoresis in 8M urea, J. Chromatogr. 1979: 177; 219-225.
8. Majercakova P., Kucerova Z., Desvaux F.X, Peltre G., Electrotitration curves of human gastric pepsinogens in agarose gels. Electrophoresis. 2000: 21; 2919-2924.
9. FPLC Ion Exchange and Chromatofocusing, principles and methods. Pharmacia, Laboratory Separation Division, S-751 82 Uppsala, Sweden 1985.
10. Instrukcja stosowania gotowych żeli poliakryloamidowych do IEF, Ampholine PAGplate, Precast polyacrylamide gels for analytical isoelectric focusing, Pharmacia Biotech
11. Righetti P.G., Drysdale J.W., Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Isoelectric Focusing. eds. T.S. Work, E. Work, NHPC - Amsterdam, Oxford 1976.

## Przykład 9.

### MINIATUROWA ELEKTROFOREZA DWUKIERUNKOWA (m2D) BIAŁEK Z GENERATYWNYCH CZĘŚCI ROŚLIN

Kalinowski A., Radłowski M.

Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, e-mail: [akal@igr.poznan.pl](mailto:akal@igr.poznan.pl)

#### Wprowadzenie:

Znana od 1975 metoda elektroforezy dwukierunkowej (2D) jest obecnie szeroko stosowana do analiz białek z bakterii, tkanek zwierzęcych i roślinnych (1). Części wegetatywne roślin (nasiona, siewki, liście) są łatwo dostępne i mogą dostarczyć znacznie więcej białka w porównaniu z częściami generatywnymi. Rozdziały białek metodą dwukierunkowej elektroforezy z generatywnych części roślin wymagały zatem miniaturyzacji stosowanej metody (2, 3). W badaniach roślin, szczególnie porównawczych i genetycznych, istotną część stanowią analizy izoenzymów obecnych w ich tkankach. Jednokierunkowe metody elektroforetyczne w wielu przypadkach nie dawały w pełni zadowalających wyników. Powstała więc idea opracowania metodyki zminiaturyzowanej 2D elektroforezy do rozdziałów enzymów, która dostarczałaby znacznie więcej informacji niż zwykła elektroforeza strefowa czy ogniskowanie izoelektryczne (IEF). W pracach dotyczących 2D enzymów komercyjnych (4) odwrócono przyjętą zazwyczaj kolejność rozdziałów, stosując w pierwszym kierunku elektroforezę strefową, w drugim zaś IEF. Ponieważ taka procedura nie sprawdziła się w naszych doświadczeniach powrócono do powszechnie przyjętej kolejności rozdziałów. Dane literaturowe wskazują, że część enzymów komercyjnych można renaturować po rozdziałach z SDS. W przypadku naszych badań z enzymami pyłkowymi okazało się, że po rozdziałach w warunkach denaturujących, z całej grupy badanych enzymów aktywność udało się przywrócić tylko kwaśnej fosfatazie i esterazom, co pozwoliło na oznaczenie pI oraz mas cząsteczkowych ich izoform.

#### Materialy:

- 1 Dojrzały pyłek kukurydzy - *Zea mays*.
- 2 Znamiona kostrzewy łąkowej - *Festuca pratensis*.
- 3 Pojedyncze znamiona tytoniu - *Nicotiana glauca*.
- 4 Wydzielina z pojedynczych znamion tytoniu - *Nicotiana glauca*.
- 5 Pipety Pasteura
- 6 Kapilary 60mm × 0,55 mm (białka ogólne).
- 7 Kapilary 60 mm × 1,4 mm (enzymy).

#### Aparatura:

- 1 Zasilacz **EPS 3500 XL**.
- 2 Wirówka próżniowa (Speed - Vac).
- 3 Własnej konstrukcji aparat do izoelektroogniskowania w kapilarach
- 4 Aparat do elektroforezy pionowej.
- 5 Skaner **Sharp JX-330**.
- 6 Programy komputerowe: **LabScan, Image Master 2-D Elite**.

#### Odczynniki:

##### I. Odczynniki do elektroforezy m2D białek ogólnych:

**A. Pierwszy kierunek** - IEF (kolumnienki 60mm × 0,55mm), porcje na 48 kolumnienek

- 1 100 ml wodnego roztworu akrylamid/ bisakrylamid (30g/0,8g) - 75µl.
- 2 10 g mocznika rozpuszczonego w 13 ml ciepłej wody - 300 µl.
- 3 **Amfoliny** o określonym pH - 25 µl.
- 4 TEMED - 0,5 µl.
- 5 10% nadsiarczan amonu 1 µl.
- 6 Woda 25 µl.
- 7 Bufor elektrodowy katodowy: 0,25 M NaOH - 100 ml.
- 8 Bufor elektrodowy anodowy: 0,25 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 100 ml.
- 9 Bufor ekstrakcyjny: 0,7M sacharoza, 0,5M Tris, 30 mM HCl, 50mM EDTA, 0,1 M KCl, 2 mM PMSF, 2% DTT.
- 10 Uwodniony fenol.
- 11 0,1 M octan amonu w metanolu.
- 12 Bufor rozpuszczający: 9M mocznik, 4% NP-40, 2% DTT, 2% amfoliny pH 2-4.
- 13 Bufor zmieniający pH (*ang. transfer buffer*) : 20 ml 0,5 M buforu TRIS-HCl pH 6,8; 8 ml 0,05% błękitu bromofenolowego, 40 ml 10% SDS, 72 ml wody (przechowywać w ciemnym naczyniu)

**B. Drugi kierunek:** SDS-PAGE (13% żel 140 mm×100mm×0,5mm), porcje na 3 żele:

- 1 1,5 M bufor Tris-HCl pH 8,9 - 6,60 ml.
- 2 Wodny roztwór akrylamid/ bisakrylamid (30g/0,8g) -11,00 ml.
- 3 Woda / TEMED (750ml/1ml) - 7,60 ml.
- 4 10% nadsiarczan amonu w wodzie - 0,58 ml
- 5 Bufor elektrodowy: 3 g Tris, 14,4 g glicyny, 1 g SDS - 1 litr,

**II. Odczynniki do elektroforezy m2D enzymów:**

**A. Pierwszy kierunek** - IEF (kolumnienki 60 mm × 1,4 mm), porcje na 12 kolumnienek:

- 1 100 ml wodnego roztworu akrylamid/bisakrylamid (4,75g/0,25g) - 90 µl..
- 2 Amfoliny (**Ampholine**) o określonym pH - 45 µl.
- 3 2% TEMED - 15 µl.
- 4 0,25% nadsiarczan amonu - 90 µl
- 5 Woda 375 µl
- 6 Bufor elektrodowy katodowy: 0,25 M NaOH - 100 ml.
- 7 Bufor elektrodowy anodowy: 0,25 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 100 ml.
- 8 Bufor ekstrakcyjny - 1% wodny roztwór DTT.
- 9 Bufor zmieniający pH: 20 ml 0,5 M buforu Tris-HCl pH 6,8; 8 ml 0,05% błękitu bromofenolowego, 112 ml wody. W przypadku rozdzielów w warunkach denaturujących bufor zawiera 72 ml wody i 40 ml 10% SDS (przechowywać w ciemnym naczyniu).

**B. Drugi kierunek** - PAGE ( 12% żel, 140mm×100mm×1mm), porcja na jeden żel:

- 6 1,5 M bufor Tris-HCl, pH 8,9 - 5 ml
- 7 Wodny roztwór akrylamid/ bisakrylamid (30g/0,8g) - 8 ml
- 8 Woda - 6,8 ml
- 9 10% nadsiarczan amonu - 0,1 ml
- 10 TEMED - 0,01 ml
- 11 Bufor elektrodowy: 3 g Tris, 14,4 g glicyny, 1 g SDS - 1 litr,

**Odczynniki do barwienia:**

- 1 3% kwas octowy.
- 2 Mieszanina barwiąca esterazy: 1,5 mM bufor fosforanowo-potasowy pH 6,0, zawierający w 25 ml 40,4  $\mu$ mol Fast Blue RR i 51,0  $\mu$ mol  $\alpha$ -naftylooctanu rozpuszczonego uprzednio w 1,25 ml dwumetyloformamidu.
- 3 Mieszanina barwiąca kwaśną fosfatazę: 0,2 M bufor octanowy pH 5,1, zawierający w 25 ml 47,3  $\mu$ mol  $\alpha$ -naftylofosforanu i 40,4  $\mu$ mol Fast Blue RR.

**Przygotowanie próbki:****Procedura ekstrakcji białek:****A. elektroforeza m2D białek ogólnych (5):**

- 1 Homogenizować materiał wyjściowy i ekstrahować 30 min w 4°C.
- 2 Wytrząsać ekstrakt z uwodnionym fenolem (1:1 obj.) - 10 min.
- 3 Wirować przy 5000 obr./min. - 5 min.
- 4 Zebrać fazę fenolową (pipetą Pasteura).
- 5 Powtórnie wytrząsać fazę fenolową z buforem ekstrakcyjnym (1:1 obj.) - 5 min.
- 6 Wirować przy 5000 obr./min. - 5 min.
- 7 Zebrać fazę fenolową.
- 8 Precypitować białka z fazy fenolowej 0,1 M octanem amonu (1:4 obj.) w temperaturze -20°C w czasie 24 godz.
- 9 Wirować przy 15 000 obr./min. - 3 min.
- 10 Suszyć: wirować pod próżnią (Speed-Vac) - 40 min.
- 11 Rozpuścić w buforze rozpuszczającym w temp. pokojowej (około 60 min.)

**B. elektroforeza m2-DE enzymów:**

- 12 Pylek homogenizować z 1% roztworem DTT.
- 13 Białka ekstrahować przez 15 min w 4°C i wirować przez 3 min. przy 15 000 obr./min.
- 14 Zebrać supernatant.

**Przygotowanie systemu do pracy:****Przygotowanie żeli poliakrylamidowych:**

- Odpowiednio dobraną kapilarę napełnić mieszaniną do polimeryzacji.
- Przy napełnianiu kapilar pozostawić w ich górnej i dolnej części przestrzeń na ekstrakt białkowy.
- Kapilarę z mieszaniną umieścić w gumowej podstawce.
- Po spolimeryzowaniu, przestrzeń kapilary nad żelem wypełnić wodą i przechowywać w lodówce przez noc.
- Płytę żelu poliakrylamidowego o odpowiedniej grubości przygotować w komorze ustawionej pozycji wertykalnej.
- Dno komory uszczelnić zestaloną 1,5% agarozą rozpuszczoną w 0,2 M buforze Tris-HCl pH 8,9.

**Zaprogramowanie zasilaczy:**

- Do ogniskowania izoelektrycznego białek i enzymów wykorzystać sześć stopni programu:
  - 50V - 15 min.,
  - 100V - 15 min.,
  - 150V - 15 min.,
  - 200V - 15 min.,
  - 300V - 120 min.,
  - 400V - 15 min.
- Do rozdzielów w drugim kierunku wybrać program limitujący natężenie prądu do 15 mA.

### **Przebieg doświadczenia:**

#### **A. Rozdziały białek ogólnych:**

- Przygotowaną próbkę (12:1) nanieść do kapilary do części nie wypełnionej żelem od strony anody.
- Kapilarę umieścić w jednej z uszczerek aparatu do elektroforezy rurkowej (własnej konstrukcji), tak aby kapilara jednym końcem kontaktowała się z buforem anodowym (górny pojemnik) a drugim końcem z buforem katodowym (pojemnik dolny).
- Po wypełnieniu komór buforami elektrodowymi sprawdzić, czy nie ma na końcach kapilar pęcherzy powietrza. Jeżeli są to usunąć je i podłączyć napięcie z zasilacza.
- Po zakończonym rozdziale w pierwszym kierunku żele wyjąć z kapilar przy pomocy strzykawki lekarskiej wypełnionej wodą i ułożyć je na szkiełkach mikroskopowych. Zalać buforem zmieniającym pH na czas 2 min.
- Umieścić żele pomiędzy szklanymi płytami zawierającymi żel do SDS-PAGE w miejscu gdzie zwykle nanosi się próbki. W jednej kasecie można umieścić obok siebie dwa żele 1D.
- Docisnąć żele 1D do górnej powierzchni żelu SDS-PAGE tak aby zapewnić dobry ich kontakt. Uzupełnić bufor elektrodowy (katodowy) i rozpocząć rozdział w drugim kierunku.
- Po zakończeniu rozdziału białka w żelach wybarwić azotanem srebra.
- Wybarwione żele skanować (**SHARP JX-330**) i analizować używając programów **LabScan** i **Image Master 2-D Elite**.

#### **Uwaga:**

- 1 *Detergent NP-40 znajdujący się w buforze rozpuszczającym zakłóca poprawne oznaczenie ilości białka metodą Bradforda.*
- 2 *Przygotowane kapilary z żelem poliakrylamidowym można przechowywać przez kilka dni w 4°C.*

#### **B. Rozdziały enzymów:**

- Surowy ekstrakt białka nanieść z obu stron kapilar żelu poliakryloamidowego ale bez amfolin przy końcu katodowym, a z 2% amfolinami, o zakresie pH 2-4, przy końcu anodowym.
- Kapilary z docisnąć do bibuły znajdującej się w dolnej części aparatu. Zapobiega to dyfundowaniu ekstraktu do buforu.
- Dalszy tryb postępowania oraz czas i warunki prądowe powinny być takie same jak w przypadku rozdziałów białek ogólnych.
- Po rozdziałach, białka w żelach wybarwiać na obecność odpowiednich enzymów i analizować tak samo jak peptydy wybarwiane azotanem srebra.

#### **Uwaga:**

- 3 *Bufor zmieniający pH używany do zalewania żeli 1D nie powinien w tym przypadku zawierać SDS.*
- 4 *Na podstawie wielu doświadczeń stwierdzono, że IEF prowadzony przy odwrotnie podłączonych biegunach, niż to ma miejsce podczas rozdziałów białek ogólnych daje znacznie lepsze rozdziały.*

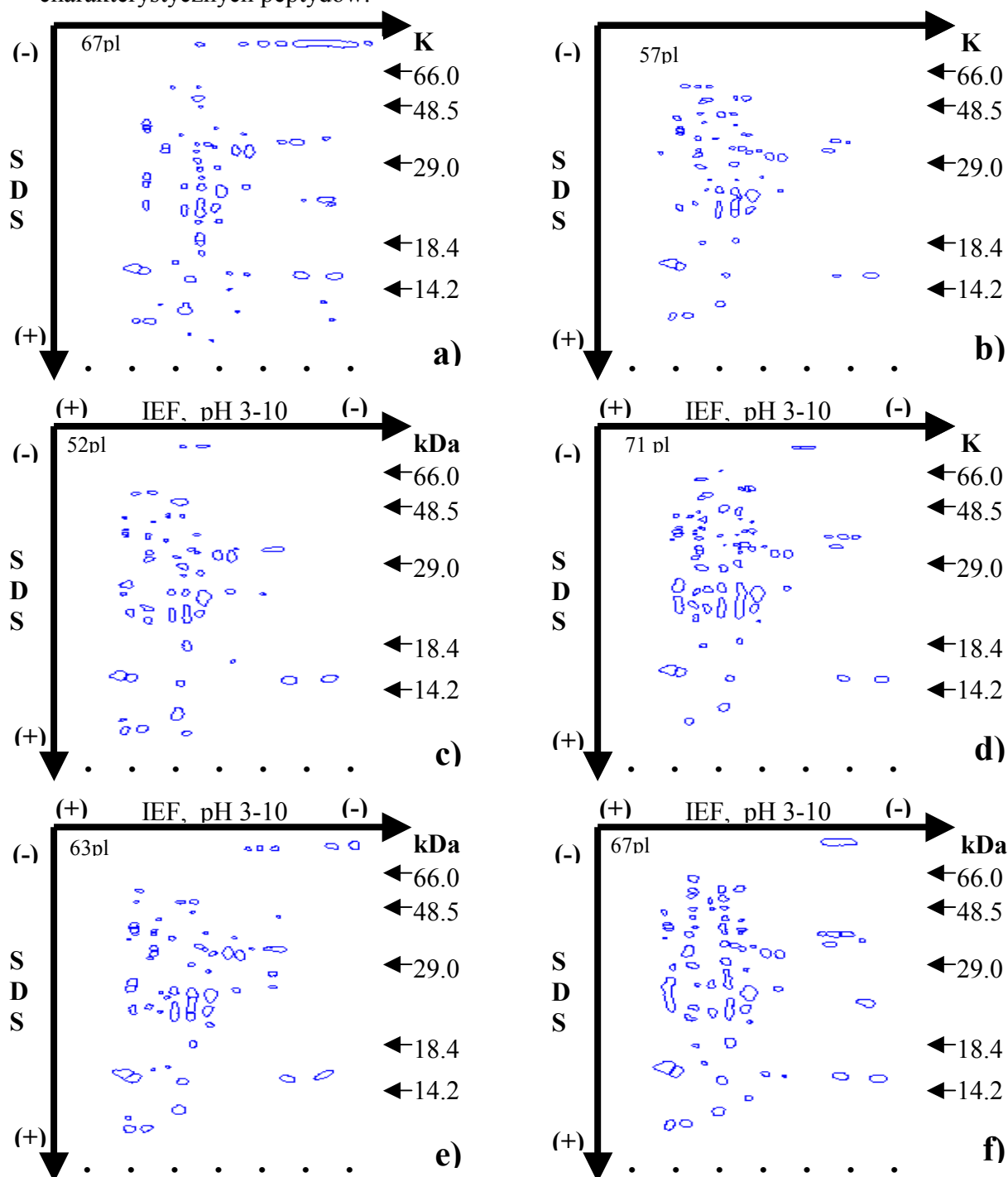
#### **Postępowanie po zakończeniu doświadczenia:**

Po sporządzeniu obrazów elektronicznych, żele można przechowywać w woreczkach polietylenowych w temp. 4°C przez kilka lat.



### Oczekiwane wyniki:

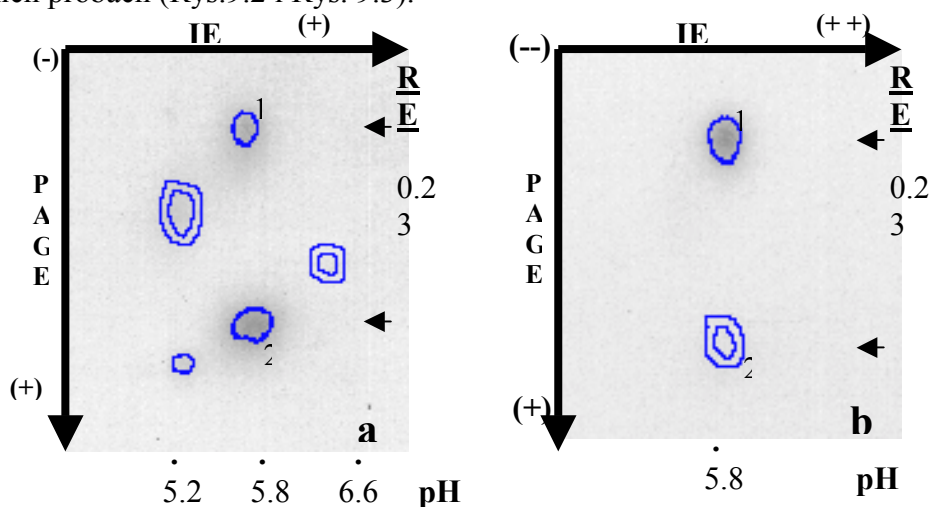
Metodę miniaturowej elektroforezy 2D zastosowano w badaniach zjawiska samoniezgodności u *N. alata* i *F. pratensis* (6, 7). Analiza peptydów z pojedynczych znamion i ich wydzieliny osobników *N. alata* wykazała wysokie zróżnicowanie ilościowe i jakościowe (Rys.9.1). Zarówno w znamionach jak i ich wydzielinach wykryto grupy charakterystycznych peptydów.



**Rys. 9.1** Białka wydzieliny - a, c, e i pojedynczych znamion - b, d, f u *N. Alata*.

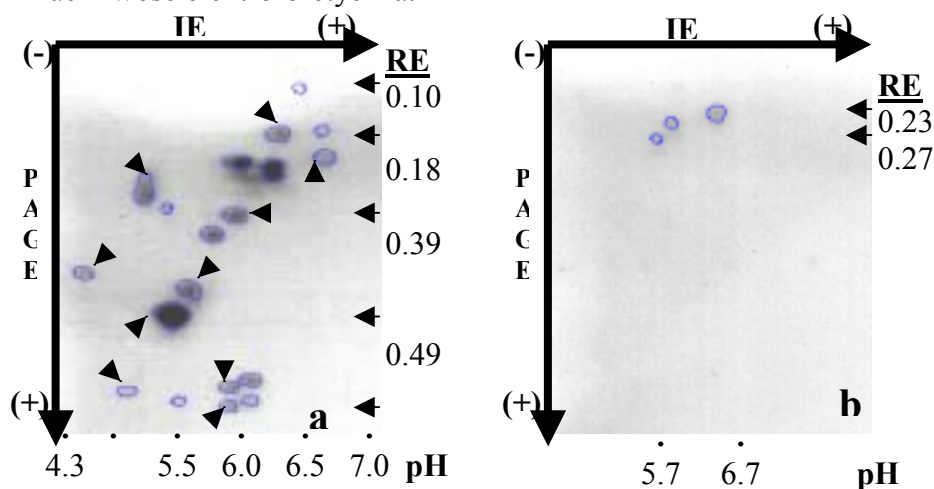
Zauważono, że znamiona i ich wydzieliny potraktowane eluatem ścian pyłku tej samej rośliny zmieniały obrazy swych białek. Polegało to na zaniku niektórych peptydów i pojawieniu się innych białek, nie wykrywanych przedtem w wydzielinie, znamionach i w samym eluacie. Podobnie doświadczenia przeprowadzone dla wyselekcjonowanych, samoniezgodnych osobników *F. pratensis* pozwoliły stwierdzić obecność pięciu peptydów, o niskich masach cząsteczkowych (od 12,5 kD do 17 kD) i różnych punktach izoelektrycznych tylko w znamionach traktowanych eluatem pyłkowym, co sugeruje ich udział w zjawisku samoniezgodności u tego gatunku.

Miniaturową 2-D elektroforezę wykorzystano również do analiz układów enzymatycznych. Kwaśna fosfataza obecna w pojedynczych znamionach *N. alata* i w ich wydzielinie okazała się monomorficzna. W wydzielinach znamion wykryto trzy monomorficzne izoformy esteraz, których obecności nie stwierdzono w znamionach. W tych ostatnich wykryto w sumie dziewiętnaście izoform esteraz, z których dziewięć obserwowano we wszystkich próbach (Rys.9.2 i Rys. 9.3).



**Rys. 9.2**

Kwaśna fosfataza znamion (a) i wydzieliny znamion (b) u *N. alata* po rozdzielach w zminiaturyzowanej 2-D elektroforezie. Podwójną linią zaznaczono enzymy o niższej aktywności. RE - ruchliwość elektroforetyczna.



**Rys. 9.3**

Esterazy znamion (a) i ich wydzieliny (b) u *N. alata* po rozdzielach w zminiaturyzowanej 2-D elektroforezie. Strzałkami zaznaczono te izoformy, które wykryto we wszystkich próbach. RE - ruchliwość elektroforetyczna.

Esterazy i kwaśną fosfatazę badano także w liściach pojedynczych siewek i pyłku trzech odmian słonecznika. Interesujące okazało się, że spośród trzydziestu czterech izoform esteraz siedem było charakterystycznych dla pyłku, dwadzieścia cztery dla liści, a tylko trzy były obecne zarówno w liściach jak i pyłku. Z dwudziestu trzech izoform kwaśnej fosfatazy pięć znaleziono tylko w pyłku, trzynaście w liściach, a pięć było wspólnych.

#### **Piśmiennictwo:**

1. O'Farrell P.H., J. Biol. Chem. 1975: 250; 4007.
2. G rg A., Postel W., Baumer M., Weiss W., Electrophoresis, 1992: 13; 192.
3. Hochstrasser D.F., Harrington M., Hochstrasser A.C., Miller M.J., Merril C.R., Anal. Biochem., 1988: 173; 424.
4. Mukasa H., Tsumori H., Takeda H., Electrophoresis, 1994: 15; 911.
5. Hurkman W.J., Tanaka Ch.K., Plant Physiol., 1986: 81; 802.
6. Kalinowski A., Radłowski M., Winiarczyk K., Borzyszkowska E., Bibliotheca Fragmenta Agronomica, 1999: 6; 23.
7. Kalinowski A., Radłowski M., Borzyszkowska E., (w druku), Postępy Nauk Rolniczych.

## Przykład 10.

### ZASTOSOWANIE ELEKTROFOREZY DWUKIERUNKOWEJ W ANALIZIE BIAŁEK KOMÓREK MDCK ZAKAŻONYCH WIRUSEM INFLUENZY KONI

Rożek W.

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach,  
e-mail: [wrozek@piwet.pulawy.pl](mailto:wrozek@piwet.pulawy.pl)

#### Wprowadzenie:

Elektroforeza dwukierunkowa (IEF/ SDS PAGE) jest jedną z najszybciej rozwijających się metod elektroforetycznych. Kombinacja technik wykorzystujących tak odmienne a równocześnie ściśle zdefiniowane kryteria rozdziału białek jak punkt izoelektryczny (pI) i masa cząsteczkowa, zapewnia wysoką rozdzielczość i powtarzalność. Stałe unowocześnianie tej metody (np. wprowadzenie standaryzowanych żeli zawierających immobilizowany gradient pH), pozwoliło na analizę bardzo złożonych mieszanin białkowych (1). Możliwe stało się rozdzielenie w pojedynczym eksperymencie nawet kilkunastu tysięcy polipeptydów zawartych w lizatach komórek eukariotycznych. Elektroforeza dwukierunkowa wraz z spektrometrią masową są podstawowymi narzędziami dynamicznie rozwijającego się kierunku badań – proteomiki. Elektroforeza dwukierunkowa umożliwia uzyskanie informacji o masie cząsteczkowej i punkcie izoelektrycznym dla wielu białek jednocześnie. W prezentowanym doświadczeniu zastosowano elektroforezę dwukierunkową do rozdzielenia białek M1 i NS1 wirusa grypy koni. W trakcie zakażenia komórek wirusem grypy dochodzi do syntezy dziesięciu białek wirusowych. Większość z nich wchodzi w skład wirionów potomnych (białka strukturalne), natomiast niektóre obecne są jedynie w zakażonych komórkach, pełniąc funkcje regulatorowe w trakcie replikacji cząstek wirusowych (białka niestrukturalne) (2). Białka niestrukturalne mogą stanowić pomocne narzędzie różnicowania zwierząt po przebyciu choroby od tych szczepionych szczepionkami inaktywowanymi. W surowicy zwierząt szczepionych przeciwko grypie wykryć można przeciwciała dla białek strukturalnych natomiast po przebyciu choroby w surowicy występują przeciwciała także dla białka NS1 (3). Opracowanie testów diagnostycznych opartych o poszczególne białka wirusowe wymaga uzyskania oczyszczonych preparatów białkowych. Elektroforeza dwukierunkowa jest przykładem techniki pomocnej w opracowywaniu strategii oczyszczania białek wirusowych syntetyzowanych w zakażonych komórkach.

#### Material:

- 1 Komórki linii ciągłej MDCK zakażone wirusem grypy koni A/equi/Kentucky 81 (A2).
- 2 Żele **Immobiline DryStrip pH 3-10 L, 11 cm**.
- 3 Bibuła **IEF ELECTRODE STRIP**.
- 4 Przeciwciała poliklonalne dla białka NS1.
- 5 Przeciwciała monoklonalne dla białka M1.
- 6 Markery mas cząsteczkowych: lizozym jaja kurzego (14,4 K), inhibitor tripsyny (21,5 K), anhidraza węglanowa (31 K), owalbumina jaja kurzego (45 K), albumina surowicy bydlęcej (66,2 K), fosforylaza B z komórek mięśniowych królika (97,4 K).
- 7 Koniugat fragmentów (Fab')<sub>2</sub> kozich IgG anty fragment Fc króliczych IgG z peroksydazą chrzanową.
- 8 Koniugat fragmentów (Fab')<sub>2</sub> króliczych IgG anty fragment Fc mysich IgG z peroksydazą chrzanową.

- 9 Membrana Immobilon P.
- 10 System detekcji western-blot **ECL Plus**.
- 11 Klisza fotograficzna **ECL Hyperfilm**.

#### **Aparatura:**

- 1 Zestaw do elektroforezy **Multiphor II**.
- 2 **Immobiline DryStrip Kit**.
- 3 Komora pionowa do elektroforezy SDS PAGE.
- 4 Zasilacz **EPS 3501 XL**.
- 5 Aparat do transferu **Semi-Dry**.
- 6 Sonifikator MSE

#### **Odczynniki:**

- 1 Bufor A: 9 M mocznik, 2% Triton X 100, 130 mM DTT, 2% ampholity pH 3-10, 8 mM PMSF.
- 2 Bufor B: 9 M mocznik, 2% Triton X 100, 0,5% ampholity pH 3-10, 13 mM DTT i oranż G.
- 3 Bufor C: 9 M mocznik, 65 mM DTT, 2% ampholity pH 3-10, błękit bromofenolowy.
- 4 Bufor D: 2% SDS, 10 mM DTT, 10% glicerol, 0,001% błękit bromofenolowy w 60 mM tris - HCl pH 6,8.
- 5 Bufor E: 92 mM tris, 25 mM glicyna.
- 6 Bufor F: 5% BSA/0,05% tween 20/ TBS pH 7,4.
- 7 Bufor G: 1% BSA/ 0,1% tween 20/ TBS pH 7,4.
- 8 Bufor H: 0,1% BSA/ 0,1% tween 20/ TBS pH 7,4.
- 9 Agaroz.
- 10 Czerń amidowa.
- 11 Metanol.
- 12 Kwas octowy

#### **Przygotowanie próbki do elektroforezy:**

- Jednowarstwową hodowlę komórek linii ciągłej MDCK zakazić wirusem grypy koni A2 w rozcieńczeniu  $10^{-1}$  (4).
- Po 24 godzinach od zakażenia komórki zdrapać do płynu i wirować przy 15 000xg w 4°C przez 30 minut.
- Komórki zebrane ze 165 cm<sup>2</sup> zawiesić w 5 ml buforu A o temperaturze 0°C.
- Tak uzyskany materiał umieścić w łaźni lodowej i poddać sonikacji stosując cztery cykle po 15 sekund w 30 sekundowych odstępach.

#### **Przygotowanie systemu do pracy:**

##### **A. Przygotowanie żeli do IEF:**

- Izoelektroogniskowanie prowadzić w żelu poliakrylamidowym o wymiarach 3 x 110 mm i grubości 0,5 mm o liniowym immobilizowanym gradiencie pH 3 -10 (**Immobiline DryStrip pH 3-10 L, 11 cm**).
- Rehydratyzować żele w czasie 12 godzin w buforze B w komorze złożonej z dwóch szyb oddzielonych 0,5 mm przekładką (**Reswelling Cassette**).
- Szybę stykającą się z żelem poliakrylamidowym uprzednio silikonować (trzykrotne naniesienie **Repel-Silane** i wysuszyć).

### **B. Przygotowanie zestawu Immobiline DryStrip Kit do elektroforezy:**

- Na stolik aparatu **Multiphor II** nanieść ok. 4 ml płynu (**Cover Fluid**) i nałożyć tacę **Immobiline DryStrip Kit**.
- Dla zapewnienia równomiernego rozkładu temperatury należy unikać pęcherzy powietrza między stolikiem aparatu i tacą.
- Na tacę wlać 10 ml płynu (**Cover Fluid**) i umieścić folię pozycjonującą żełe (**Aligner**), rowkami do góry, uważając aby płyn nie zalał powierzchni.
- W zagłębieniach folii umieścić żełe poddane uprzednio rehydratacji.
- Przygotować dwa paski bibuły **IEF Electrode Strip** o długości 11 cm. Na ułożone na szybie paski nanieść po 0,5 ml wody a następnie osuszyć bibułą filtracyjną.
- Paski bibuły nałożyć na końce umieszczonych w aparacie żeli.
- Zamontować elektrody.
- Na żelach umieścić aplikator próbek i zalać płynem (**Cover Fluid**) (ok. 80 ml). Sprawdzić szczelność umocowania aplikatora (**Cover Fluid** nie może na tym etapie wpływać do wnętrza aplikatora).
- Żele i aplikator pokryć płynem (**Cover Fluid**) (dodatkowo ok. 150 ml.).

### **C. Rozdział w drugim kierunku:**

- Przygotować żel do elektroforezy SDS PAGE o wymiarach 15 x 15 cm i grubości 1 mm. Składający się z warstwy separującej (15% żel poliarylamidowy) i zagęszczającej (4% żel preparatywny, z jednym dołkiem do naniesienia markerów mas cząsteczkowych).

### **Warunki elektroforezy IEF**

- Termostat zaprogramować na utrzymanie temperatury 20°C.
- Zasilacz zaprogramować jak niżej:
  - I faza 1 350 Vh przy napięciu 300 V;
  - II faza 5 750 Vh przy napięciu wzrastającym od 300 do 2 000 V (gradient napięcia);
  - III faza 13 000 Vh przy napięciu 2 000 V.
- Dla wszystkich faz wprowadzić limit natężenia prądu 1 mA oraz limit mocy 5W.
- Czas trwania rozdziału około 16 godzin.

### **Warunki elektroforezy SDS-PAGE**

- Elektroforezę prowadzić przy stałym natężeniu prądu 15 mA.
- Po wnikięciu barwnika w żel separujący przerwać rozdzielanie i usunąć żel w którym prowadzono rozdzielanie w pierwszym kierunku.
- Elektroforezę kontynuować do momentu dojścia barwnika do dolnej krawędzi żelu separującego.

### **Przebieg doświadczenia:**

#### **A. Separacja elektroforetyczna:**

- Zakażone komórki MDCK, po ultrasonikacji w buforze B (bufor lizujący) zmieszać w stosunku 1: 1 z buforem C.
- Tak przygotowany materiał nanieść pod warstwę płynu izolującego (**cover fluid**) pokrywającego aplikator.
- Na każdy żel nanieść po 90 ul próbki.
- Zamontować pokrywę aparatu **Multiphor II** i połączyć z zasilaczem.
- Uruchomić uprzednio przygotowany program.
- Po zakończeniu rozdzielania i odłączeniu zasilacza, zdjąć pokrywę aparatu **Multiphor II**, usunąć elektrody, bibuły IEF i aplikator.
- Paski zawierające rozdzielone białka umieścić w buforze D na okres 20 minut.
- Nadmiar buforu usunąć kładąc żełe na bibule filtracyjnej zwilżonej wodą.

- Paski umieścić na zamontowanym w kamerze żelu przygotowanym do prowadzenia rozdźwięku SDS PAGE (drugi kierunek).
- Styk żeli uszczelnić 1% agarozą w buforze elektrodowym.
- Nanieść markery mas cząsteczkowych
- Rozpocząć separację zgodnie z wyżej podanymi warunkami.

#### **B. Wizualizacja białek:**

- Przeprowadzić trzy rozdźwięki badanego materiału.
- Białka rozdzielone w pierwszym żelu barwić metodą srebrną (5).
- Pozostałe dwa żele wykorzystać do elektrotransferu rozdzielonych białek na membranę PVDF (immobilon P) stosując metodę tzw. "półsuchego" elektrotransferu.
- Transfer prowadzić w buforze E przez 90 minut przy stałym natężeniu prądu 0,8 mA/ cm<sup>2</sup> żelu, używając zestaw do półsuchego elektrotransferu **Semi-Dry**.
- Po zakończeniu transferu białka barwić na membranie przy pomocy 0,1% czerni amidowej w 10% metanolu, 2% kwasie octowym przez 10 minut.
- Membranę odbarwiać w 45% metanolu/7% kwasie octowym.
- Oznaczyć pozycje markerów i ponownie odbarwić membranę w 90% metanolu/7% kwasie octowym.
- Przeprowadzić immunodetekcję białek M1 i NS1 wirusa grypy koni A2 z zastosowaniem immunospecyficznych przeciwciał poliklonalnych. W tym celu wykonać:
- blokowanie membran – 2 godziny w buforze F,
- inkubację membran z przeciwciałami rozcieńczonymi 1/ 10 000 w buforze G – 1 godzina,
- płukanie w buforze H – 5 x 5 minut,
- inkubację z koniugatem kozich antykróliczych Fab rozcieńczonych 1/ 20 000 w buforze G – 1 godzina,
- płukanie w buforze H – 5 x 5 minut
- Lokalizację białek przeprowadzić stosując substrat luminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej **ECL + Plus**.
- Sygnał wykrywać po 1 minutowej ekspozycji na kliszy fotograficznej **ECL Hyperfilm**.

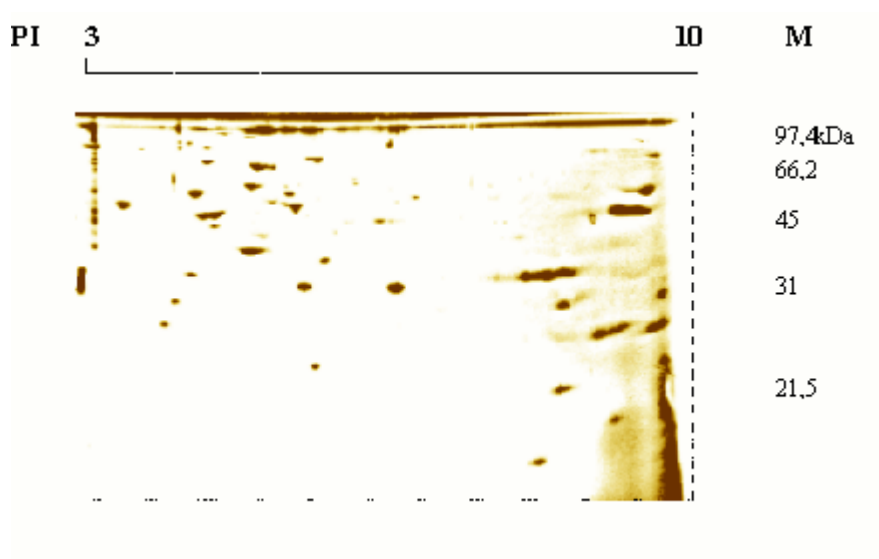
#### **Postępowanie po zakończeniu doświadczenia:**

- Części, które miały kontakt z żelami lub próbką należy umyć roztworem detergentu a następnie dobrze opłukać wodą destylowaną i osuszyć.
- Elektrody po IEF opłukać wodą destylowaną i starannie osuszyć.
- Usunąć płyn (**cover fluid**) ze stolika aparatu **Multiphor II**, sprawdzić, czy nie zostały zanieczyszczone zbiorniki na bufor elektrodowy.
- Po elektrotransferze białek opłukać elektrody aparatu **Semi - Phor** wodą destylowaną a następnie starannie osuszyć, między elektrodami umieścić kilka warstw bibuły filtracyjnej lub gąbkę.

#### **Uzyskane wyniki:**

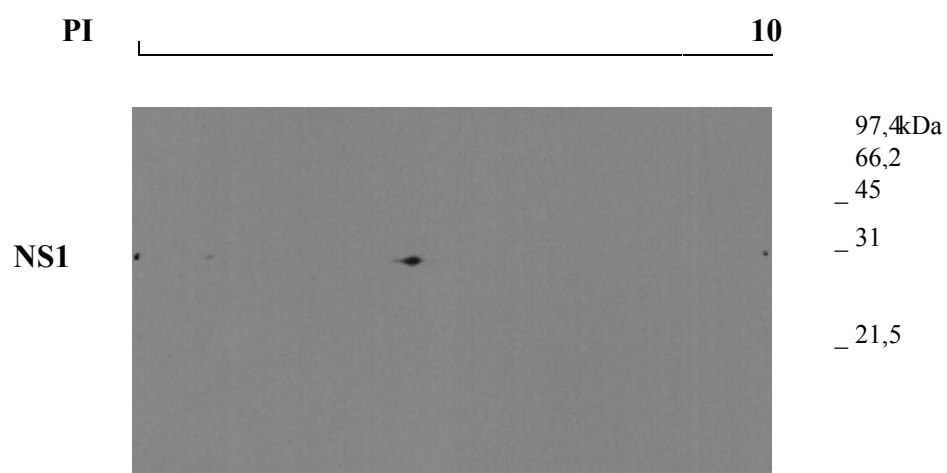
Elektroforeza dwukierunkowa (IEF/ SDS PAGE) wykorzystana do analizy białek M1 i NS1 wirusa grypy koni A/equi/Kentucky 81 pozwoliła na jednoczesne określenie punktów izoelektrycznych i mas cząsteczkowych tych białek. Białka komórek MDCK zakażonych wirusem rozdzielono w gradiencie pH 3-10 (pierwszy kierunek) a następnie w 15% żelu poliakrylamidowym. Uzyskano rozdźwięk białek w zakresie punktów izoelektrycznych pI 3-10 i mas cząsteczkowych od ok. 20 do ok.100 K (rys. 10.1). Metodą immunodetekcji z zastosowaniem przeciwciał specyficznych przeciwciał zlokalizowano w elektroforegramach białka M1 i NS1 wirusa A/equi/Kentucky 81. W obu przypadkach uzyskano wynik w postaci punktowego zaczernienia kliszy w miejscu lokalizacji białka M1

i NS1 (rys. 10.2). Punkt izoelektryczny białka M1 określono na 9,7 natomiast NS1 na 6,1. Masa cząsteczkowa obu białek była jednakowa i wynosiła ok. 30 K.



**Rys. 10.1**

Elektroforeza dwukierunkowa białek komórek MDCK zarażonych wirusem A/equi/Kentucky 81. M - zakres mas cząsteczkowych.



**Rys. 10.2**

Immunodetekcja białek  
NS1 i M1 wirusa  
A/equi/Kentucky 81





Ponieważ białka M1 i NS1 wirusa grypy koni A/equi /Kentucky 81 wykazują jednakową masę cząsteczkową, procedury ich separacji muszą uwzględniać konieczność wprowadzenia etapu opartego o inne niż masa cząsteczkowa kryterium rozdziału. Wykryto jednocześnie, że białka te znacznie różnią się wartościami pI, co może stanowić podstawę preparatywnych metod ich rozdzielania uwzględniających takie techniki jak IEF, lub chromatografia jonowymienna.

### **Piśmiennictwo**

1. Görg A., Postel W., Günther S., Weser J.; Electrophoresis 6, 599-604, 1985
2. Ward A. C., Azad A. A., Macreadie I. G.; Arch. Virol. 140, 2, 383-9, 1995
3. Birch-Machin I., Rowan A., Pick J., Mumford J., Binns M.; J. Virol. Methods 65, 2, 255-63, 1997
4. Rożek W., Żmudziński J. F.; Bull. Vet. Inst. Pulawy 39, 2, 77-84, 1995
5. Haukeshoven J., Dernik R., Radola B. J.; Ed. In: Electrophorese – Forum'86. (1986) 22-27.

## Przykład 11.

### ANALIZA PROFILU BIAŁKOWEGO KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY DWUKIERUNKOWEJ Z UŻYCIEM SYSTEMU ETTAN DALT

Pawłowska Z.

Zakład Biofizyki Medycznej i Molekularnej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź, e-mail: [pawlow@zdn.am.lodz.pl](mailto:pawlow@zdn.am.lodz.pl)

#### Wprowadzenie:

Elektroforeza dwukierunkowa (2-D), chociaż znana jest już od ponad dwudziestu lat, to po znacznej modyfikacji w stosunku do techniki odkrytej przez P.H. O'Farrell i in. (1), znajduje coraz większe zastosowanie jako jedna z podstawowych metod proteomiki. Po opisanii budowy większości genów ludzkiego genomu, proteomika nabiera szczególnego znaczenia w wykrywaniu i identyfikowaniu białek na dużą skalę. Prowadzi to do poznania genów kontrolujących wybrane procesy biologiczne, np. tych, w których biorą udział komórki śródbłonna ekspozowane na działanie czynników występujących w układzie krążenia. Zastosowanie elektroforezy dwukierunkowej pozwala na rozdzielenie białek różniących się punktem izoelektrycznym (pierwszy kierunek elektroforezy – ogniskowanie izoelektryczne, IEF) oraz masą cząsteczkową (drugi kierunek elektroforezy – SDS-PAGE). W pracy zastosowano metodę elektroforezy dwukierunkowej o wysokiej rozdzielczości używaną szeroko do analizy złożonej mieszaniny białek izolowanych z komórek i tkanek. Za pomocą elektroforezy 2-D w żelu poliakrylamidowym rozdzielono białka obecne w oczyszczonych lizatach komórek śródbłonna. Identyfikacja bardzo dużej liczby białek pozwala na wykrycie tych, których ekspresja ulega zmianie w komórkach poddanych działaniu czynników aktywujących. Do badań użyto unieśmiertelnianych komórek śródbłonna ludzkiego EA.hy 926. Białka, których ekspresja ulega zmianie mogą być następnie trawione w żelu, a uzyskane fragmenty peptydowe eluowane i analizowane za pomocą technik spektroskopii masowej.

#### Materialy

- 1 Linia komórek śródbłonna ludzkiego EA.hy 926 otrzymana w darze z Uniwersytetu w North Carolina w USA
- 2 Standardy białkowe punktu izoelektrycznego **Broad pI Kit**
- 3 Standardy elektroforetyczne mas cząsteczkowych białek (broad range: 200 K, 116.2, 97.4, 66.2, 42.7, 31, 21.5, 14.4 K)
- 4 Paski żeli z ustalonym gradientem pH **Immobiline DryStrip Gel, pH 3-10, 24 cm**
- 5 Żele poliakryloamidowe **Ettan DALT, 12,5%**
- 6 Płytki do hodowli komórkowej (Costar)

#### Aparatura

- 1 Inkubator płytek do hodowli komórkowej
- 2 System do elektroforezy dwukierunkowej **Ettan IPGphor, Ettan DALT**
- 3 System do analizy i dokumentacji żeli **ImageScanner, ImageMaster 2D Elite Software**

#### Odczynniki

- 1 Pożywki do hodowli komórkowej (GIBCO): DMEM, FBS, Bufor PUCK'a, HAT (hypoxantine, aminophterin, thymidine)
- 2 Odczynniki do przygotowania próbek: **PlusOne sample Preparation Kits (2-D Clean-Up Kit, 2-D Quant Kit, IPG Buffer)**

- 3 Odczynniki do 2-D: **Cover Fluid, Anode Buffer, Cathode Buffer**
- 4 Odczynniki do barwienia żeli elektroforetycznych: **PlusOne Coomassie Blue R-350**
- 5 Bufor do rehydratacji: 9 M mocznik, 1% CHAPS, 0,5% **IPG Buffer pH 3-10**, 0,4% DTT, 0,002% błękit bromofenolu
- 6 Bufor do równoważenia żelu IEF: 6M mocznik, 2% SDS, 1% DTT, 30% glicerol, 0,002% błękit bromofenolu, 50 mM Tris – HCl, pH 8,8.

### Przygotowanie próbki

Hodowla linii komórek śródbłónka ludzkiego:

- Unieśmiertelnione komórki śródbłónka ludzkiego hodować z użyciem pożywki DMEM z dodatkiem 10% surowicy wołowej, antybiotyku oraz HAT
- Przed eksperymentem komórki przemyć 3-krotnie buforem PBS, pH 7.4.
- Osady komórek zawiesić w buforze lizującym (8M mocznik, 4% CHAPS, 2% bufor IPG 3-10, 1% DTT)
- Oczyszczyć próbkę używając zestawu **2-D Clean-Up Kit**
- Stężenie białek w próbkach do elektroforezy dwukierunkowej oznaczyć przy użyciu zestawu **2-D Quant**.

### Przygotowanie systemu do pracy

Przygotować: żele, bufor do elektroforezy, rękawiczki gumowe, nożyczki, wodę destylowaną.

- Do pojemnika na paski IEF (**24 cm Strip Holder**) dodać 300µl buforu do rehydratacji żelu
- Próbkę z lizatem komórek śródbłónka w buforze do rehydratacji (nie więcej niż 200 µl) dodać do mieszaniny rehydratacyjnej
- Pasek do IEF wyjąć z opakowania tuż przed użyciem i zdjąć z niego folię
- Wsunąć pasek IEF, żelem do dołu, do pojemnika zawierającego mieszaninę rehydratacyjną oraz próbkę.
- Rehydratację prowadzić w systemie Ettan IPGphor przez około 12 godzin.

### Przebieg doświadczenia

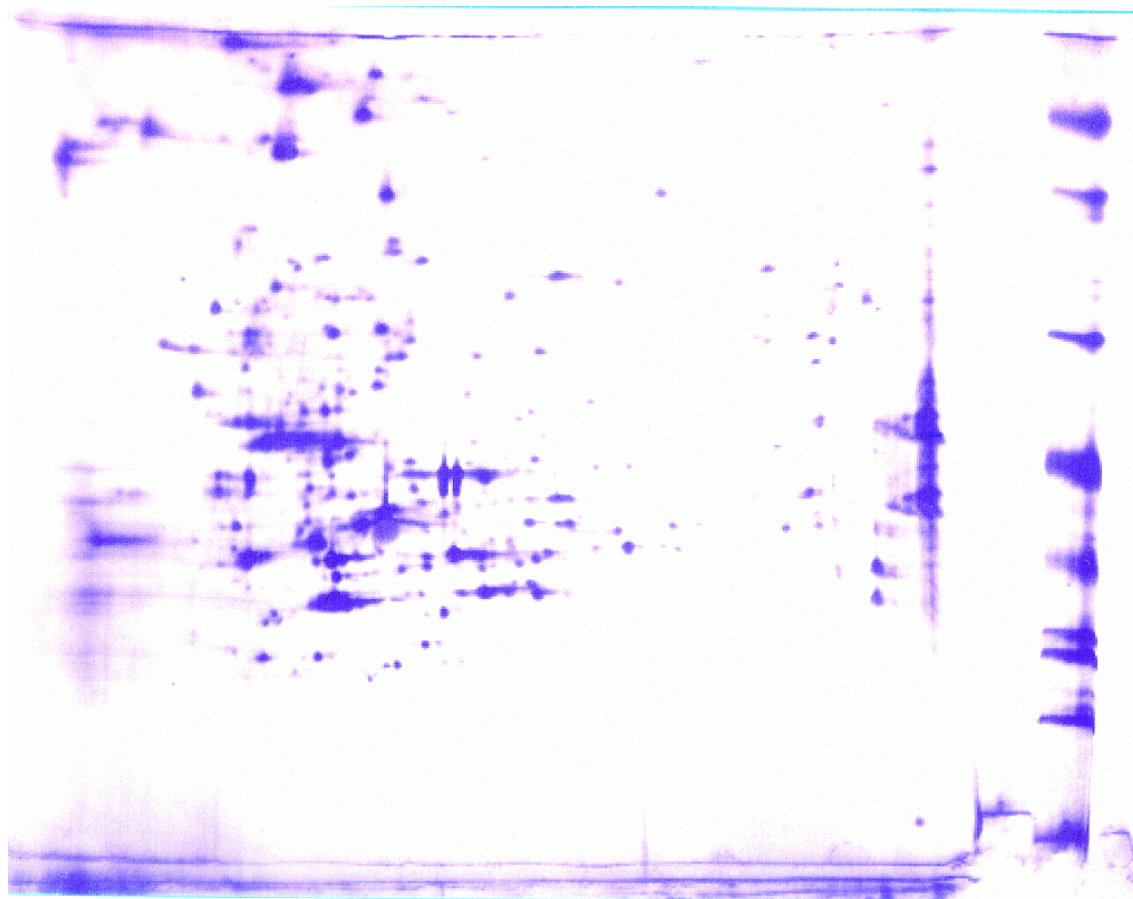
- Warunki rozdziału IEF były zgodne z instrukcją systemu **Ettan IPGphor**. Czas trwania izoogniskowania wynosił około 10 godzin.
- Po zakończeniu rozdziału IEF, paski równoważyć w czasie 15 min w buforze do równoważenia.
- Po usunięciu nadmiaru buforu z paska IEF (odsączenie na skrawku bibuły), umieścić go na górze żelu SDS-PAGE i zalać 0,5% agarozą.
- Wykonać rozdzielanie w drugim kierunku w warunkach podanych w instrukcji do systemu **Ettan DALT**. Czas rozdzielania wynosi około 5 godz. Separację przerwać gdy „front” rozdzielanych białek zbliży się do końca żelu (bufor anodowy).
- Rozdzielone białka barwić z użyciem błękitu Coomassie, a następnie odbarwiać w roztworze 40% metanolu i 10% kwasu octowego.
- Po wybarwieniu żele pozostawić na 2 godziny w 10% kwasie octowym, a następnie na 1 godzinę w 10% glicerynie.

**Uwaga!** Barwienie żeli wykonać z ciągłym delikatnym mieszaniem.

- Żele analizować za pomocą skanera **ImageScanner** oraz oprogramowania **ImageMaster 2D**.

### Oczekiwane wyniki

Przy zastosowaniu metody elektroforezy dwukierunkowej w żelach o dużym rozmiarze (26x20cm), można uzyskać efektywny rozdział białek nawet nieznacznie różniących się wartością pI oraz masą cząsteczkową. Liczba białek widocznych na żelu zależy jednak silnie od metody przygotowania próbki. Uzyskany obraz białek rozdzielonych w opisanym powyżej eksperymencie przedstawia rysunek. 11.1.



### Rys. 11.1

Rozdział białek komórek śródbłónka z użyciem elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakrylamidowym. Pierwszy kierunek wykonano na paskach IEF pH 3-10 z zastosowaniem systemu Ettan **IPGphor**. Drugi kierunek, w żelu SDS-PAGE 12,5%, wykonano z użyciem systemu Ettan **DALT**. Białka wybarwiono błękitem Coomassie. W prawej części żelu widoczne są standardy mas cząsteczkowych.

### Piśmiennictwo:

1. O'Farrell P.H., "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins" J. Biol. Chem. 1975, 250, 4007-4021.
2. Berkelman T. et al. "2D Electrophoresis. Principles and Methods" Amersham Biosciences, 1998.

## Przykład 12.

### EFEKTYWNOŚĆ TRANSFERU BIAŁEK Z ŻELU POLIAKRYLAMIDOWEGO PRZY POMOCY TECHNIKI TRANSFERU PÓLSUCHEGO

<sup>1,2</sup>Walkowiak B., <sup>3</sup> Walkowiak A.

<sup>1</sup>Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Instytutu Fizjologii i Biochemii Uniwersytetu Medycznego, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź,

e-mail: [bogdan.walkowiak@csk.am.lodz.pl](mailto:bogdan.walkowiak@csk.am.lodz.pl)

<sup>2</sup>Zakład Biofizyki Instytutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej, ul. Stefanowskiego 1/15, 90-924 Łódź,

<sup>3</sup>Pracownia Fizyki Gimnazjum nr 21 w Łodzi, ul. Balonowa 1, 94-108 Łódź

#### Wprowadzenie:

Potrzeba jednoznacznej identyfikacji makrocząsteczek rozdzielanych elektroforetycznie doprowadziła do opracowania techniki elektroforetycznego transferu tych cząsteczek z żelu na membranę. Unieruchomione na membranie białka czy fragmenty DNA wizualizowane są następnie metodami immunobarwienia lub specyficznej hybrydyzacji. Opracowano różne metody transferu. W odniesieniu do białek najbardziej popularną metodą jest transfer wykonywany w warunkach pełnego zanurzenia żelu, i przylegającej do niego membrany, w buforze do transferu. Metoda ta ma jednak szereg wad. Potrzeba tam znacznej ilości buforu, czas trwania transferu jest długi i często nie przynosi spodziewanych efektów, a rozkład gęstości płynącego prądu jest niekorzystny dla transferu. Oba ostatnie parametry, to jest czas transferu i rozkład gęstości prądu w naczyniu do transferu rzutują na efektywność metody. Przeważająca ilość ładunku elektrycznego, stanowiącego prąd jonowy w elektrolicie, omija żel z przylegającą do niego membraną. Obniża to znacznie efektywność elektroforetycznego wymywania białek z żelu. Efekt ten dotyczy szczególnie mocno dużych białek. Z drugiej strony długi czas trwania procesu przyczynia się do elucji z membrany białek, które już opuściły żel i zdołały do niej dotrzeć. Tą drogą można stracić znaczną ilość białek, które po transferze zamiast na membranie będą znajdowały się w roztworze w całej objętości buforu. W ten sposób można wyjaśnić częste, wśród osób stosujących tę metodę, narzekania na kłopoty z białkami opornymi na ich wykrywanie metodą immunoblottingu. Dotyczy to szczególnie białek o małych i średnich masach. Wad tych nie ma metoda transferu półsuchego. Ilość buforu niezbędna do wykonania transferu jest bardzo niewielka. Potrzeba tylko nasączyć kilka warstw bibuły filtracyjnej. Prąd płynie tylko w obszarze wyznaczonym kontaktem żelu z membraną i z nasączonymi buforem bibułami, co pozwala na bardzo wysoka wydajność procesu, a czas trwania transferu jest niezwykle krótki, od kilku do kilkudziesięciu minut. W porównaniu z wielu godzinami niezbędnymi w poprzedniej metodzie uzyskuje się znaczne skrócenie czasu. Co więcej, w metodzie transferu półsuchego można łatwo zapobiegać ucieczce białek z membrany. Poniższe opracowanie ukazuje zalety techniki transferu półsuchego.

#### Materialy:

- 1 Ludzkie osocze ubogopłytkowe.
- 2 Żele do elektroforezy - **PhastGel Homogenous 7.5**.
- 3 Bufory elektrodowe - **PhastGel Buffer Strips SDS**.

- 4 Aplikatory próbek - **PhastGel Sample Applicators 6x4 µl**.
- 5 Membrana do transferu **Hybond-C Pure**.
- 6 SDS, Tris-HCl, błękit bromofenylu, glicerol, glicyna, etanol, metanol, kwas octowy, kwas tróchlorooctowy, Paragon blue, **PhstGel Blue R**.
- 7 Parafilm
- 8 Worek dializacyjny d = 27 mm, MW < 12 400.

#### Aparatura:

- 1 Automatyczny system elektroforezy poziomej **PhasSystem**.
- 2 Zestaw do elektroforetycznego transferu techniką półsuchą **PhastTransfer kit**.
- 3 Spektrofotometr **GeneQuant Calculator**.
- 4 Skaner optyczny Mustek 1200 PRO.
- 5 Program komputerowy do analizy obrazu **ImageMaster VDS ver. 3.0**.

#### Odczynniki:

- 1 Bufor do próbek (4xstężony): 62,5 mM Tris, 10% gliceryna, 2% SDS, 0,0025% błękit bromofenolowy, pH 6,8.
- 2 Roztwory do barwienia:
  - P. barwnik do żeli - 0,02% **PhastGel Blue R**, 30% metanol, 10% kwas octowy.
  - Q. barwnik do membran - 0,1% Paragon blue, 30% metanol, 10% kwas octowy.
  - R. płukacz - 30% metanol, 10% kwas octowy.
  - S. Konserwant - 2,5% glicerol, 10% kwas octowy.
- 3 Bufor do transferu: 25 mM Tris, 192 mM glicyny, 20% metanol, pH 8,3

#### Przygotowanie próbek do elektroforezy:

- Ludzkie osocze ubogopłytkowe rozcieńczyć wodą destylowaną do stężenia białka 10 mg/ml.
- Stężenie białka oznaczać spektrofotometrycznie za pomocą **GeneQuant Calculator'a**.
- Przygotować szereg kolejnych rozcieńczeń (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32).
- Do 30 µl każdego z rozcieńczeń dodać po 10 µl buforu do próbek i ogrzewać przez 5 minut w temperaturze 95 °C.

#### Uwaga:

- 1 *Krew ludzka i jej pochodne preparaty stanowią potencjalnie bardzo poważne zagrożenie dla pracującego laboranta. Dlatego wszystkie czynności należy wykonywać w lateksowych rękawiczkach, stosując również ochronne okulary.*
- 2 *Do wszystkich buforów stosowano dejonizowaną wodę z systemu Milipore Milli-Q dodatkowo odpowietrzaną.*

#### Przygotowanie PhastSystemu do elektroforezy:

- Po włączeniu zasilania systemu wybrać z pamięci program przewidziany dla 7,5% żelu homogenicznego z SDS. Wprowadzić liczbę stosowanych żeli. Jeżeli program nie był wcześniej wprowadzony do pamięci, należy zastosować poniższy schemat:
 

|              |               |       |           |
|--------------|---------------|-------|-----------|
| SAMPLE APPL. | DOWN AT       | 1.2   | 0 Vh      |
| SAMPLE APPL. | UP AT         | 1.3   | 0 Vh      |
| SEP 1.1      | 250 V 10.0 mA | 3.0 W | 15°C 1 Vh |
| SEP 1.2      | 250 V 1.0 mA  | 3.0 W | 15°C 1 Vh |
| SEP 1.3      | 250 V 10.0 mA | 3.0 W | 15°C 1 Vh |
- Otworzyć komorę w której odbywa się rozdział elektroforetyczny i w miejsca kontaktu żeli z płytą termostatującą nanieść po 70 µl wody destylowanej. W przypadku

zastosowania tylko jednego żelu wodę nanieść tylko na jedno, dowolnie wybrane pole kontaktu.

- Przy pomocy nożyczek otworzyć kopertę zawierającą żel i za pomocą pęsety położyć żel na płycie termostatujucej, w zaznaczonym miejscu, tak aby pomiędzy płytą i plastikowym nośnikiem żelu nie było pęcherzy powietrza.
- Przy pomocy bibuły filtracyjnej usunąć nadmiar wody.
- Zdjąć z powierzchni żelu zabezpieczającą folię.
- Opuścić maskownicę i umocować w niej agarozowe rezerwuary buforowe (**PhastGel Buffer Strips SDS**).
- Opuścić elektrody i lekko docisnąć je do rezerwuarów buforowych, tak aby zapewnić dobry kontakt pomiędzy elektrodami i żelem, za pośrednictwem rezerwuarów buforowych.
- Na matrycę do przygotowania próbek (pozycja 6-ciu próbek) położyć kawałek Parafilmu i odcisnąć studzienki na próbki.
- Do przygotowanych studzienek nanieść po 10 µl próbek.
- Wyjąć z opakowania aplikator (**PhastGel Sample Applicators 6x4 µl**) i przyłożyć go, w pozycji prostopadłej, do przygotowanych próbek. Pozwoli to na pobranie dokładnie po 4µl każdej z próbek.
- Umieścić aplikator z próbkami w ramieniu aplikatora i zamknąć komorę.
- Uruchomić rozdział przez przyciśnięcie przycisku SEP start/stop.
- Po zakończeniu wybranego programu **PhastSystem** powiadomi o tym przy pomocy sygnału dźwiękowego.

#### Barwienie żeli:

- Po zakończeniu rozdziału żel (żełe) przenieść do naczynia służącego do automatycznego barwienia i umocować tam żel (żełe).
- Wybrać odpowiedni program barwienia z zastosowaniem Coomassie blue. Jeżeli program nie był wcześniej przygotowany, wprowadzić do pamięci następujący schemat:

| Step | Solution   | In-port | Out-port | Time | Temperature |
|------|------------|---------|----------|------|-------------|
| 1    | Stain      | 4       | 0        | 8    | 50°C        |
| 2    | Destain    | 2       | 5        | 5    | 50°C        |
| 3    | Destain    | 2       | 5        | 8    | 50°C        |
| 4    | Destain    | 2       | 5        | 10   | 50°C        |
| 5    | Preserving | 9       | 0        | 5    | 50°C        |

- Dren oznaczony numerem 0 wprowadzić do naczynia na odpady płynne. Dren oznaczony numerem 2 wprowadzić do naczynia zawierającego przygotowany roztwór płukacza (C), a dren z numerem 4 do naczynia zawierającego roztwór barwnika (A). Dren z numerem 5 wprowadzić do naczynia zbierającego użyty płukacz, a z numerem 9 do naczynia zawierającego konserwant .
- Uruchomić program, a po jego ukończeniu wyjąć żełe i wysuszyć je w strumieniu ciepłego powietrza (suszarka do rąk lub włosów).
- W przypadku żelu pozbawionego plastikowego nośnika (żel po transferze) należy zastosować te same odczynniki i ten sam schemat postępowania, wykorzystując do barwienia niewielkie naczynie szklane, np. szalkę Petriego.

#### Uwaga:

- 3 Wykorzystany płukacz można regenerować przepuszczając go przez warstwę aktywnego węgla.
- 4 Odpady płynne będące w kontakcie z żełem w trakcie barwienia i odbarwiania stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia. Mogą zawierać ślady monomerów akrylamidu -

*silnej neurotoksyny. Należy je składować i utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami.*

### **Transfer elektroforetyczny:**

- Na każdy żel przewidziany do transferu przygotować po cztery arkusze bibuły filtracyjnej i jeden arkusz membrany (**Hybond-C Pure**), o rozmiarach odpowiadających rozmiarowi żelu.
- W razie potrzeby przygotować worek dializacyjny (zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta). Odciąć odcinek worka o długości żelu i rozciąć go wzdłuż jednej z krawędzi. Nie dopuścić do wysuszenia worka.
- Arkusze bibuły i membranę zamoczyć w buforze do transferu.
- Przygotować **PhastSystem** do funkcji transferu poprzez wyjęcie zestawu elektrod metalowych i umieszczenie w tym miejscu zestawu elektrod grafitowych (**PhastTransfer kit**).
- Żel przeznaczony do transferu umocować w urządzeniu do skrawania żelu z plastikowego nośnika.
- Przy pomocy cienkiego drutu oddzielić żel od nośnika.
- Położyć na żelu arkusz namoczonej membrany, a następnie dwa arkusze namoczonej bibuły. W razie potrzeby pomiędzy bibułami i membraną umieścić przygotowany fragment worka dializacyjnego.
- Tak przygotowaną "kanapkę" przenieść na dolną elektrodę (+) i przykryć kolejnymi dwoma arkuszami namoczonej bibuły. Całość docisnąć górną elektrodą (-).
- Z pamięci **PhastSystem'u** wybrać program dla transferu. W razie braku takiego programu należy posłużyć się poniższym schematem:

|              |         |       |       |
|--------------|---------|-------|-------|
| SAMPLE APPL. | DOWN AT | 1.0   | 0 Vh  |
| SAMPLE APPL  | UP AT   | 1.0   | 0 Vh  |
| SEP 1.1      | 20 V    | 20 mA | 1.0 W |
|              |         |       | 5 Vh  |
- Po zakończeniu transferu rozmontować "kanapkę", żel, membranę i bibuły filtracyjne kontaktujące się z membraną użyć do wybarwienia w celu określenia efektywności elektroelucji z żelu i wiązania z membraną białek.

### **Uwaga:**

- 5 *Zwracać baczna uwagę aby pomiędzy warstwami bibuły, nitrocelulozy i żelu nie pozostało uwięzione powietrze. W miejscu gdzie obecne jest powietrze nie przepływa prąd i transfer nie zachodzi.*
- 6 *Wszystkie operacje z nitrocelulozą wykonywać przy użyciu pęsety*

### **Barwienie membrany i bibuły filtracyjnej:**

- Membranę poddać barwieniu zgodnie z procedurą opisaną powyżej dla żelu, z tą różnicą, że zamiast barwnika A zastosować barwnik B.
- Bibułę filtracyjną będącą w kontakcie z membraną barwić dokładnie według procedury podanej powyżej dla żelu.

### **Skanowanie żeli, membrany i bibuły filtracyjnej:**

- Wybarwione żele, membranę oraz bibułę filtracyjną skanować przy pomocy skanera optycznego o rozdzielczości nie mniejszej niż 300 dpi (Mustek 1200 PRO)

### **Analiza obrazów żeli, membrany i bibuły filtracyjnej:**

- Uzyskane obrazy żeli i nitrocelulozy poddać densytometrii i analizie przy zastosowaniu programu **ImageMaster VDS ver. 3.0**.



- Uzyskane densytogramy i wynikające z nich liczbowe wartości zaczerpień korespondujących z ilością białka we wskazanym obszarze.

#### **Postępowanie z aparaturą po zakończeniu pracy:**

- Usunąć z systemu zestaw elektrod grafitowych i ponownie umieścić tam zestaw elektrod metalowych do elektroforezy.
- Elektrody metalowe przemyć delikatnie 20% etanolem. Elektrody grafitowe przemyć wodą destylowaną i osuszyć bibułą filtracyjną.
- Przemyć przy pomocy procedury "Cleaning method" zestaw do barwienia żeli.

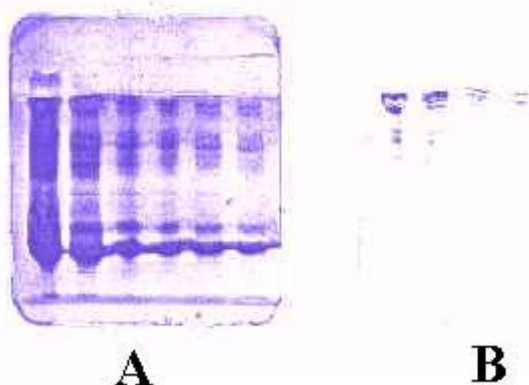
#### **Oczekiwane wyniki:**

Efektywność transferu białek rozdzielonych elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym rzutuje na czułość ich specyficznej detekcji. Efektywność ta uzależniona jest od trzech procesów a) wydajności elektroelucji białek z żelu, b) wydajności wiązania białek z membraną i c) elektroelucji białek z membrany. Jeżeli zapewnione są dobre warunki przebiegu dwóch pierwszych procesów, przy jednoczesnym ograniczeniu procesu trzeciego, to oczekujemy zadowalającego wyniku transferu. Niestety, nie każde warunki eksperymentalne gwarantują sukces. Na poniższych ilustracjach przedstawiono rezultaty pracy w dwóch różnych warunkach transferu. Wybarwiony żel i jego wybarwiony odpowiednik po procesie transferu przedstawione są na rysunku 12.1. Na podstawie przedstawionego obrazu żeli można dokonać oceny efektywności elucji białek z żelu. Okazuje się, że w czasie 10 minut transferu zdecydowana większość białek została usunięta z żelu. Pozostały tylko śladowe ilości białek o dużych masach cząsteczkowych.

**Rys. 12.1**

A - Obraz żelu po rozdzieleniu białek osocza ludzkiego i wybarwieniu przy pomocy commassie blue.

B - efekt wybarwienia analogicznego żelu poddanego uprzedniej elektroelucji białek.

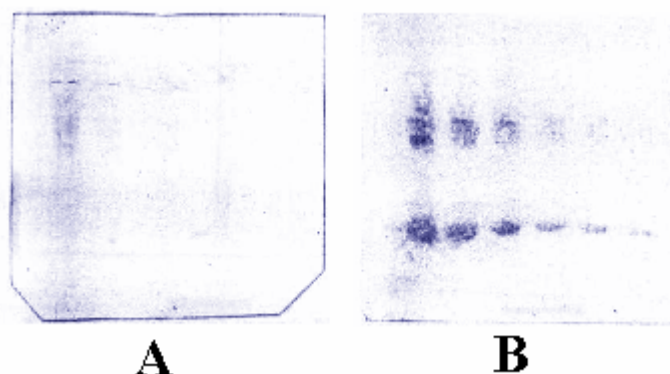


Kolejny rysunek (rys. 12.2) prezentuje wybarwioną membranę oraz bibułę filtracyjną stykającą się z tą membraną. Łatwo zauważyć, że na membranie pozostało niewiele białek. Większość z nich znalazła się w objętości bibuły filtracyjnej stanowiącej rezerwuuar buforowy od strony dodatniej elektrody.

**Rys. 12.2**

A - obraz membrany wybarwionej po transferze przy pomocy Paragon blue.

B - Obraz wybarwionej bibuły filtracyjnej służącej jako rezerwuuar buforu anodowego

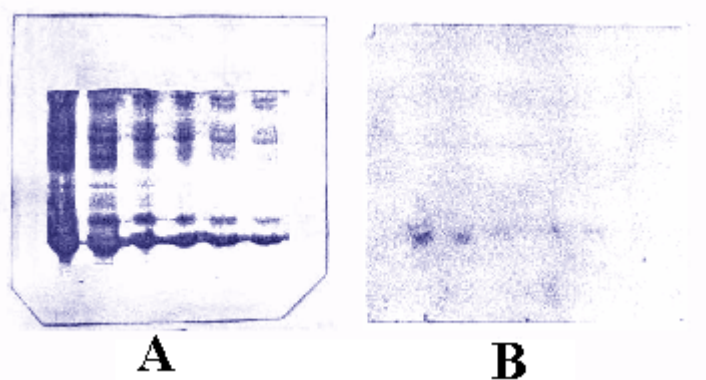


Gdyby transfer prowadzony był w tradycyjny sposób, białka te znalazłyby się w całej objętości naczynia do transferu. Warunki takie zdecydowanie obniżają czułość detekcji białek, a często wręcz ją uniemożliwiają. W kolejnej wersji doświadczenia pomiędzy membraną a bibułą filtracyjną, stanowiącą rezerwuuar buforu anodowego, umieszczono arkusz porowatego materiału, w postaci fragmentu worka dializacyjnego, przepuszczającego cząsteczki białka o masach poniżej 12 K.

**Rys. 12.3**

A - Obraz membrany, wybarwionej przy pomocy Paragon blue, po transferze w obecności worka dializacyjnego.

B - Obraz wybarwionej bibuły filtracyjnej służącej jako rezerwuuar buforu anodowego. Transfer przeprowadzono w obecności worka dializacyjnego.



Jak łatwo zauważyć (rys. 12.3) białka wymyte z żelu pozostały w obrębie membrany. Tylko bardzo niewielka ilość drobnocząsteczkowych białek znalazła się w objętości bibuły. Są to białka o masach poniżej 12 K mogące penetrować worek dializacyjny. W tych warunkach osiągnięto zarówno efektywne wymywanie białek z żelu jak i ich wiązanie do membrany, przy jednoczesnym ograniczeniu procesu wymywania białek z membrany.

#### **Piśmiennictwo:**

1. Westermeier R. Electrophoresis in practice, 2<sup>nd</sup> edition, A Wiley Company, Weinheim 1997.

### Przykład 13.

## IMMUNOBLOTTING BIAŁEK MIĘSA

<sup>1</sup>Greaser M.L., <sup>2</sup>Pospiech E., Fritz J.<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Swartz D.R.

<sup>1</sup>Muscle Biology Laboratory, University of Wisconsin-Madison, USA

<sup>2</sup>Instytut Technologii Mięsa Akademii Rolniczej w Poznaniu, e-mail: [pospiech@au.poznan.pl](mailto:pospiech@au.poznan.pl)

### Wprowadzenie:

Pełną identyfikację białek rozdzielonych za pomocą elektroforezy umożliwia technika immunobarwienia (*ang. Western immunoblotting*). Proces polega na elektroforetycznym przeniesieniu białek (*ang. electrophoretic transfer*) z żelu na membranę mogącą immobilizować przenoszone białka. Następnie odpowiednie przeciwciało rozpoznaje swój antygen, obecny na membranie i wiąże się z nim. Powstały kompleks antygen-przeciwciało wykrywany jest przy pomocy reakcji z drugim znakowanym przeciwciałem, skierowanym przeciwko pierwszemu, lub z innym znakowanym czynnikiem wiążącym pierwsze przeciwciało. Tak powstały potrójny kompleks umożliwia wizualizację dzięki wprowadzonym znacznikom, którymi mogą być fluorofory, izotopy promieniotwórcze lub enzymy katalizujące określone substraty i wytwarzające w ten sposób określoną barwę. Reakcja taka jest wysoce specyficzna dla białka będącego antygenem dla zastosowanego pierwszego przeciwciała. Przy zastosowaniu przeciwciał poliklonalnych możliwe jest również wykrywanie produktów degradacji danego białka. Przeciwciała monoklonalne, rozpoznające tylko jeden określony epitop, mogą wskazywać tylko te fragmenty degradacji, które zawierają dany epitop. Możliwość śledzenia powstawania produktów degradacji białek jest często wykorzystywana przy ocenie procesów dojrzewania produktów pochodzenia zwierzęcego, względnie przy ocenie wpływu zabiegów technologicznych na dany surowiec. Procesy te są bowiem często związane z degradacją struktur białkowych oraz białek, które tworzą te struktury.

### Material:

- 1 Rozdzielone elektroforetycznie białka pochodzące z mięśnia zwierzęcego.
- 2 Bibuła filtracyjna do transferu.
- 3 Membrana do blottingu Immobilon-P lub **Hybound-P**.
- 4 Albumina wołowa (BSA).
- 5 Substrat NBT/BCIP.
- 6 Przeciwciała: anty-titina 9D10 (supernatant komórkowy), poliklonalne anty- Tn-T, anty mysie IgG sprzężone z alkaliczną fosfatazą.

### Aparatura:

- 1 Zestaw do półsuchego transferu elektroforetycznego **TE 70 Semi-Dry Transfer Unit**,
- 2 Zasilacz prądu stałego **EPS 600**
- 3 Zestaw do archiwizacji żeli **ImageMaster VDS**.

### Odczynniki:

- 1 10 mM CAPS (3-[Cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid), pH 11,0.
- 2 10 mM  $\beta$ -merkaptotanol.
- 3 0,1% SDS.
- 4 Bufor TBS – 50 mM Tris-base, 200 mM NaCl, pH 7,5.
- 5 Bufor TBST – 50 mM Tris-base, 200 mM NaCl, 0,05% Tween 20, (pH 7,5).

6 Bufor substratowy – 0,1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5.

### **Transfer białek:**

- Przygotować membranę do blottingu o tej samej wielkości co żel.
- Przy użyciu ołówka zaznaczyć jeden róg membrany (zwykle prawy u dołu).
- Krótko przed użyciem zamoczyć membranę używając kilka mililitrów 30% metanolu.
- Wymyć metanol kilku przemyciami wody destylowanej.
- Z bibuły filtracyjnej wyciąć arkusze o tym samym rozmiarze co żel (6 sztuk na 1 żel).
- Namoczyć bibułę w kuwecie plastikowej zawierającej 10mM CAPS z 0,1% SDS i 10 mM  $\beta$ -merkaptoetanolom.
- Kuwetę z bibułami umieścić w chłodni na okres minimum 1 godziny przed transferem.
- Ułożyć po kolei: 3 bibuły, membranę, żel i następnie 3 dalsze bibuły. Tak przygotowany układ do transferu („kanapka”) umieścić na maskownicy przykrywając równomiernie jej otwór.
- Nałożyć pokrywę aparatu.
- Podłączyć zasilacz i ustawić: napięcie 20mV, prąd 40mA,
- Czas transferu białek powinien wynosić około 1 godziny.
- Po skończonym transferze „kanapkę” rozłożyć a membranę poddać dalszej obróbce.

### **Wykrywanie białka na membranie:**

- Membranę opłukać wodą destylowaną i umieścić w buforze TBST zawierającym 2% BSA.
- Inkubować przez całą noc z delikatnym mieszaniem w 4°C.
- Następnego dnia usunąć roztwór blokujący, a membranę dwukrotnie przemyć 15 ml TBST (każde mycie w czasie 5 minut).
- Po opłukaniu membranę inkubować w 10 ml przeciwciała (1:400 w buforze TBST) w temperaturze pokojowej przez 4 godziny.
- Po okresie inkubacji przeciwciała zlać do pojemnika (można je używać przez do 2 tygodni) a membranę przepłukać dwukrotnie (5 minut) w TBST
- Rozpocząć inkubację z drugim przeciwciałem (1:4000 w buforze TBST) i kontynuować przez 2 godziny (temperatura pokojowa).
- Po zakończeniu inkubacji drugie przeciwciała zlać, a membranę poddać dwukrotnej inkubacji, przez 5 minut, w TBS.
- Następnie przepłukiwać w czasie 5 minut w buforze substratowym.
- Wywołać reakcję barwną (reakcję wywołuje się w zaciemnionym pomieszczeniu) przez dodanie 10ml buforu substratowego i 0,2ml NBT/BCIP. Obserwować rozwój reakcji barwnej co 3 – 5 minut.
- Po ukazaniu się obrazu prążków membranę przemyć wodą destylowaną i osuszyć bibułą filtracyjną. Chronić przed nadmiarem światła.
- Uzyskany obraz utrwalić przy pomocy systemu do archwizacji **ImageMaster VDS**.

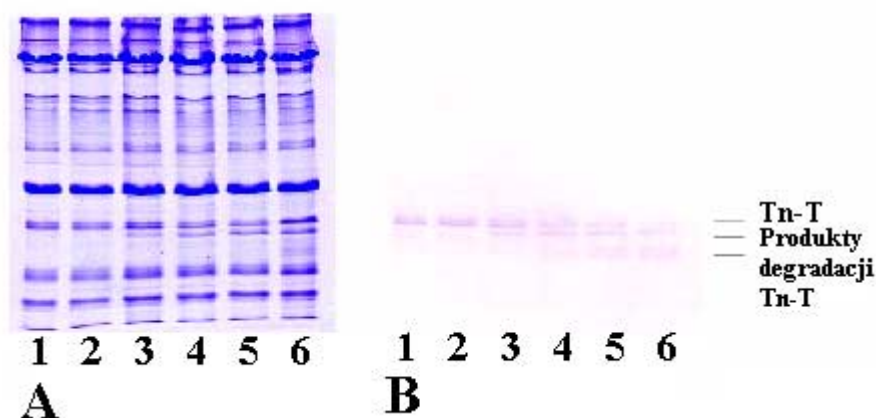
### **Uwagi:**

- 1 *Wielkość membrany powinna być podobna do rozmiaru żelu i bibuły utrzymującej bufor.*
- 2 *Przy składaniu „kanapki” nie dopuścić do powstania pęcherzyków powietrza między poszczególnymi jej warstwami.*
- 3 *Im większe białko, tym dłuższy czas transferu. Dla Tn-T wystarcza 1 godzina, 2,5 godziny jest wymagane dla nebuliny i około 3 godzin dla titiny.*
- 4 *Dodatek SDS do buforu CAPS ułatwia transfer białek, a  $\beta$ -mercaptoethanol ma za zadanie zapobiegać reakcjom utleniania grup sufhydrylowych.*
- 5 *Żel po transferze dobrze jest poddać barwieniu podobnie jak po elektroforezie. Umożliwia to sprawdzenie efektywności transferu białek.*

6 Na wszystkich etapach inkubacji i przemywań membranę wraz z płynem należy delikatnie mieszać.

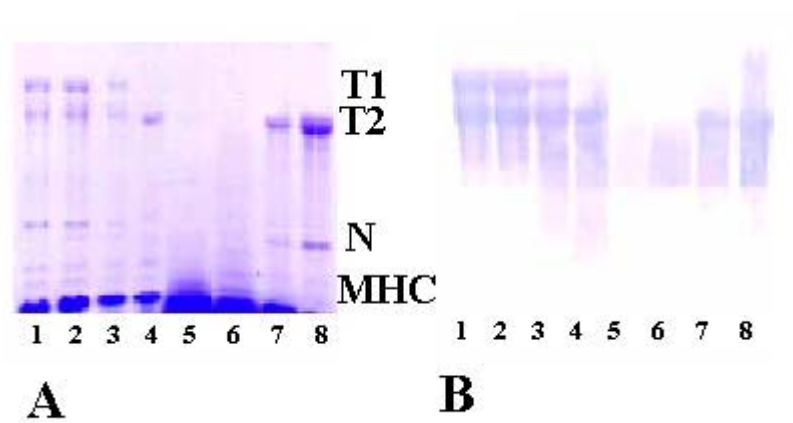
#### Oczekiwane wyniki:

Zastosowanie immunobarwienia białek przeniesionych elektroforetycznie na membranę pozwala na jednoznaczną ich identyfikację. Tylko białka i produkty ich degradacji są wtedy wybarwiane. Pozostałe białka, widoczne na wybarwionym żelu, pozostają niewidoczne na membranie, pomimo ich tam obecności. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że białka o tej samej masie cząsteczkowej mogą być różnie rozpoznawane przez wybrane przeciwciała skierowane tylko przeciwko jednemu z tych białek. Sytuację taką można zaobserwować na rysunku 13.1, gdzie na ścieżce 6 w żelu widać wyraźnie białko odpowiadające troponinie T, podczas gdy przy immunobarwieniu membrany w tym miejscu brak jest tego białka, gdyż uległo ono niemal całkowitej degradacji. Zastosowanie techniki immunobarwienia membrany pozwala na dokładną identyfikację położenia produktów degradacji badanego białka, co pozwala wystarczająco dokładnie określić dynamikę procesu degradacji. Proces transferu białek nie zależy od rodzaju żelu w którym przeprowadzono pierwotny rozdział. Obraz przedstawiony na rys. 1 pochodzi z transferu dokonanego z żelu akrylamidowego, podczas gdy obraz na rysunku 13.2 pochodzi z transferu z żelu agarozowego.



Rys. 13.1

Immunobarwienie membrany z zastosowaniem przeciwciała anty-troponina T. A - żel akrylamidowy z dodatkiem mocznika barwiony Coomassie Brilant Blue. B - immunobarwiona, z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych anty -Tn-T, membrana komplementarna do żelu. Dobrze widoczne jest przebieg procesu degradacji troponiny T.



**Rys. 13.2**

Immunoblotting titiny z mięśni świń wykonany w oparciu o transfer z żelu agarozowego. T1 – titina natywna, T2 – produkt degradacji T1, N - nebulina, MHC - ciężki łańcuch miozyny. A - żel agarozowy barwiony Coomassie Brilant Blue. B - komplementarna do żelu membrana immunobarwiona z zastosowaniem przeciwciała 9D10.

#### Przykład 14.

### ANALIZA GENETYCZNA RODZIN OBCIĄŻONYCH ZESPOŁEM MEN 2A - WYKRYWANIE GERMINALNYCH MUTACJI PROTOONKOGENU *RET* METODĄ PCR-SSCP

Bartkowiak J, Rieske P i Piaskowski S,

Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Onkologii, Akademia Medyczna w Łodzi,  
e-mail: [bartkowiak@zdn.am.lodz.pl](mailto:bartkowiak@zdn.am.lodz.pl)

#### Wprowadzenie:

Rak rdzeniasty tarczycy jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z produkujących kalcytoninę komórek C tarczycy. W około 20% przypadków rak ten jest uwarunkowany dziedzicznie (zespół MEN 2A), jego przyczyną są wtedy germinalne mutacje protoonkogenu *RET*, a więc obecne we wszystkich komórkach obciążonego organizmu. Zidentyfikowane mutacje dotyczą przede wszystkim kodonów cysteinowych w eksonach 10 (kodony 609, 611, 618 i 619) i 11 (kodon 634). Poszukiwanie mutacji u bezobjawowych pacjentów musi być oparte o szybki, wiarygodny i względnie tani test przesiewowy. Do tego celu przystosowaliśmy procedurę badania polimorfizmu strukturalnego zamplifikowanych, jednoniciowych fragmentów DNA – tj. PCR-SSCP (ang. single-strand conformation polymorphism) z zastosowaniem rozdziałów elektroforetycznych. Metoda SSCP obejmuje etap przygotowania jednoniciowych konformerów DNA (denaturacja produktów PCR w środowisku 95% formamidu w temperaturze 100<sup>0</sup> C), oraz rozdzielanie powstałych konformerów na natywnym (niedenaturującym) żelu poliakrylamidowym. W wyniku takiej denaturacji dwie komplementarne nici DNA po gwałtownym schłodzeniu nie ulegają reneturacji w strukturę dwuniciową. Mogą jednak w odpowiedniej temperaturze (2-25<sup>0</sup> C) wytwarzać wiązania wodorowe pomiędzy nukleotydami tej samej nici. W efekcie powstają 2 takiej samej długości konformery, różniące się jednak strukturą przestrzenną. Ta struktura, obok długości nici, decyduje o frakcjonowaniu fragmentów DNA w trakcie elektroforezy w niedenaturujących, wysokorozdzielczych żelach. Jeżeli produkt PCR zawiera także zmutowany materiał, to powinno się obserwować powstanie 2 dodatkowych prążków. Metoda ta może być jednak źródłem wyników fałszywie ujemnych. Wynikają one z tego, że nie każda mutacja wywołuje zmianę konformacji, lub też źle dobrane warunki rozdziału elektroforetycznego (temperatura rozdziału, warunki prądowe, usieciowanie żelu) nie powodują rozdzielania istniejących konformerów. Z tego też powodu liczba uwidacznianych w żelu prążków w rozdzielach informatywnych może odbiegać od ilości teoretycznej. Właściwe wykonanie analizy SSCP wymaga opracowania indywidualnych, optymalnych warunków przeprowadzenia procesu elektroforezy. Absolutnie kluczowe jest ustalenie i utrzymywanie odpowiedniej temperatury rozdziału. W trakcie prób trzeba niekiedy długo dostosowywać parametry prądowe, gdyż minimalne różnice ich wartości bardzo wyraźnie zmieniają ostateczny obraz elektroforetyczny frakcjonowanych próbek DNA. **PhastSystem** firmy Amersham Pharmacia Biotech stwarza możliwości szybkiej optymalizacji warunków procesu.

#### Material:

1. Próbkki produktów PCR po amplifikacji eksonu 10 lub 11 protoonkogenu *RET*\*
2. 12,5% (bezgradientowy) żel poliakrylamidowy, (**PhastGel Homogeneous 12,5**).
3. Nakładki z buforem o pH obojętnym (**PhastGel Buffer Strips – Native**).



#### 4 Dozownik próbek (**PhastGel Sample Applicator 6x 4 µl**).

\*Najważniejsze parametry reakcji PCR wykorzystanych do amplifikacji danych fragmentów eksonów 10 i 11 protoonkogenu *RET* ( wg. Komminoth P.i wsp. , 1995, Cancer, 76, 479-489) podaje poniższa tabelka:

| Ekson | Orientacja | Sekwencja stratera          | Długość produktu | Stężenie Mg <sup>2+</sup> | Temp. anneal.     |
|-------|------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|-------------------|
| 10    | Sense      | 5'CTCAGGGGGGCAGCATTGTT3'    | 132 pz           | 1,5 mM                    | 58 <sup>0</sup> C |
|       | Antisense  | 5'CACTCACCTGGATGTCTT3'      |                  |                           |                   |
| 11    | Sense      | 5'CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC3'    | 155 pz           | 2,5 mM                    | 69 <sup>0</sup> C |
|       | Antisense  | 5'TGTGGGCAAACCTTGTGGTAGCA3' |                  |                           |                   |

#### Aparatura:

1. Automatyczny system elektroforezy i barwienia **PhastSystem**

#### Odczynniki:

- 1 Bufor do denaturacji DNA, jednocześnie służący do obciążania próbek elektroforetycznych – 95% formamid w 20mM EDTA, pH 8,0.
- 2 Zestaw do wybarwiania DNA w żelach elektroforetycznych metodą srebrową (**PhastGel DNA Silver Staining Kit**).
- 3 96% etanol.

#### Przygotowanie próbek do elektroforezy:

- Na podstawie wcześniejszej elektroforezy w 2% żelu agarozowym, z wybarwianiem bromkiem etydy, ocenić jakość i stężenie próbek po reakcji PCR; próbki powinny wędrować w żelu jako pojedynczy prążek, widoczny przy naniesieniu na żel maksimum 5 µl produktu reakcji.
- Zmieszać po 5 µl produktu PCR każdej badanej próbki z równą objętością buforu do obciążania próbek elektroforetycznych.

#### Przygotowanie systemu do pracy:

- Zaprogramować działanie aparatu **PhastSystem** dla rozdziału elektroforetycznego (1 żel) produktów określonych reakcji PCR:
- Program nr 1 dla zamplifikowanego eksonu 10 protoonkogenu *RET*
  - 1.1 preelektroforeza - 400V 10mA 3,5W 4<sup>0</sup> C 100Vh
  - 1.2 aplikacja próbki - 50V 10mA 3,5W 4<sup>0</sup> C 2Vh  
(opuszczenie dozownika próbek przy 0Vh)
  - 1.3 elektroforeza - 400V 10mA 3,5W 4<sup>0</sup> C 145Vh  
(podniesienie dozownika próbek przy 2Vh)
- Program 2 dla zamplifikowanego eksonu 11 protoonkogenu *RET*
  - 2.1 preelektroforeza - 400V 5mA 3W 15<sup>0</sup> C 100Vh
  - 2.2 aplikacja próbki - 50V 5mA 3W 15<sup>0</sup> C 2Vh  
(opuszczenie dozownika próbek przy 0Vh)
  - 2.3 elektroforeza - 400V 5mA 3W 15<sup>0</sup> C 100Vh  
(podniesienie dozownika próbek przy 2Vh)
- Zgodnie z instrukcją zestawu **PhastGel DNA Silver Staining Kit** dreny odpowiednich portów aparatu zanurzyć w odpowiednich pojemnikach z roztworami.



- W celu silniejszego wybarwiania stosunkowo krótkich, jednoniciowych, fragmentów zamplifikowanego DNA do roztworu utrwalacza dodać etanolu (96%) w proporcji 55 ml etanolu i 25 ml roztworu utrwalacza.

#### **Przebieg doświadczenia:**

- Po włączeniu aparatu odczekać do uzyskania zaplanowanej temperatury w komorze elektroforetycznej.
- Umieścić żel na stoliku komory elektroforetycznej, zamocować nakładki z buforem i opuścić ramkę elektrodową.
- Uruchomić stosowny program rozdziału elektroforetycznego z uwzględnieniem ilości użytych żeli (1 lub 2).
- W trakcie preelektroforezy przygotowane próbki do elektroforezy poddać denaturacji w 100° C w ciągu 5 minut i natychmiast przenieść je do łaźni lodowej. Przy końcu preelektroforezy (osiągnięcie wartości 98Vh w etapie 1.1 lub 2.1) zatrzymać rozdziel, na dozownik (aplikator) nanieść po 3 µl poszczególnych próbek i wznowić proces elektroforezy. Nastąpi automatyczne naniesienie próbek na żel i przeprowadzony zostanie właściwy proces elektroforezy.

#### **Uwaga:**

- 1 *Próbki do elektroforezy po denaturacji termicznej i gwałtownym oziębieniu powinny być naniesione na żel w możliwie najkrótszym czasie od ich przygotowania. W razie potrzeby powtórzenia rozdziałów elektroforetycznych z tymi samymi próbkami proces denaturacji powinien być każdorazowo powtórzony.*
- 2 *Naniesienie na dozownik większych objętości próbek niż 3 µl (pomimo pojemności nominalnej równej 4 µl) powoduje zbyt wielką powierzchnię miejsca naniesienia próbki i może być przyczyną pogorszenia jakości rozdziału (szerokie prążki, smużenie się powierzchniowe)*
- Bezpośrednio po zakończonej elektroforezie żel przenieść do części aparatu służącej do barwienia. Barwienie metodą srebrową przeprowadzić zgodnie z programem nr 3.

#### **Uwaga:**

- 3 *PhastGel DNA Silver Staining Kit przechowywać w temperaturze pokojowej (~18° C); przechowywanie w lodówce przedłuża trwałość odczynników, ale niekiedy wymagają one filtrowania przed użyciem, w celu usunięcia drobnych cząstek, które wpływają na pogorszenie obrazu tła wybarwionego żelu.*
- Wybarwiony żel można sfotografować lub po wysuszeniu (suszarką do włosów lub kilka godzin na warstwie ligniny) przykryć oryginalną folią i pozostawić jako dokumentację rozdziału elektroforetycznego.

#### **Postępowanie po zakończeniu procesu elektroforezy:**

- 1 Na zakończenie przemyć dejonizowaną wodą wszystkie elementy komory elektroforetycznej, a następnie osuszyć je.
- 2 Dla jednostki aparatu przeznaczonej do barwienia żeli wykonać automatyczną procedurę czyszczenia (uruchomienie programu 9 po podłączeniu drenów dozujących do pojemnika z około 1000 ml dejonizowanej wody).

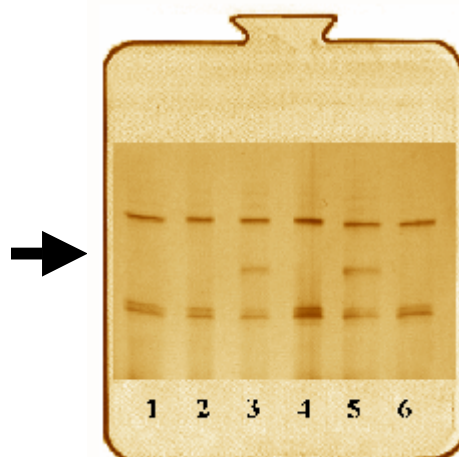
#### **Oczekiwane wyniki:**

Jednoniciowe konformery powstałe po denaturacji zamplifikowanych w reakcji PCR fragmentów protoonkogenu *RET* wykazują określoną, różną ruchliwość elektroforetyczną w niedenaturującym żelu. Dowodem na namnożenie fragmentów zmutowanego allelu (obok fragmentów prawidłowych, pochodzących w preparacie DNA z allelu nieuszkodzonego) jest ujawnienie się w obrazie elektroforetycznym dodatkowych(-ego) konformerów(-u)

o odmiennej szybkości wędrówki w żelu. Przykładem tego jest rysunek 14. 1, na którym przedstawiono wynik uzyskany dla eksonu 11 genu *RET*. Preparat analizowany na ścieżce 3 posiada dodatkowy konformer, który wydaje się być identyczny do dodatkowego konformera obserwowanego dla kontroli pozytywnej (ścieżka 5; preparat kontroli pozytywnej charakteryzuje się obecnością mutacji w kodonie 634 TGC => CGC). W innych próbkach analizowanych w pokazanym rozdziale SSCP, w tym w preparacie kontroli negatywnej (ścieżka 6), nie stwierdza się obecności dodatkowych konformerów.

**Rys. 14.1**

Przykładowy wynik analizy PCR-SSCP dla eksonu 11 protoonkogenu *RET*. Ścieżki 1-4 – próbki otrzymane dla kolejnych pacjentów poddanych analizie. Ścieżka 5 – preparat kontroli dodatniej, zawierający mutację w kodonie 634 TGC=>CGC, ścieżka 6 – kontrola negatywna. Strzałka wskazuje położenie w żelu konformera zmutowanego.



Poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR próbki 3 uzyskano potwierdzenie, że wynik badania SSCP nie jest spowodowany neutralnym polimorfizmem, a analizowany DNA rzeczywiście zawiera tranzycję T=>C w kodonie 634 eksonu 11.

W przeprowadzanych na aparacie **PhastSystem** analizach próbek pochodzących od 35 pacjentów wykryto 7 mutacji kodonu 634 w eksonie 11, z których 3 dotyczyły innych zmian punktowych niż najczęstsza mutacja dla tego kodonu TGC=>CGC. W przypadku eksonu 10 zidentyfikowano 1 mutację w kodonie 618 – TGC=>TCC. W równoległych testach SSCP metodą elektroforezy wielkopłytywowej, w analizach heterodupleksów i oznaczeniach sekwencyjnych nie stwierdzono przypadków ze zmianami mutacyjnymi, które nie zostałyby określone prezentowaną metodą na aparacie **PhastSystem**.

Jest to więc metoda pozwalająca na przesiewowe wykrywanie mutacji na nie gorszym niż inne techniki, pozwalająca wyraźnie skrócić czas optymalizacji i przeprowadzania rozdziałów elektroforetycznych, (czas pojedynczego oznaczenia nie przekraczał w naszych doświadczeniach 2,5 godziny), przy wysokiej powtarzalności uzyskiwanych wyników. Także czułość i jakość barwienia srebrnego nie budziła żadnych wątpliwości. Wszystko to umożliwia efektywne wykonywanie badań przesiewowych pod kątem identyfikacji mutacji protoonkogenu *RET*, bez potrzeby stosowania żmudnych technik wymagających użycia znakowanych izotopowo ( $^{32}\text{P}$ ) pochodnych nukleotydowych.

#### **Piśmiennictwo:**

1. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi H., Sekya T., Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1989, 86, 2766-2770.
2. Komminoth P., Kunz E., Matias-Guiu X., Hiort O., Christiansen G., Colomer A., Roth J., Heitz P., Analysis of *RET* protooncogene point mutations distinguishes heritable from nonheritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer*, 1995, 76, 479-489.
3. Hayashi K., Yandall D., How sensitive is PCR-SSCP. *Human Mutat.* 1993, 338-346.

## Przykład 15.

### DIAGNOSTYKA WIRUSA CHOROBY PĘCHERZYKOWEJ ŚWIŃ (SVD)

Niedbalski W., Kęsy A.

Zakład Pruszczycy, Państwowy Instytut Weterynaryjny, ul. Wodna 7, 98-220 Zduńska Wola,  
[piwzp@invarnet.inwar.com.pl](mailto:piwzp@invarnet.inwar.com.pl)

#### Wprowadzenie:

Obserwowany w ostatnich latach ogromny postęp w biologii molekularnej stworzył możliwość opracowania wysoce czułych i swoistych metod diagnostycznych. Pierwsze badania w kraju i na świecie nad zastosowaniem metody amplifikacji cDNA *in vitro* do wykrywania, identyfikacji oraz różnicowania wirusa choroby pęcherzykowej świń (Swine Vesicular Disease – SVD) przeprowadzono w Zakładzie Pruszczycy Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Zduńskiej Woli. Początkowo dotyczyły one zastosowania techniki PCR do wykrywania wirusowego materiału genetycznego w zakażonej pierwotnej hodowli komórek nerki świńskiej i linii IBRS-2. Następnie metodę zaadaptowano do badania materiałów biologicznych. Jednocześnie wprowadzono istotne modyfikacje metody izolacji RNA oraz technik jego powielania (RT-PCR i RT-nPCR), których celem było zwiększenie czułości reakcji oraz uproszczenie i przyspieszenie wykonania badania. Zastosowanie automatycznego systemu elektroforezy (**PhastSystem**) do elektroforetycznego rozdzielania produktów RT-PCR znacznie przyspieszyło oraz ułatwiło wykonanie badania.

#### Materialy:

- 1 Szczepy wirusowe. W badaniach użyto następujące szczepy wirusa choroby pęcherzykowej świń: polski –SVDPL/73, włoski – ITL/2/73 oraz holenderski – NET/3/92.
- 2 Zestaw do szybkiej izolacji RNA: Rneasy kit (Qiagen).
- 3 Komórki linii IB-RS-2.
- 4 Startery dla fragmentu genomu wirusa SVD kodującego białko kapsydowe VP1 i niestrukturalne 2A (starter o orientacji 3'-5', SVDV1B, 3374-3398, CCACACACAGTTTGCCAGTC oraz starter o orientacji 5'-3', SVDV1A, 2704-2724, CGACAACTTCGCCTACTGGGT).
- 5 Zestaw do reakcji RT-PCR **Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads**.
- 6 Żel poliakrylamidowy **PhastGel Homogenous 12,5**.
- 7 Stripsy agarozowe **PhastGel Native Buffer Strips**.
- 8 Wzorzec masy molekularnej (Promega) o wielkości fragmentów: 1000, 750, 500, 300, 150 i 50 pz.

#### Aparatura:

- 1 Spektrofotometryczny kalkulator RNA/DNA **GeneQuant Calculator**.
- 2 Termocykler Mastercycler personal
- 3 Automatyczny system do elektroforezy **PhastSystem**.
- 4 System dokumentacji i analizy żeli – Imagistore 5000, z oprogramowaniem GelBase/GelBlot ProPc.

### Odczynniki:

- 1 Płyn wzrastowy Eagle'a pH 7,4 z surowicą płodową (10%) i antybiotykami.
- 2 Bufor denaturujący: 0,05% cyjanoksylen, 0,05% błękit bromofenolowy, 10mM EDTA i 2% glicerol.
- 3 20% TCA (kwas trójchlorooctowy).
- 4 50% etanol i 10% kwas octowy lodowaty.
- 5 10% etanol i 5% kwas octowy.
- 6 8,3% glutaraldehyd.
- 7 0,5% azotan srebra.
- 8 2,5% węglan sodowy.
- 9 5% kwas octowy.
- 10 10% kwas octowy i 12,5% glicerol.

### Namnażanie wirusów:

- Wirusy namnażać w hodowli komórek linii IB-RS-2.
- Po ok. 20 godz. od zakażenia, gdy efekt cytopatyczny (CPE) osiągnął ponad 80%, zebrać supernatant zawierający wirusa i odwirować przy 3000xg przez 20 minut w temperaturze pokojowej.
- Określić miano infekcyjne wirusów w supernatancie. W zależności od szczepu powinno wynosić od  $10^{6,5}$  do  $10^{7,8}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

### Przygotowanie próbki do elektroforezy:

- Przy pomocy spektrometru RNA/DNA **GeneQuant Calculator** określić stężenie i czystość całkowitego RNA wyizolowanego z próbki materiału biologicznego.
- Rozcieńczyć RNA do stężenia ok. 0,5-1 µg/ml stosując wodą destylowaną zawierającą 50 jednostek inhibitora Rnazy.
- Próbkę RNA użyć w reakcji RT-PCR.

### Przygotowanie systemu elektroforezy do pracy:

- Zaprogramowano parametry pracy systemu do elektroforezy:

|                   |       |       |                  |
|-------------------|-------|-------|------------------|
| Sample App. Down: | 1.2   | 0000  | Vh               |
| Sample App. Up:   | 1.3   | 0002  | Vh               |
| Alarm at:         | 1.1   | 190   | Vh               |
| Sep. 1.1          | 400 V | 10 mA | 2.5 W 4°C 200 Vh |
| Sep. 1.2          | 400 V | 1 mA  | 2.5 W 4°C 002 Vh |
| Sep. 1.3          | 400 V | 10 mA | 2.5 W 4°C 100 Vh |
- Wyczyścić 70% etanolem przedział do rozdzielu elektroforetycznego.
- Umieścić dreny urządzenia do barwienia, odbarwiania i utrwalania żeli w naczyniach z odpowiednimi odczynnikami.

### Przebieg doświadczenia:

- RNA izolować przy pomocy zestawu Rneasy kit (Qiagen), zgodnie z metodyką zalecaną przez producenta.
- Reakcję RT-PCR wykonać w jednej próbówce **zestawem Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads**. Do dostarczonego przez producenta odczynnika dodawać jako matrycę RNA (ok. 1 µg), 1 µl (10 pM) startera 1B, uzupełnić H<sub>2</sub>O-DEPC do objętości 33 µl i inkubować w temperaturze 37°C przez 1 godzinę.

- Następnie do mieszaniny dodać po 1  $\mu$ l (10 pM) każdego ze starterów, 1  $\mu$ l (2 jednostki) Taq polimerazy, uzupełnić H<sub>2</sub>O-DEPC do objętości 100  $\mu$ l i amplifikowano w termocyklerze według parametrów:
  - wstępna denaturacja - 3 min. 94°C;
  - denaturacja – 30 sec 94°C;
  - wiązanie starterów – 45 sec 55°C;
  - wydłużanie łańcucha (elongacja) – 1 min. 72°C;
  - Trzy ostatnie etapy amplifikacji powtarzać przez 30 cykli.
  - Po ostatnim cyklu wykonać dodatkową elongację przez 5 min. w temp. 72°C.
  - Produkty RT-PCR rozdzielać elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym (PAGE).
  - Do 5  $\mu$ l produktu RT-PCR dodać 1  $\mu$ l buforu denaturującego;
  - Przy pomocy aplikatora nanieść 1 $\mu$ l mieszaniny na żel umiejscowiony w komorze rozdziału **PhastSystem'u**.
  - Elektroforezę prowadzić zgodnie z przedstawionymi powyżej warunkami.
- Po zakończeniu rozdziału żełe barwić standardową metodą srebrną, zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta (Nota No. 210).

#### Oczekiwane wyniki:

Produkty amplifikacji cDNA wirusa SVD przedstawia rysunek 15.1. Zastosowanie pary starterów SVD1A i SVD1B pozwoliło powielić fragment materiału genetycznego badanych szczepów wirusa SVD o długości 620 bp kodujący białko kapsydowe VP1 i odcinek początkowy białka niestrukturalnego 2A.

**Rys. 15.1**

Analiza elektroforetyczna produktów RT-PCR wirusa choroby pęcherzykowej świń (SVD) z zastosowaniem **PhastSystem'u**.

- 1 - kontrola ujemna – woda;
- 2 - produkty amplifikacji pary starterów VDV1A i SVDV1B - SVDPL/73;
- 3 - ITL/2/73
- 4 - NET/3/92;
- 5 - wzorce mas molekularnych.



## Przykład 16.

### ELEKTROFORETYCZNE OCZYSZCZANIE BIAŁEK Z NADEKSPRESJI W KOMÓRKACH *E. COLI*

<sup>1,2</sup>Szalata M., <sup>1,2</sup>Kalak R., <sup>1,2</sup>Lipiński D., <sup>2</sup>Pławski A., <sup>1,2</sup>Słomski R.

<sup>1</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, e-mail: [slomski@au.poznan.pl](mailto:slomski@au.poznan.pl)

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

## Wprowadzenie

Najlepszą metodą oceny homogenności preparatów białkowych jest elektroforeza w żelach poliakrylamidowych z SDS. Większość publikacji dotyczących oczyszczania rekombinowanych białek zamieszcza wynik rozdziału elektroforetycznego z uzyskaną czystą frakcją białka. Obecność dodatkowego intensywnego prążka o oczekiwanej wielkości wśród wszystkich białek bakteryjnych w układach nadekspresyjnych stanowi potwierdzenie udanej nadekspresji. Przeprowadzając elektroforezę można ocenić zarówno wielkość badanego białka, jak i określić jego czystość. Częsteczki migrują w polu elektrycznym z różną szybkością zależną od wielkości cząsteczki oraz jej ładunku, wprost proporcjonalnie do natężenia pola elektrycznego, a odwrotnie proporcjonalnie do masy. Obecność dodecylsulfianu sodu (SDS), który nadaje cząsteczkom ładunek ujemny, niszczy jednocześnie strukturę IV rzędową białek, umożliwia precyzyjne określenie wielkości białek. W takich warunkach można wykryć, że badana cząsteczka ma budowę podjednostkową oraz z jakiej wielkości podjednostek składa się. Obecność tylko jednego prążka o oczekiwanej wielkości po barwieniu błękitem brylantowym Coomassiego potwierdza czystość uzyskanego preparatu, bardzo często sięga się w tym celu do bardziej czułej metody barwienia srebrem. Oczyszczanie białek uzyskanych z transformowanych komórek jest niezbędne dla ich pełnej charakterystyki i stosowane jest powszechnie w wielu laboratoriach. Rekombinowane białka otrzymywane w układach bakteryjnych lub eukariotycznych mogą być wydzielane na zewnątrz, co jest najbardziej pożądane. Mogą też wiązać się z błonami, tworzyć białka wewnątrzkomórkowe lub ciała inkluzyjne. Bardzo często rekombinowane białka powstają w formie nieaktywnej. Nadekspresja białek w układach eukariotycznych zapewnia prawidłowe modyfikacje potranslacyjne. Oczyszczanie rekombinowanych białek jest ułatwione przez nadekspresję białka w zwiększonych ilościach, a także przez możliwość wprowadzenia znacznika ułatwiającego izolację białka. Tworzenie białek fuzyjnych w nadekspresji pozwala na lepsze oczyszczenie białka. Ponadto fragment fuzyjny zwiększa stabilność, przyspiesza izolację z kultur komórek pro- i eukariotycznych, często w procesie jednoetapowym, oraz pozwala wykorzystywać białko przez przemysł biotechnologiczny w masowej produkcji enzymów lub wysokooczyszczonych środków farmaceutycznych. Białka fuzyjne powstają poprzez dołączenie do sekwencji DNA kodującej określone białko sekwencji kodującej część fuzyjną. Najczęściej na końcu C białka wprowadza się poliargininę, polihistydynę, białko A czy transferazę glutationu (GST). Do oczyszczania wykorzystuje się chromatografię jonowymienną z ligandem poli(Arg), chromatografię immunopowinowactwa (ang. *immunoaffinity*), gdzie ligandem są przeciwciała IgG oraz chromatografię powinowactwa (ligandem jest np. glutation). Bardzo szeroko stosowane jest oczyszczanie białek zawierających dodatkowo wprowadzone reszty histydynowe, cysteinowe lub tryptofanowe (grupy muszą być usytuowane na zewnątrz cząsteczki) na kolumnach

IMAC, powinowactwa z immobilizowanymi (chelatującymi) metalami (ang. *immobilized metal affinity chromatography*). Najczęściej wykorzystywane są jony miedzi, niklu, cynku, kobaltu, wapnia czy magnezu. Dodatkowe fragmenty mogą być łatwo usunięte przez trawienie enzymami proteolitycznymi, np. karboksypeptydazą B. Często wprowadza się pomiędzy białko i część znakującą dodatkowe sekwencje rozpoznawane przez specyficzne proteazy (trombina, czynnik Xa, enterokinaza). Prawidłowy przebieg odcinania jest monitorowany elektroforetycznie, ponieważ krótsze białko migruje szybciej.

### Material

- 1 Złoże powinowactwa, Talon (Clontech)
- 2 Hodowla bakterii *E. coli* z nadekspresją białka FeldI.
- 3 Pusta kolumna **K9/15**
- 4 Probówki
- 5 Standardy wielkości białek MW, 2,512; 6,214; 8,159; 14,404; 16,949 K.
- 6 Bibuła Whatman 3 MM.
- 7 Celofan

### Aparatura

- 1 Wirówka Sorvall
- 2 Wirówka Eppendorf z chłodzeniem
- 3 Ręczny homogenizator (wychłodzony)
- 4 Kołyska
- 5 Aparat do elektroforezy pionowej **Hoefer Mighty Small SE 250**.
- 6 Zasilacz do elektroforezy **Electrophoresis Power Supply EPS600**.
- 7 Aparat do barwienia żeli **Hoefer Automated Gel Stainer**.
- 8 Podświetlarka do żeli.
- 9 Aparat do suszenia żeli.

### Odczynniki

- 1 Bufor do przemywania (50 mM bufor fosforanowy, 300 mM NaCl, 8 M mocznik, pH 7,0)
- 2 Bufory do elucji o obniżającym się pH (50 mM bufor fosforanowy, 300 mM NaCl, 8 M mocznik, pH 6,0, 5,0 i pH 4,0)
- 3 Bufor do próbek.
- 4 Bufor do żelu rozdzielającego (4x): 1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8.
- 5 Bufor do górnego żelu zagęszczającego (4x): 0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 6,8.
- 6 Bufor elektrodowy z SDS (10x): 30,3 g Tris, 10 g SDS, 144 g glicyna, H<sub>2</sub>O do 1000 ml.
- 7 10% nadsiarczan amonu (APS)
- 8 TEMED
- 9 Bufor obciążający do próbek (1x): 6,8 ml 4x Tris-HCl, pH 6,8, 4 ml 10% SDS, 2 ml glicerol, 0,2 ml 2-merkaptoetanol, 0,2 mg błękit bromofenolowy, H<sub>2</sub>O do 10 ml.
- 10 Błękit brylantowy Coomassie: 0,25 g błękit brylantowy Coomassie, 400 ml metanol, 70 ml kwas octowy, H<sub>2</sub>O do 1000 ml. Barwnik można stosować kilkakrotnie.
- 11 Odbarwiacz: 100 ml metanol, 80 ml kwas octowy, 620 ml H<sub>2</sub>O.

### Przebieg doświadczenia

Procedura dotyczy oczyszczania białek z polihistydyną (6x His). Całą procedurę należy wykonywać w temp. 4°C, przy użyciu wychłodzonych odczynników i sprzętu. Oczyszczanie przeprowadzać w warunkach denaturujących (w każdym buforze znajduje się 8 M mocznik). Poprawność analizy jest sprawdzana poprzez elektroforezę białek.

## Oczyszczanie białka

- 30 ml hodowli bakteryjnej wirować w wirówce Sorvall, 3500 rpm, 30 min., w 4°C. Usunąć supernatant, osad rozpuścić w 1 ml zimnego buforu do przemywania, krótko homogenizować.
- Próbę odwirować w wirówce Eppendorf z chłodzeniem, 12000x g, 20 min., 4°C. Ostrożnie przenieść klarowny supernatant do czystej probówki. Zostawić małą porcję do elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, resztę wykorzystać do oczyszczania na kolumnie powinowactwa metali.
- Delikatnie wymieszać zawartość buteleczki z Talonem i pobrać 0,5 ml do 15-ml probówki. Odwirować bufor, w którym przechowywano złożę w wirówce Sorvall, 700xg, 2 min., 4°C. Ostrożnie usunąć bufor znad żelu.
- Przemyć złożę 10 ml buforu do przemywania, tego samego, w którym przygotowano białka (10-20 objętości pobranego złoża) poprzez delikatne wytrząsanie.

### Uwaga:

*1 Nie wytrząsać na worteksie, ponieważ prowadzi to do nieodwracalnych uszkodzeń struktury złoża!*

- Odwirować bufor 700x g, 2 min., 4°C. Po usunięciu buforu złożę jest gotowe do użycia.
- Próbę puli białek wprowadzić do probówki ze złożem Talon. Delikatnie wytrząsać na kołysce w temp. 4°C przez 16 godz.
- Odwirować supernatant 700x g, 5 min. i przechowywać do elektroforezy z SDS, jako frakcję nie związaną z kolumną. Przy prawidłowo dobranych warunkach frakcja ta powinna różnić się od nakładanej brakiem białek zawierających łańcuch polihistydynowy.
- Dodać 1 ml buforu do przemywania i przenieść złożę do kolumnienki grawitacyjnej.
- Przemywać kolumnę 10-20 objętościami kolumny buforu do przemywania
- Przygotować ponumerowane probówki, do których będą zbierane kolejne frakcje. Probówki umieścić na lodzie.
- Wymywać białka kolumny buforami do elucji stosując kolejno po 5 objętości kolumny bufor o pH: 6,0, następnie 5,0 i na końcu dla całkowitego wymycia białka związanego z kolumną bufor o pH 4,0. Zamiast szeregu buforów o obniżającym się pH można dodać do buforu do przemywania 150 mM imidazol, jeśli nie będzie przeszkadzał przy wykorzystaniu oczyszczonego białka.
- Zbierać frakcje 0,5-1,0 ml. Jeśli elektroforeza nie będzie przeprowadzona natychmiast po oczyszczeniu zebrane frakcje zamrozić.

## Przygotowanie żeli

- Przemyć płyty do elektroforezy alkoholem, złożyć w aparacie do wylewania żeli. Włożyć przekładkę, zaznaczyć miejsce, od którego będzie zaczynał się żel rozdzielający (minimum 0,5 cm poniżej grzebienia).
- Przygotować 17% żel rozdzielający (standardowym żelem jest żel 12%), wlać do zaznaczonego miejsca.

Wykorzystywać zawsze świeżo zrobioną porcję nadsiarczanu amonu, albo przechowywać 10% roztwór w -20°C. Żel rozdzielający (ang. *resolving gel*), pH 8,8, 17%

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Akryloamid/bisakryloamid 30% | 5,67 ml |
| Tris-HCl/SDS pH 8,8 (4x)     | 2,5 ml  |
| H <sub>2</sub> O             | 1,83 ml |
| TEMED                        | 14 µl   |
| 10% APS                      | 50 µl   |
| Razem                        | 10 ml   |



- Powierzchnię pokryć niewielką objętością destylowanej wody lub izobutanolu, co tworzy gładką powierzchnię żelu i zabezpiecza przed jego wysychaniem.
- Po polimeryzacji żelu dolnego (lekko przechylić płytki, powinna odsłonić gładką, sztywną powierzchnię żelu), usunąć wodę, delikatnie osuszyć powierzchnię żelu bibułą.
- Przygotować żel zagęszczający, napełnić płytę i włożyć grzebień. Żel zagęszczający (ang. *stacking gel*), 4%, pH 6,8

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Akryloamid/bisakryloamid 30% | 0,67 ml |
| Tris-HCl/SDS pH 6,8 (4x)     | 1,25 ml |
| H <sub>2</sub> O             | 3 ml    |
| TEMED                        | 10 µl   |
| 10% APS                      | 25 µl   |
| Razem                        | 5 ml    |

- Unikać wprowadzania pęcherzyków powietrza między grzebień a żel. Grzebień nakładać z ukosa, usuwając ewentualne pęcherze powietrza. Po polimeryzacji żelu przez ok. 3 godz. (minimum 90 min., w wielu przypadkach zaleca się polimeryzację przez noc) płytki są gotowe do elektroforezy.
- Przesmarować gumowe uszczelki smarem dostarczonym wraz z aparatem dla zapewnienia szczelności systemu. Płytki umieścić w aparacie do elektroforezy. Wprowadzić do komory 1x stężony bufor do elektroforezy. Przepłukać kieszonki żelu buforem do elektroforezy.

### Przygotowanie próbek do elektroforezy

- Pobrać po 10 µl z kolejnych frakcji do oznaczonych probówek.
- Dodać 10 µl buforu do próbek.
- Denaturować 5 min. w 95°C.

### Elektroforeza

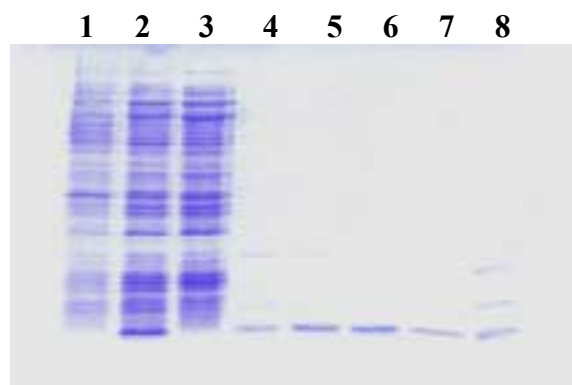
- Nakładać 15-20 µl do kieszonek żelu (objętość próby w kieszonce zależy od grzebienia, nie wypełniać kieszonek po same brzegi, aby uniknąć przelania się prób do sąsiednich kieszonek). Zaleca się pozostawić nie zajęte kieszonki zewnętrzne.
- Dodać do osobnej kieszonki marker wielkości białek.
- Przystąpić natychmiast do elektroforezy, zapobiegając niespecyficznnej dyfuzji prób. Nałożyć górną pokrywę aparatu do elektroforezy, podłączyć elektrody. W żelu zagęszczającym prowadzić elektroforezę przy natężeniu 10 mA/płytę (gdy są obie płyty 20 mA). Po wnikięciu prób do żelu rozwijającego, zwiększyć natężenie do 20 mA/płytę. Monitorować napięcie, nie może ono przekraczać w większości przypadków 200 V, niezależnie od wykorzystywania aparatów do elektroforezy z chłodzeniem lub bez chłodzenia.
- Elektroforezę przerwać w momencie, gdy błękit bromofenolowy z buforu do próbek zacznie migrować z żelu. Aparat rozłożyć, płytki ostrożnie rozdzielić, można zaznaczyć prawy górny róg żelu lekkim wycięciem, a także delikatnie odciąć żel zagęszczający, zawierający kieszonki, wykorzystując przekładkę lub drugą płytkę. Nie wykorzystywać żadnych ostrych narzędzi, ponieważ mogą powodować rysy przeszkadzające w elektroforezie.

### Barwienie białek

- Przygotować pojemniki z określoną objętością Coomassie, wody destylowanej i odbarwiacza. Żel ostrożnie umieścić w aparacie do barwienia żeli. Barwić białka delikatnie wytrząsając 1 godz.
- Usunąć barwnik, przepłukać żel wodą destylowaną (1 min.). Odbarwiać w roztworze do odbarwiania, zmieniając porcje co 10 min., aż do uzyskania czystego tła (ok. 0,5 godz.).

### Oczekiwane wyniki

Na obrazie elektroforetycznym powinien być widoczny w ekstrakcie wyjściowym białek bakteryjnych gruby prążek białka podlegającego nadekspresji, co świadczy o powodzeniu nadekspresji. W kontroli bakterii nie posiadających wektora, oczekiwane białko jest nieobecne. We frakcjach, które nie związały się z kolumną powinowactwa i we frakcjach z przemywania powinno brakować prążka białka fuzyjnego. W kolejnych frakcjach zebranych podczas elucji można zaobserwować czyste białko. Obraz obserwować na podświetlarce, zrobić zdjęcie lub utrwalić obraz kamerą. Żel umieścić na wilgotnej bibule, nakryć mokrym celofanem. Suszyć 1 godzinę w 80°C.



**Rys. 16.1.**

Elektroforeza w 17% żelu poliakryloamidowym z SDS łańcucha 1 białka FeldI, oczyszczonego na kolumnie powinowactwa (Talon) w warunkach denaturujących. Tor 1, kontrolny szczep bakterii (kontrola negatywna); tor 2, klon bakterii (numer 11), transfekowany konstrukcją genową zawierającą gen łańcucha 1 białka FeldI; tor 3, białka nie związane ze złożem; tory 4-7, oczyszczone frakcje łańcucha 1 białka FeldI; tor 8, marker wielkości białka (8,159; 14,404; 16,949 Da).

### Piśmiennictwo

1. Enfords SO. Control in vivo proteolysis in production of recombinant proteins. Trends in Biotechnol. 10, 310-315 (1992).
2. Kamp RM, Choli-Papadopoulou T, Wittmann-Liebold B (EDS.) Protein structure analysis. Preparation, Characterization and Microsequencing. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1-316 (1997).
3. Marston FAO. The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in E. coli. Biochemical J. 240, 1-12 (1986).
4. Marston FLA, Angal S, Lowe PA, Chan M, Hill CR. Scale-up of the recovery and reactivation of recombinant proteins. Biochem Soc Trans. 16, 112-115 (1988).
5. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature. 258, 598-599 (1975).

## Przykład 17.

### FRAKCJONOWANIE W ŻELU POLIAKRYLOAMIDOWYM I DETEKcja FLUORESCENCJI FRAGMENTÓW DNA ZAWIERAJĄCYCH POWTÓRZENIA MINISATELITARNE

<sup>1,2,3</sup>Słomski R., <sup>1</sup>Kowalska K., <sup>1</sup>Słomska K., <sup>4</sup>Jura J., <sup>2,3</sup> Szalata M.

<sup>1</sup>Laboratorium Genetyki Molekularnej, Szeherezady 100, 60-195 Poznań,

<sup>2</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, e-mail: [slomski@au.poznan.pl](mailto:slomski@au.poznan.pl),

<sup>3</sup>Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, <sup>4</sup>Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków, e-mail: [joljura@mol.uj.edu.pl](mailto:joljura@mol.uj.edu.pl)

## Wprowadzenie

Genomy Eukaryota zawierają 20-30% sekwencji powtórzonych, które warunkują polimorfizm DNA. Sekwencje powtórzone zalicza się do dwóch grup: grupa I obejmuje sekwencje tworzące duże tandemowe bloki, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie, natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe tandemowe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie. Do grupy I sekwencji powtórzonych należy satelitarny DNA, który zaobserwowano jako pasmo towarzyszące głównej frakcji genomowego DNA organizmów eukariotycznych. W 1985 roku Jeffreys doniósł o występowaniu II grupy polimorficznych sekwencji DNA, które w odróżnieniu od sekwencji satelitarnych nazwano sekwencjami minisatelitarnymi. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych stopniem powtarzalności, długością jednostki powtórzonej, są bardziej rozproszone w genomie chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych, szczególnie w chromosomach człowieka. Analiza sekwencji minisatelitarnych znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą *DNA fingerprinting* jest obecnie szeroko stosowana w badaniach pokrewieństwa. Funkcja biologiczna minisatelitarnego DNA nie została jeszcze wyjaśniona, niemniej sekwencje zlokalizowane są w miejscach chromosomów, które są odpowiedzialne za tworzenie homologicznych par chromosomów i ich ewentualną rekombinację. Klasyfikacja sekwencji powtórzonych uwzględnia wielkość jednostki powtórzonej oraz częstość i miejsce występowania w chromosomie. Interesującą grupę powtórzeń stanowią sekwencje mikrosatelitarne, które podobnie jak sekwencje minisatelitarne należą do grupy II sekwencji powtórzonych. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują krótkie powtórzenia tandemowe (STR), których badania są obecnie najbardziej rozpowszechnione. Do badań sekwencji minisatelitarnych stosuje się analizę restrykcyjną i hybrydyzację z sondami molekularnymi lub amplifikację metodą PCR.

## Material

- 1 DNA człowieka wyizolowany z krwi obwodowej, o stężeniu 50 ng/μl.
- 2 Startery: D1S80F Cy5-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G  
D1S80R GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC
- 3 Standard elektroforetyczny 50-500 pz (Amersham Pharmacia Biotech).
- 4 Standardy wewnętrzne 114 i 256 pz (własne).
- 5 Probówki 200 μl.
- 6 Ręczniki papierowe dobrej jakości (miękkie i nie zostawiającym "kłaczków")

## Aparatura

- 1 Termocykler.
- 2 Mikrowirówka.
- 3 Zestaw do elektroforezy ALFExpress.

## Odczynniki

- 1 Polimeraza DNA do PCR (Amersham Pharmacia Biotech).
- 2 Trifosforany dezoksynukleotydów do PCR (Amersham Pharmacia Biotech).
- 3 Bufor do PCR (Amersham Pharmacia Biotech).
- 4 Bufor 10x TBE (1M Tris, 0,83 M kwas borowy, 10 mM EDTA).
- 5 Mieszanina ReadyMix Gel do przygotowania żelu poliakryloamidowego.
- 6 10% nadsiarczan amonu (APS).
- 7 10% SDS.
- 8 Bufor obciążający (20% glikol etylenowy, 30% formamid, 0,5% błękit dekstranu).
- 9 Etanol
- 10 Bind-silan
- 11 10% kwas octowy

## Przygotowanie próbek do elektroforezy

### A. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR

| Składnik          | Stężenie wyjściowe | Ilość     | Objętość na 1 próbkę (μl) |
|-------------------|--------------------|-----------|---------------------------|
| DNA               | 5 ng/μl            | 25 ng     | 5                         |
| D1S80F-Cy5        | 50 pm/μl           | 15 pmoli  | 0,3                       |
| D1S80R            | 10 pm/μl           | 15 pmoli  | 1,5                       |
| dNTP              | 5 mM               | 7,5 nmoli | 1,5                       |
| MgCl <sub>2</sub> | 25 mM              | 30 nmoli  | 1,2                       |
| Bufor             | 10x                | 1x        | 2                         |
| H <sub>2</sub> O  |                    | 8,2 μl    | 8,2                       |
| Polimeraza Taq    | 5 jedn./μl         | 1 jedn.   | 0,2                       |
|                   |                    | Razem     | 20                        |

### B. Warunki reakcji PCR

| Etap                | Temperatura (°C) | Czas (sek.)   |
|---------------------|------------------|---------------|
| Denaturacja wstępna | 94               | 420           |
| Denaturacja         | 94               | 60            |
| Wiązanie starterów  | 65               | 60            |
| Synteza             | 72               | 60            |
| Synteza końcowa     | 72               | 600           |
| Przechowywanie      | 4                | Do wyłączenia |
| Liczba cykli        | 30               |               |

Wielkość fragmentów:  $115+14+(n-1)16+32$  pz, gdzie n - liczba powtórzeń

- C. 1 μl produktu PCR mieszać z 1 μl standardu wewnętrznego i 5 μl buforu obciążającego. Denaturować mieszaninę w temp. 95°C przez 3 min. i przenieść na лёd.

## **Przygotowanie kasety do rozdzielu elektroforetycznego na zestawie ALFExpress**

### **Mycie wstępne płyt do sekwencjonownia**

- Usunąć stary żel plastikową łopatką.
- Umyć płytę szczoteczką i 10% SDS.
- Przemyć płytę bieżącą wodą o temp. nie przekraczającej 40°C.
- Przemyć płytę wodą specjalnie oczyszczoną (typu MiliQ).
- Osuszyć płytę, umyć grzebień i przekładki.
- Ocenić wzrokowo umycie, w razie potrzeby powtórzyć punkty 2-5.

### **Mycie specjalne płyt do sekwencjonownia na zestawie ALFExpress**

- Umyć płytę etanolem i wytrzeć ręcznikiem papierowym.
- Nałożyć 100 µl Bind-silanu 2 cm od góry termopłyty i 5 cm od góry płyty szklanej (2 ml etanolu, 7,5 ml Bind-silanu, 0,5 ml 10% kwasu octowego).
- Przecierać termopłytę ręcznikiem 2 cm od góry i płytę 5 cm od góry szklanej.
- Przemyć powierzchnię pokrytą Bind-silanem wodą specjalnie oczyszczoną i osuszyć ręcznikiem.
- Umyć płytę etanolem do miejsc pokrytych silanem.

### **Składanie kasety**

- Ułożyć przekładki na termopłytcie.
- Nałożyć płytę, nakładać najpierw dolną część płyty.
- Założyć zaciski.
- Włożyć grzebień.
- Przesunąć grzebień w kierunku lasera.

### **Przygotowanie żelu**

- Przygotować bufor 10x TBE

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Tris                   | 121,14 g |
| Kwas borowy            | 51,32 g  |
| EDTA(Na <sub>2</sub> ) | 3,72 g   |

Uzupełnić specjalnie oczyszczoną wodą do 1 l, ustalić pH na 8,3, przesączyć przez filtr 0,45 µm. Przygotować 1 ml 10% nadsiarczany amonu (APS)
- ReadyMix Gel zawiera wszystkie składniki dla przygotowania 6% żelu poliakryloamidowego poza APS. Jedno opakowanie wystarcza dla przygotowania 1 dużego i 1 małego żelu o grubości 0,5 mm lub 2 dużych żeli o grubości 0,3 mm. Dodać do żelu 450 µl APS, dokładnie wymieszać przez 30 sek. W ciągu 5 min. wylać żel do kasety (w pozycji horyzontalnej).
- Można również przygotować własny roztwór akryloamidu/bisakryloamidu w stosunku 19:1 (20%) w wodzie. Odważyć 95 g akryloamidu i 5 g bisakryloamidu i rozpuścić w 500 ml wody. Przesączyć przez filtr 0,45 µm. Przygotować 6% żel poliakryloamidowy, w nawiasach podano wartości dla małej kasety:

|                                    |        |          |
|------------------------------------|--------|----------|
| Roztwór akryloamidu/bisakryloamidu | 24 ml  | (12 ml)  |
| Mocznik                            | 33,6 g | (16,8 g) |
| 10x TBE                            | 4,8 ml | (2,4 ml) |
| Woda                               | 80 ml  | (40 ml)  |
- Przesączyć mieszaninę przez filtr 0,22 µm. Dodać 70 (35) µl TEMED i 280 (140) µl 10% siarczany amonu. Dobrze wymieszać. Wylać żel jak powyżej.

### **Wylewanie żelu**

- Wylewać żel do rowka w dolnej części kasety, przesuując naczynie z żelem wzdłuż rowka. Usunąć ewentualne pęcherze powietrza. Dzięki siłom kapilarnym kaseta wypełni się żelem dlatego nie trzeba zmieniać położenia kasety podczas wylewania żelu.
- Pozostawić kasę na 90 min. do pełnej polimeryzacji żelu. Polimeryzacja powinna rozpocząć się po 10-15 min.

### **Przygotowanie do rozdziału**

- Dokładnie oczyścić tylną ścianę kasety w części przylegającej do detektorów.
- Umieścić kasę w zestawie **ALFExpress**, nie zamykać pokrywy.
- Przyłączyć obieg wody.
- Włączyć zestaw **ALFExpress** do prądu.
- Włączyć komputer i uruchomić program **ALF Manager**.
- Utworzyć nowy dokument, nadać nazwę, wybrać opcję klony lub tory w notatkach.
- Wpisać parametry rozdziału, 1500 V, 60 mA, 25 W, 55°C, odczyt 2 sek., czas rozdziału do 600 min., liczba klonów 10 (lub 40 torów)
- Otworzyć kontrolę użytkownika (manual control)
- Zamknąć pokrywę i otworzyć po 10 sek.
- Sprawdzić wartość lasera (powinna wynosić 500-800)
- Sprawdzić czy w linii detektorów nie występuje fluorescencja, w razie potrzeby podnieść lub opuścić płytę. Zwrócić uwagę na wypoziomowanie kasety.
- Wypełnić górne i dolne naczynie buforem o stężeniu takim samym jak w żelu.
- Odczekać aż żel osiągnie temp. 55°C.
- Wyjąć grzebień i przepłukać kieszonki strzykawką.
- Nałożyć próbki (5-10 µl). Bufor obciążający nie może zawierać barwników fluorescencyjnych.
- Sprawdzić laser.
- Podłączyć elektrody.
- Uruchomić zestaw (Start).

### **Zakończenie rozdziału**

- Zakończyć rozdział automatycznie lub komendą Stop.
- Przeprowadzić analizę wyników.
- Otworzyć pokrywę aparatu.
- Odłączyć elektrody.
- Wyjąć kasę.
- Wylać bufor.
- Otworzyć kasę.
- Umyć płyty.

### **Ocena wyników sekwencjonowania DNA**

- Wyświetlić sekwencję.
- Wydrukować sekwencję.
- Zakończyć pracę w programie **ALF Manager**.

### **Ocena wyników rozdziału fragmentów DNA**

- Uruchomić program **Fragment Manager**.
- Zaznaczyć prążki.
- Zaznaczyć markery.

- Ocenic wielkość prążków.
- Zgrupować prążki.
- Wydrukować wyniki.
- Zapisać wyniki.
- Zakończyć pracę w programie **Fragment Manager**.

### Oczekiwane wyniki

Polimorficzne fragmenty DNA zawierające powtórzenia minisatelitarne, rozdzielone na zestawie **ALFExpress** przedstawiono na rysunku 17.1 i 17.2. Poszczególne fragmenty różnią się między sobą o 14-16 pz. Do uzyskania prawidłowego wyniku wystarcza zastosowanie małej kasety. Ponieważ marker D1S80 wykazuje duży polimorfizm, przedstawione badanie może być zastosowane w poradnictwie genetycznym, medycynie sądowej i kryminalistyce.

**Rys. 17.1**

Locus D1S80 człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w żelu poliakryloamidowym na zestawie **ALFExpress**. Rycina przedstawia widok całej płyty elektroforetycznej, na którą nałożono 40 próbek. Zastosowano standardy wewnętrzne o wielkości 113 i 268 pz (na wszystkich torach) oraz standard zewnętrzny 50-500 pz (tor 37). Kontrole reakcji – tor 1, 2, 38, 39 i 40.

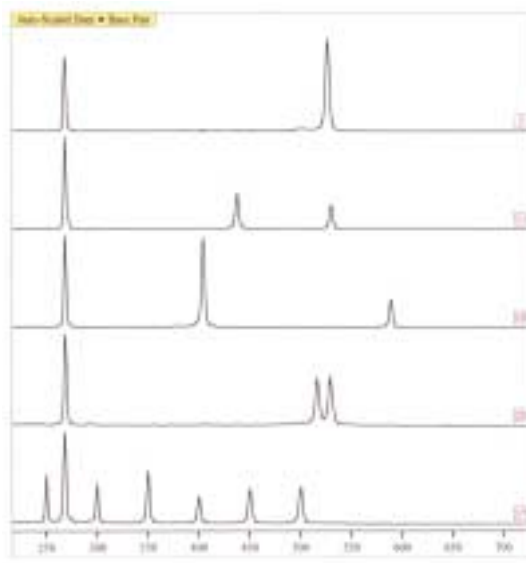


W najbliższej przyszłości oczekiwać można dalszego rozszerzenia diagnostyki molekularnej. Autorzy zakładają, że postęp obejmował będzie zarówno dobór materiału badawczego jak i zwiększenie czułości metod oraz automatyzację procedur analitycznych. W etapie wstępnym przygotowania materiału do badań występuje na pewno opóźnienie metodyczne i sprzętowe w stosunku do samej strategii badań DNA, która umożliwia wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów. Etap przygotowania DNA do badań jest jednak najważniejszy, gdyż rzutuje na wykonywane analizy. Dla przykładu obecność inhibitorów enzymów w preparatach DNA uniemożliwia badanie DNA lub powoduje powstanie artefaktów. Jest to szczególnie niebezpieczne przy stosowaniu badań opartych wyłącznie o enzymatyczną amplifikację DNA *in vitro*. Może dochodzić tu do wybiórczej amplifikacji niektórych alleli z pominięciem innych. Z kolei postęp w samych badaniach DNA jest ogromny i możliwe jest badanie bardzo małych ilości DNA, nawet z pojedynczych komórek. W przypadkach materiału przeznaczonego do badań medyczno-sądowych częstym zjawiskiem jest zdegradowanie DNA. Badania DNA mogą dać wtedy wynik fałszywie negatywny, dlatego wszelkie badania DNA poprzez jego amplifikację powinny przebiegać w obecności kontroli doświadczenia. Zwiększenie czułości metod obejmować będzie coraz szersze wprowadzanie znaczników fluorescencyjnych do detekcji DNA, co w przyszłości

zaowocować ma zautomatyzowaniem badania DNA na poziomie rozdziálu elektroforetycznego i detekcji wyniku.

### Rys. 17.2

Locus D1S80 człowieka amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem startera znakowanego Cy-5. Produkty PCR rozdzielano w żelu poliakryloamidowym na zestawie ALFExpress. Allele identyfikowano na podstawie porównania wielkości i drabiny alleli. Tor 5, allel 24-24; tor 11, allele 18-24; tor 18, allele 16-29 (bardzo rzadkie); tor 29, allele 23-24; tor 37, standard zewnętrzny 50-500 pz. Na każdym torze widoczny jest standard wewnętrzny o wielkości 268 pz.



### Piśmiennictwo

1. Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki K, Neil DL, Monckton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354, 204-209 (1991).
2. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SW. Hypervariable "minisatellite" region in human DNA. *Nature* 314, 67-73 (1985).
3. Kwiatkowska J, Trzeciak T, Słomski R. Powtórzenia DNA. *Postępy Biochemii*; 41, 15-22 (1995).
4. Nakamura Y, Carlson M, Krapcho K, Kanamori M, White R. New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet* 43, 854-859 (1988).
5. Nakamura Y, Julier C, Wolff R, Holm R, O'connell P, Leppert M, White R. Characterization of a human "midisatellite" sequence. *Nucleic Acids Res.* 15, 2537-2547 (1987).
6. Vogel F, Motulsky AG. *Human Genetics - Problems and Approaches*, Wyd. 2. Springer, Berlin (1986).



## Przykład 18.

### BEZPOŚREDNIE SEKWENCJONOWANIE PRODUKTU PCR Z ZASTOSOWANIEM STARTERÓW ZNAKOWANYCH INDODIKARBOCYJANINO (CY5) FOSFOROAMIDEM

<sup>1</sup>Pławski A., <sup>1,2</sup>Lipiński D., <sup>1</sup>Kala M., <sup>1,2</sup>Słomski R.

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, e-mail:

[andp@man.poznan.pl](mailto:andp@man.poznan.pl),

<sup>2</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Wołyńska 35, 60-637 Poznań

## Wprowadzenie

Predyspozycje do występowania chorób nowotworowych dziedziczone są jako mutacje w układzie heterozygotycznym w genach supresorowych nowotworów. Wszystkie komórki organizmu charakteryzują się występowaniem mutacji jeśli mutacja została odziedziczona od jednego z rodziców lub powstała w linii płciowej jednego z nich. Mutacja może wystąpić także w czasie rozwoju organizmu i dochodzi wtedy do mozaikowości. Opracowano szereg metod wstępnego poszukiwania mutacji, które pozwalają na zawężenie badania tylko do fragmentu DNA, w którym zaobserwowano zmiany. Ostateczne potwierdzenie stanowi sekwencjonowanie DNA, ponieważ pozwala ocenić czy wykryta zmiana sekwencji nukleotydów w DNA ma wpływ na sekwencję aminokwasów w białku. Bezpośrednie sekwencjonowanie produktu PCR pomija pracochłonne procedury klonowania i jest metodą niezwykle użyteczną w diagnostyce molekularnej, ponieważ umożliwia szybkie i łatwe sprawdzenie prawidłowości badanej sekwencji lub wykrycie mutacji. Mutacje u osób obciążonych rodziną polipowatością jelita grubego (FAP), tak jak w innych zespołach podatności na występowanie chorób nowotworowych, występują w układzie heterozygotycznym, stąd określenie rodzaju mutacji wymaga dużego doświadczenia. Sekwencjonowanie przeprowadza się klasyczną metodą dideoksy Sangera. Zastosowanie zestawu do automatycznego sekwencjonowania z detekcją fluorescencji produktów reakcji znacznie ułatwia przeprowadzenie badania i podnosi jakość uzyskiwanych wyników. Ograniczona zostaje praca z izotopami. Dzięki zastosowaniu startera znakowanego indodikarboocyanino (Cy5) fosforoamidem każdy produkt PCR jest łatwy do detekcji. Możliwe jest również odczytanie sekwencji dłuższych fragmentów DNA, a uzyskane wyniki można poddać obróbce w innych specjalistycznych programach. Odczyt sekwencji w zestawie do automatycznego sekwencjonowania polega na detekcji przez fotokomórki światła o długości 667 nm emitowanego przez starter reakcji. Fluorescencja następuje w wyniku wzbudzenia fluorochromu światłem lasera o długości 643 nm, przechodzącego przez żel na wysokości detektorów. Emitowane przez wzbudzone barwniki światło jest rejestrowane przez detektory.

## Material

1 DNA wyizolowany z krwi obwodowej

2 Startery

APC Cy515EF            AGTCTTAAATATTCAGATGAGCAG

APC 15ER                GTTCTCTTCATTATATTTTATGCTA

a. Kolumnienki Wizard (Promega)

b. Probówki 200 µl

## Apartura

- 1 Termocykler
- 2 Zestaw do elektroforezy **ALFExpress**

## Odczynniki

- 1 Polimeraza **Taq**
- 2 Trifosforany deoksynukleotydów (**dATP, dCTP, dGTP, dTTP**)
- 3 Bufor do PCR
- 4 Zestaw do sekwencjonowania (**USB 78500**)
- 5 Bufor 10x TBE
- 6 Ready mix Gel ALF Grade
- 7 Bufor obciążający (formamid, 0,5% błękit dekstranu)
- 8 10% nadsiarczan amonu
- 9 TEMED
- 10 Etanol
- 11 10% SDS

## Przygotowanie prób do sekwencjonowania

### A. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR

| Składnik         | Stężenie wyjściowe | Ilość     | Objętość dla 1 próbki (μl) |
|------------------|--------------------|-----------|----------------------------|
| DNA              | 0,1 μg/μl          | 100 ng    | 1                          |
| Starter Cy515EF  | 50 pmoli/μl        | 10 pmoli  | 0,2                        |
| Starter 15ER     | 50 pmoli/μl        | 10 pmoli  | 0,2                        |
| dNTP             | 5 mM               | 5 nmoli   | 1,0                        |
| Bufor            | 10x                | 2,5 μl    | 2,5                        |
| H <sub>2</sub> O |                    | 19,6 μl   | 19,6                       |
| Polimeraza Taq   | 2 jedn./μl         | 1,0 jedn. | 0,5                        |
|                  |                    | Razem     | 25                         |

### B. Warunki reakcji PCR

| Etap                | Temperatura (°C) | Czas (sek.)   |
|---------------------|------------------|---------------|
| Denaturacja wstępna | 94               | 300           |
| Denaturacja         | 94               | 60            |
| Wiązanie starterów  | 55               | 60            |
| Synteza             | 72               | 90            |
| Synteza końcowa     | 72               | 600           |
| Przechowywanie      | 4                | Do wyłączenia |
| Liczba cykli        | 35               |               |

Wielkość fragmentu: 385 pz

## Oczyszczanie produktu PCR

Przed reakcją sekwencjonowania produkt PCR należy oczyścić z nie wbudowanych trifosforanów deoksynukleotydów i starterów. Oczyszczanie przeprowadza się na kolumnach Wizard (Promega) lub przy pomocy egzonukleazy I i alkalicznej fosfatazy.

## Sekwencjonowanie

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzić w czterech probówkach. Stosowane są startery znakowane indodikarbocyjanino (Cy5) fosforoamidem.

- Przygotować 4 próbki oznaczone A, C, G, T.
- Rozpipetować do oznaczonych probówek po 4 µl odpowiednich mieszanin terminujących ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP.
- W oddzielnej probówce zmieszać
  - Oczyszczony produkt PCR 5 µl
  - H<sub>2</sub>O 8 µl
  - Bufor reakcyjny 2 µl
  - Starter Cy5 APC 15G F (10pM/µl) 0,5 µl
  - Polimeraza do sekwencjonowania 2 µl
  - Razem 17,5 µl
- Rozpipetować do probówek zawierających mieszaniny terminujące po 4µl mieszaniny z punktu 3 i delikatnie wymieszać.
- Umieścić próbki w termocyklerze.
- Przeprowadzić reakcję PCR w temperaturze wiązania starterów jak w reakcji PCR, w której uzyskano produkt do sekwencjonowania.

| Etap                | Temperatura (°C) | Czas (sek.)   |
|---------------------|------------------|---------------|
| Denaturacja wstępna | 94               | 60            |
| Denaturacja         | 94               | 30            |
| Wiązanie starterów  | 55               | 30            |
| Synteza             | 72               | 60            |
| Synteza końcowa     | 72               | 300           |
| Przechowywanie      | 4                | Do wyłączenia |
| Liczba cykli        | 25               |               |

- Po reakcji sekwencjonowania dodać 4 µl buforu stop i denaturować 5 min. w temp. 75°C

## Przygotowanie kasety do rozdziału elektroforetycznego na zestawie ALFExpress opisano w przykładzie 17.

- Wpisać parametry rozdziału w menu, 1500 V, 60 mA, 25 W, 30°C, odczyt co 2 sek., czas rozdziału 600 min. W przypadku użycia zapisanego pliku „casebook” wcisnąć przycisk „preset” w górnym menu okna programu.
- Przed nałożeniem próbek zaleca się przeprowadzenie preelektroforezy przez 15 min. Należy zatrzymać instrument przyciskiem „pause” w górnym menu okna dialogowego. Nałożyć próbki na żel sekwencyjny w kolejności A, C, G i T na ścieżkach dla poszczególnych klonów.
- Po nałożeniu próbek kontynuować rozdzielanie.
- Po rozpoczęciu rozdziału w menu „casebook” wpisać nazwy próbek w poszczególnych torach. Będą one zachowane tylko w pliku wynikowym.

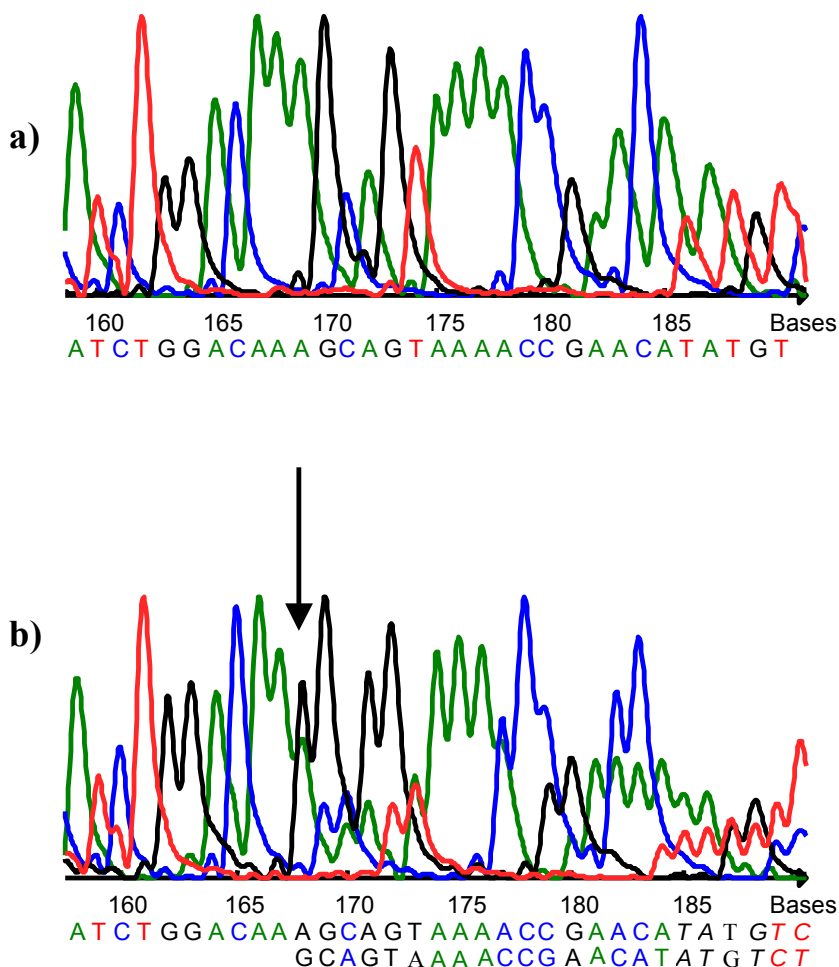
## Ocena wyników

Rozdział analizować programem ALFWin Sequence Analyser

## Oczekiwane wyniki

Rodzinna polipowatość jelita grubego (FAP) jest chorobą autosomalną dominującą o częstości występowania 1/8000. Predyspozycja do wystąpienia choroby nowotworowej związana jest z mutacjami genu supresorowego APC, zlokalizowanego na chromosomie

5q21. Wielkość sekwencji kodującej wynosi 8538 pz, a produktu białkowego 300 K. Mutacje wykazują heterogeny charakter, stąd dla badań rutynowych ważne jest opracowywanie metod przesiewowych wyszukiwania mutacji. W przypadkach chorób uwarunkowanych mutacjami dziedzicznymi, w układzie heterozygotycznym występują dwa allele genu, allel zmutowany i prawidłowy. Allele te nie są jednakowe i dlatego mogą wystąpić różnice w sekwencji (w przypadku substytucji) lub długości (w przypadku delecji lub insercji). Sekwencjonowanie produktów PCR jest metodą pozwalającą na szybkie i nisko nakładowe badanie DNA, jednak w przypadkach, gdy badany fragment zawiera mutacje w układzie heterozygotycznym lub zawiera powtarzający się motyw może wystąpić konieczność klonowania fragmentów i sekwencjonowania kilku klonów.



**Rys. 18.1.**

Produkt PCR fragmentu E eksonu 15 genu *APC* poddano bezpośredniemu sekwencjonowaniu z zastosowaniem startera znakowanego indodikarbocyanino-(Cy5)-fosforoamidem. Wykryto występowanie delecji A w kodonie 1205. A, sekwencja prawidłowa; B, sekwencja DNA chorego na rodzinną polipowatość jelita grubego (FAP) z delecją.

## Przykład 19.

### ANALIZA SEKWENCJI DNA METODĄ IZOTERMICZNĄ KLONÓW WYSELEKCJONOWANYCH Z BIBLIOTEKI cDNA ŁUBINU ŻÓŁTEGO

<sup>1</sup>Nuc K., <sup>1,2</sup>Słomski R.

<sup>1</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Wołyńska 35, 60-637 Poznań, e-mail: [ktnuc@owl.au.poznan.pl](mailto:ktnuc@owl.au.poznan.pl),

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

#### Wprowadzenie

Poznanie sekwencji DNA, wyselekcjonowanych z biblioteki klonów jest ważnym etapem prowadzonych badań. Aby analizować cDNA w aspekcie występowania ramek odczytu istotne jest, aby dane sekwencyjne były jednoznaczne. Od czasu opracowania w 1977 r. przez F. Sangera i A. Coulsona metody enzymatycznego sekwencjonowania DNA (tzw. „dideoksy”), wprowadzono wiele ulepszeń, zwłaszcza wykorzystywanych w reakcji enzymów. Obecnie najczęściej wykorzystywane są polimeraza DNA T7 (najnowsza wersja to Sequenase V. 2.0 - Amersham Pharmacia Biotech) oraz polimeraza Taq (najnowsza wersja to Thermo sequenase - Amersham Pharmacia Biotech). Obie polimerazy różnią się charakterystyką warunków reakcji oraz pewnymi właściwościami:

|                                      | Polimeraza DNA T7<br>Sequenase V. 2.0 | Polimeraza Taq<br>Thermo sequenase       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| Optimum temperaturowe                | 37°C                                  | 72°C                                     |
| Wydajność inkorporacji<br>dNTP/ddNTP | 3,3                                   | 0,7                                      |
| Szybkość wbudowywania<br>nukleotydów | 300 nt/sek.                           | 100 nt/sek.                              |
| Dyskryminacja nukleotydów            | Brak dla 7-deaza-dGTP                 |                                          |
| Sekwencjonowanie                     | Izotermiczne                          | Izotermiczne<br>Reakcja jednostronna PCR |

W opisanych poniżej badaniach wykorzystywano w zależności od potrzeb obydwie polimerazy stosując odpowiednie protokoły do przygotowywania reakcji. Produkty reakcji sekwencjonowania rozdzielano na zestawie do automatycznego odczytu sekwencji **ALFExpress** z zastosowaniem zestawów odczynników do sekwencjonowania **Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit** (metoda opisana w rozdziale „Analiza sekwencji DNA biblioteki chromosomu 5 grochu”) oraz **Sequenase V. 2.0 DNA Sequencing kit**. Poniżej przedstawiono protokół sekwencjonowania DNA metodą izotermiczną.

#### Materialy

- 1 Biblioteka ekspresyjna cDNA łubinu żółtego założona w wektorze Lambda ZAP II.
- 2 Wyselekcjonowane i oczyszczone klony.
- 3 Startery  
pUC/M13-F      Cy5-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC  
pUC/M13-R      Cy5-TCACACAGGAAACAGCTATGAC

## Aparatura

- 1 Zestaw do elektroforezy i automatycznego odczytu sekwencji **ALF Express II**.

## Odczynniki

- 1 Zestaw do sekwencjonowania **Sequenase V. 2.0 DNA Sequencing**.
- 2 Roztwory akryloamidu (40%), metylenobisakryloamidu (2%), APS (10%), TEMED
- 3 Mocznik
- 4 Bufor do elektroforezy 10x TBE: 1 mol/l Tris, 0,83 mol/l kwas borowy, 10 mmol/l EDTA.
- 5 Roztwór denaturujący Dseq (1 M NaOH, 1 mM EDTA).
- 6 Minikolumna wirówkowa Sepharose CL 6B zawieszona w 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0.

## Przygotowanie matrycy do sekwencjonowania

- Do 3 µg plazmidowego DNA, zawieszonego w 15 µl dejonizowanej wody dodać 5 µl roztworu Dseq i inkubować około 15 min. w temp. 37°C.
- Preparat nanieść na minikolumnę wirówkową i wirować 4 min., 200xg. Eluat wykorzystać w dalszych etapach.
- Przyłączanie startera

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Eluat                        | 13 µl |
| Starter                      | 2 µl  |
| 5x bufor do sekwencjonowania | 5 µl  |

- Mieszaninę inkubować w temp. 65°C przez 10 min. a następnie powoli schładzać do temp. pokojowej.

## Uwaga

- 1 *Matryca DNA stosowana do reakcji sekwencjonowania powinna być bardzo dobrze oczyszczona od RNA.*

## Przygotowanie reakcji sekwencjonowania

- Skład mieszaniny do sekwencjonowania

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Matryca ze starterem             | 20 µl  |
| Labeling Mix                     | 2 µl   |
| Sequenase V. 2.0 (2,5 jedn./ µl) | 1,6 µl |

Mieszaninę inkubować 5 min., w temp. 37°C.

Przenieść po 6 µl powyższej mieszaniny do probówek oznaczonych: A, C, G i T, zawierających 1 µl mieszaniny nukleotydów (80 µM każdego dNTP, 50 mM NaCl i po 8 µM jednego ddNTP, w probówce A - ddATP). Mieszaninę inkubować 5 min. w temp. 37°C.

Zatrzymać syntezę łańcuchów DNA dodając 4 µl roztworu STOP (fuksyna, 95% formamid).

Produkty denaturować 2-5 min. w temp. 90°C. Nanieść 5 µl każdej próby do kieszonek w 6% denaturującym żelu poliakryloamidowym, rozgrzanym do temperatury wyższej niż 55°C. Elektroforezę prowadzić przy napięciu 1800-2000 V, w buforze 0,6x TBE.

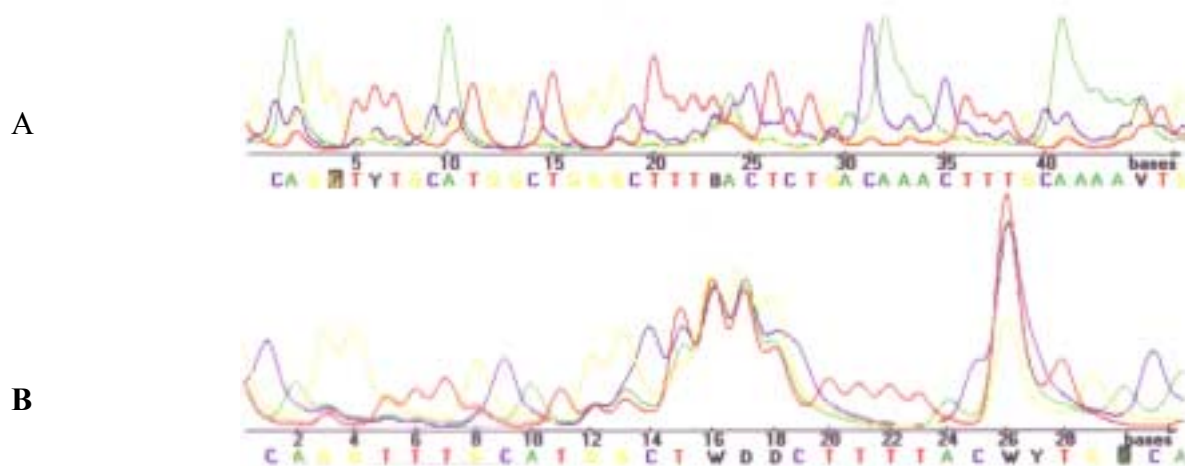
Przygotowanie kasety do rozdzielu elektroforetycznego, żelu poliakryloamidowego oraz warunki rozdzielu opisano w rozdziale „Analiza sekwencji DNA biblioteki chromosomu 5 grochu”.

### Uwaga

- 2 Znacznik fluorescencyjny Cy5 ulega degradacji na świetle.
- 3 Przy stosowaniu zestawu do elektroforezy i automatycznego odczytu sekwencji **ALFExpress II** należy pamiętać, aby bufor STOP zawierał barwnik nie migrujący podczas rozdziału elektroforetycznego, co mogłoby zakłócić odczyt, do takich należą fuksyna lub błękit dekstranu.

### Oczekiwane wyniki

Automatyczny odczyt sekwencji DNA z zastosowaniem zestawu typu ALFexpress polega na fluorometrycznej detekcji światła emitowanego przez fluorochrom Cy5, pod wpływem wiązki światła laserowego o długości 643 nm. Wiązka lasera przechodzi przez szklaną przekładkę i żel poliakryloamidowy wzbudzając Cy5 do emisji światła o długości fali 667 nm. Dzięki automatycznemu odczytu wyników reakcji sekwencjonowania, unika się z radioizotopów (bezpieczniejsza praca, trwałe znaczniki, szybsza detekcja), długiej i kłopotliwej obróbki żeli poliakryloamidowych oraz ich autoradiografii. Ponadto, odczytuje się dłuższe sekwencje, a uzyskane wyniki pozbawione błędów wynikających z ręcznego odczytu można bezpośrednio eksportować do specjalistycznych programów komputerowych celem ich składania, porównywania i dalszej analizy.



Rys. 19.1

Wynik sekwencjonowania klonu 3, wyselekcjonowanego z biblioteki cDNA łubinu żółtego. Reakcja została przeprowadzona z udziałem startera pUC/M13-f, w przypadku A) za pomocą polimerazy Taq poprzez reakcję PCR, natomiast w przypadku B) za pomocą polimerazy DNA Sequenase V. 2.0, metodą izotermiczną. Przedstawione fragmenty fluorogramów ilustrują rejon sekwencji budzący wątpliwości, które zostały rozwiązane stosując zamiennie obie metody sekwencjonowania. Porównując oba wyniki wykazano następującą sekwencję: CAG GTT TGC ATG GCT GGG CTT TTA CTC TGA CAA.

Na rysunku 19.1 A i B przedstawiono przykładowe rezultaty uzyskane w wyniku sekwencjonowania jednej matrycy DNA - klon 3, metodą izotermiczną (A) oraz poprzez PCR (B). Na fluorogramie przedstawiono rejon budzący wątpliwości, który udało się rozwiązać stosując zamiennie obie metody sekwencjonowania. Komputerową analizę wykonano za pomocą programu **ALFWin Sequence Analyser**.

## Przykład 20.

### WYKRYWANIE MUTACJI PUNKTOWYCH W GENIE SUPRESOROWYM *APC* CZŁOWIEKA METODĄ HETERODUPLEKSÓW

<sup>1</sup>Pławski A, <sup>1,2</sup>Lipiński D, <sup>1,2</sup>Słomski R

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, e-mail:

[andp@man.poznan.pl](mailto:andp@man.poznan.pl)

<sup>2</sup>Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Wołyńska 35, 60-637 Poznań

#### Wprowadzenie

Współczesna diagnostyka chorób dziedzicznych opiera się na badaniach molekularnych DNA, co pozwala na jednoznaczne określenie osób z grupy ryzyka, które są zagrożone wystąpieniem choroby genetycznej. Jedną z takich chorób jest rodzinna polipowatość jelita grubego (FAP). Jest to choroba dziedziczona w sposób autosomalny dominujący o częstości występowania 1/8000. Predyspozycja do wystąpienia choroby nowotworowej związana jest z mutacjami w genie supresorowym *APC* zlokalizowanym na chromosomie 5q21. Charakterystyczne dla przebiegu choroby jest występowanie w 2 dekadzie życia licznych polipów w jelicie grubym, które mogą rozwijać się w kierunku nowotworu złośliwego. W związku z tym ważne jest określenie w grupie ryzyka osób obciążonych nosicielstwem mutacji i otoczenie ich odpowiednią opieką medyczną, a także uwolnienie od nieuzasadnionego stresu osób nie obciążonych nosicielstwem. Mutacje w genie *APC* wykazują heterogeny charakter, stąd dla badań rutynowych ważne jest opracowywanie metod przesiewowych wyszukiwania mutacji. Bardzo skuteczną metodą przesiewową jest metoda analizy heterodupleksów, która może być zastosowana zarówno do produktów PCR o wielkości poniżej 200 pz jak i powyżej 400 pz. W przypadku FAP, tak jak w innych chorobach uwarunkowanych mutacjami dziedzicznymi, w układzie heterozygotycznym występują dwa allele genu: allel zmutowany i prawidłowy. Allele te nie są jednakowe i dlatego mogą wystąpić różnice w sekwencji (w przypadku substytucji) lub długości (w przypadku delecji lub insercji). Amplifikacja fragmentu obejmującego mutację prowadzi do uzyskania dwóch typów fragmentów DNA, różniących się sekwencją w miejscu mutacji. Po denaturacji i powolnym schładzaniu produktów PCR poszczególne nici DNA hybrydują losowo i dochodzi do hybrydyzacji nici komplementarnych zmutowanych i nie zmutowanych, jak również do hybrydyzacji nici nie w pełni komplementarnych. Hybrydyzacja nie w pełni komplementarnych nici prowadzi do powstania dupleksu. Na nie sparowanym odcinku nici DNA wytwarzają się struktury przybierające postać „pęcherzyka”, zgięcia nici DNA lub wybrzuszenia. Mutacje typu substytucji powodują powstanie obustronnego wybrzuszenia, a insercje lub delecje powodują powstawanie jednostronnego wybrzuszenia lub ugięcia nici DNA. Największą zmianę szybkości migracji obserwuje się podczas ugięcia nici DNA, a wytworzenie wybrzuszenia w wyniku zmiany konformacji wymuszonej stężeniem czynników denaturujących obniża zmianę szybkości migracji względem homodupleksów.



## Material

- 1 DNA wyizolowany z krwi obwodowej.
- 2 Startery  
APC 15GF AAGAAACAATACAGACTTATTGTG  
APC 15GR ATGAGTGGGGTCTCCTGAAC.
- 3 Probówki 200  $\mu$ l.

## Aparatura

- 1 Termocykler.
- 2 Zestaw do elektroforezy **ALFExpress II**.

## Odczynniki

- 1 Polimeraza Taq.
- 2 Trifosforany deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- 3 Bufor do PCR.
- 4 Bufor 5x TTE (89 mM Tris, 15 mM tauryna, 0,5 mM EDTA ).
- 5 Akryloamid 40%.
- 6 Bisakryloamid 2%.
- 7 Formamid.
- 8 Glikol polietylenowy.
- 9 Bufor obciążający (20% glikol etylenowy, 30% formamid, 0,5% błękit dekstranu).
- 10 10% nadsiarczan amonu.
- 11 TEMED.
- 12 Etanol.
- 13 10% SDS.

## Przygotowanie próbek do elektroforezy

### A. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR

| Składnik         | Stężenie wyjściowe   | Ilość        | Objętość dla 1 próbki ( $\mu$ l) |
|------------------|----------------------|--------------|----------------------------------|
| DNA              | 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l | 100 ng       | 1                                |
| Starter 15GF     | 50 pmoli/ $\mu$ l    | 10 pmoli     | 0,2                              |
| Starter 15GR     | 50 pmoli/ $\mu$ l    | 10 pmoli     | 0,2                              |
| DNTP             | 5 mM                 | 5 nmoli      | 1,0                              |
| Bufor            | 10x                  | 2,5 $\mu$ l  | 2,5                              |
| H <sub>2</sub> O |                      | 19,6 $\mu$ l | 19,6                             |
| Polimeraza Taq   | 2 jedn./ $\mu$ l     | 1,0 jedn.    | 0,5                              |
|                  |                      | Razem        | 25                               |

## B. Warunki reakcji PCR

| Etap                | Temperatura (°C) | Czas (sek.)   |
|---------------------|------------------|---------------|
| Denaturacja wstępna | 94               | 300           |
| Denaturacja         | 94               | 60            |
| Wiązanie starterów  | 55               | 60            |
| Synteza             | 72               | 90            |
| Synteza końcowa     | 72               | 600           |
| Przechowywanie      | 4                | Do wyłączenia |
| Liczba cykli        | 35               |               |

Wielkość fragmentu: 385 pz

## C. Inkubacja produktów PCR - tworzenie heterodupleksów

- 4 µl produktu PCR mieszać z 4 µl buforu obciążającego, denaturować przez 5 min. w 95°C, a następnie inkubować przez 60 min. w 65°C.

**Przygotowanie kasety do rozdzielu elektroforetycznego na zestawie ALFExpress opisano w przykładzie 17.**

- Przygotowanie żelu
  - 40% akryloamid 15 ml
  - 2% bisakryloamid 10 ml
  - glikol polietylenowy 10 ml
  - formamid 14 g
  - 5x TTE 20 ml
  - TEMED 100 µl
  - 10% APS 1 ml
  - H<sub>2</sub>O do 100 ml
  - TEMED i APS dodać bezpośrednio przed wylaniem żelu
- Po połączeniu się komputera z sekwenatorem wybrać plik „casebook” z zachowanymi warunkami rozdzielu lub utworzyć nowy wybierając analizę fragmentów (**Fragment Analyser**).
- Wpisać parametry rozdzielu 1500 V, 60 mA, 25 W, 30°C, odczyt co 2 sek., czas rozdzielu 600 min. w menu **ALFExpressII**. W przypadku użycia zapisanego pliku typu „casebook” wcisnąć przycisk preset w górnym menu okna programu.
- Napełnić dolne naczynie buforem 1x TTE, górne 0,25 x TTE

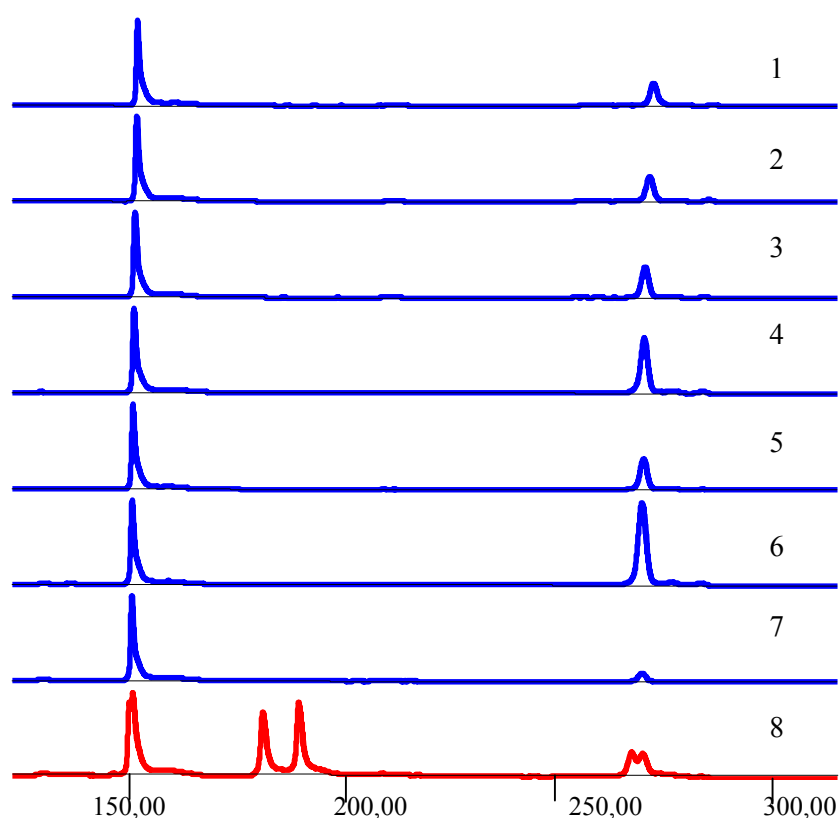
## Ocena wyników

Rozdział analizować programem **Fragment Analyser**.

## Oczekiwane wyniki

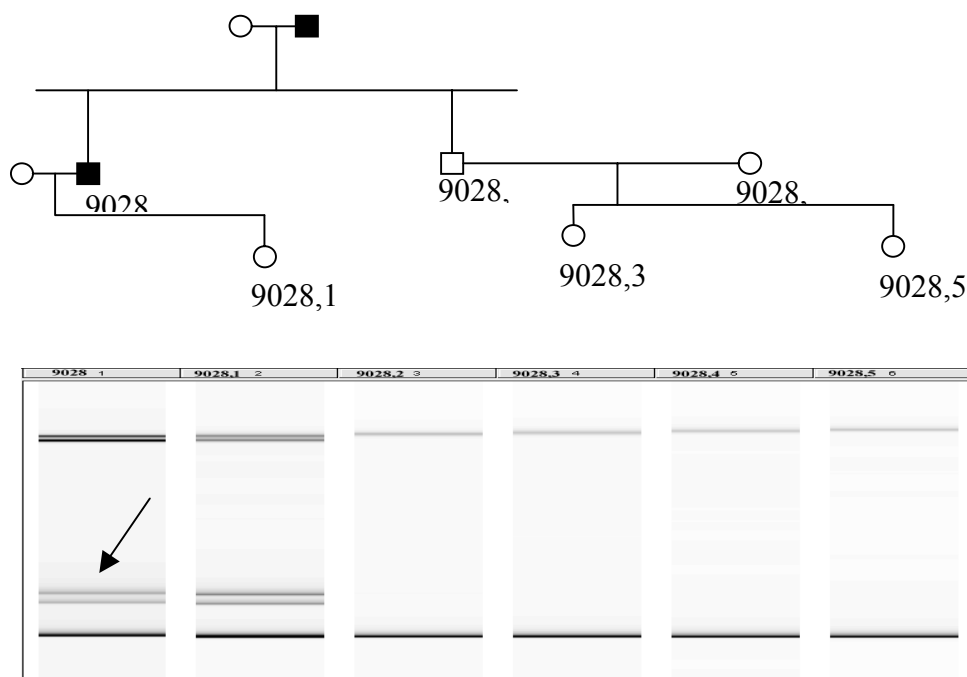
Mutacje występujące w układzie heterozygotycznym można wykryć metodami przesiewowymi. W analizie heterodupleksów ważne jest, aby doszło do utworzenia dupleksów, a następnie aby były dobrze uwidocznione po rozdziale elektroforetycznym.

Na skuteczność wykrywania zmian wpływa rodzaj mutacji, jak również położenie mutacji względem końca produktu. Delekcje lub insercje powyżej trzech nukleotydów najczęściej powodują powstawanie stabilnych heterodupleksów, które można obserwować podczas rozdziału na dowolnym żelu poliakryloamidowym. W przypadku zmian jednej pary zasad duży wpływ na uzyskanie informatywnych wyników ma odpowiednie dobranie warunków elektroforezy.



**Rys. 20.1**

Analiza heterodupleksów we fragmentach G eksonu 15 genu APC w 10% żelu poliakryloamidowym. Tory 1-7 (niebieskie), fragmenty nie wykazujące zmian, nie obserwuje się heterodupleksów; tor 8, widoczne są dodatkowe wierzchołki heterodupleksów, wynikających z delekcji 5 pz (AAAGA) w pozycji 1309-1313.



**Rys. 20.2**

Diagnostyka molekularna dla rodziny 9028. Analizie poddano DNA osoby chorej oraz 5 osób spokrewnionych z chorym. Dodatkowe konformery (oznaczone strzałką) występują u chorego, a także u jednej osoby z grupy ryzyka. Wynik analizowano przy pomocy programu **ALFWin Fragment Analyser**.

### Piśmiennictwo

7. Boyd M, Lanyon WG, Connor JM. Screening for molecular pathologies in Lesh-Nyhan syndrome. *Hum. Mut.* 2, 127-130 (1993).
8. Friedl W, Mandl M, Sengteller M. Single-step screening method for the most common mutations in familial adenomatous polyposis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1481-1482 (1993).
9. Groden J, Thliveris A, Samovitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen ., Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et. al.. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 66, 589-600 (1991).
10. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, Burghes AM, Sedra MS, Western LM, Bartello C, Mendell JR. Identification of two point mutations and a one base deletion in exon 19 of the dystrophin gene by heteroduplex formation. *Hum. Mol. Genet.* 2, 311-313 (1993)
11. Wang Y-H, Barker P, Griffith J. Visualization of diagnostic heteroduplex DNAs from cystic fibrosis deletion heterozygotes provides an estimate of kinking of DNA by bulged bases. *J. Biol. Chem.* 267, 4911-4915 (1992).