Název projektu:	**Digitalizace chemických experimentů pro zlepšení kvality a podporu výuky chemie na středních školách**
Akronym:	**ChemIQSoc**
Číslo projektu:	**2021-1-SK01-KA220-VET-000027995**

Co-funded by the Erasmus+ Programme of the European Union

Název: Elektroforetická separace proteinů v SDS-PAGE

Návod na práci

Zadání: Rozdělte frakce zásobních bílkovin v SDS-PAGE a vyhodnoťte pomocí standardů (markeru).

Teorie

Elektroforetické metody jsou fyzikálně-chemické metody, které se používají k separaci látek nesoucích elektrické náboje. Pokud se směs takových látek vystaví v určitém prostředí působení elektrického pole, dochází k pohybu molekul. Jejich pohyblivost závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí (například charakter nosiče) a síle elektrického pole. Velikost náboje molekuly ovlivňuje stupeň ionizace, pH a iontová síla prostředí.

Elektroforézou se mohou dělit nízkomolekulové i vysokomolekulové látky. V molekulární biologii se při separaci látek používají jako nosiče nejčastěji agarózové a polyakrylamidové gely. Gely mají charakter molekulových sít, což umožňuje, aby se při elektroforéze rozdělily i takové látky, které mají stejný náboj, ale rozličnou velikost molekul. Podle příslušného gelu rozlišujeme elektroforézu agarózovou a polyakrylamidovou (PAGE).

Polyakrylamidovou elektroforézu (PAGE) lze využít k separaci nukleových kyselin i proteinů. Polyakrylamidový gel má velmi dobré mechanické vlastnosti, je průsvitný, při přípravě lze zajistit vyžadovanou velikost pórů, struktura gelu je velmi dobře reprodukovatelná, má ze všech nosičů největší rozlišovací kapacitu. Polyakrylamidový gel vzniká polymerací základního akrylamidového monomeru a síťovacího monomeru N,N'-methylen-bis-akrylamidu. Akrylamid a BIS jsou toxické, proto je třeba s nimi opatrně manipulovat! Polymer již není toxický.

Základní zařízení pro elektroforézu se skládá z elektroforetické komory a zdroje stejnosměrného elektrického proudu. Elektroforetická komora obsahuje elektrolyt a prostor pro umístění gelu. Polyakrylamidový gel se připravuje ve formě desek na sklech o různých rozměrech, které bývají během elektroforézy ve vertikální poloze.

K separaci proteinů podle velikosti molekul se využívá PAGE v prostředí dodecylsíranu sodného (SDS). SDS se váže na peptidové vazby a zásadité skupiny proteinů, v důsledku čehož všechny proteiny získají skoro stejně velký záporný náboj (během elektroforézy se pohybují k anodě) a při elektroforéze se pak dělí jen podle velikosti svých molekul – menší molekuly se pohybují rychleji, velké molekuly pomaleji. Pokud se k proteinům přidá SDS a redukující látky (2-merkaptoetanol, ditiotreitol) s následnou tepelnou denaturací, rozruší se jejich trojrozměrná konformace a molekuly zaujmou přibližně stejný tvar. Proteiny můžeme dělit i bez přítomnosti

SDS, v tomto případě se bílkoviny nedělí podle velikosti molekuly (tzv. nativní PAGE). Při elektroforéze proteinů pomocí SDS-PAGE se připravuje gel sestávající ze dvou koncentračně odlišných částí – koncentrovanější dělící gel (ve spodní části desky) a méně koncentrovaný startovací gel. Barvení gelu se provádí specifickými barvivy. Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo barvením pomocí dusičnanu stříbrného (barvení stříbrem).

Pomůcky: zkumavky, automatické pipety se špičkami, aparatura na vertikální diskontinuální elektroforézu Biometru, zdroj stejnosměrného elektrického proudu

Chemikálie: TRIS báze, akrylamid, bisakrylamid, dodecyl síran sodný, peroxodisíran amonný (APS), tetramethylendiamin (TEMED), kyselina trichloroctová, Coomassie Brilliant Blue R-250, ethanol

Roztoky

1M Tris-HCl pH 6,8	12,114 g TRIS doplnit do 100 ml vodou a pH upravit HCl
1M Tris-HCl pH 8,8	12,114 g TRIS doplnit do 100 ml vodou a pH upravit HCl
A-BIS startovací	7,29 g akrylamid + 0,125 g bisakrylamid doplnit do 100 ml d. vodou
AA-BIS dělící	54,49 g akrylamid + 0,72 g bisakrylamid doplnit do 250 ml d. vodou
10 % SDS	5 g SDS doplnit do 50 ml d. vodou
2 % APS	0,02 g PSA + 1 ml redestilované vody (každý den čerstvý!)
Elektrodový roztok	28,2 g glycin + 6 g Tris + 2 g SDS doplnit do 2 l d. vodou

Složení 100 ml dělícího gelu

38,1 ml	1 mol/dm^3 Tris-HCl, pH 8,8
58,27 ml	roztoku bisakrylamidu (AA-BIS), (12,7 g akrylamidu + 0,168 g bisakrylamidu v objemu 58,27 ml)
1 ml	10 % roztoku SDS
2,53 ml	1 % roztoku APS
50 µl TEMED	Po polymeraci dělicího gelu odstraňte butanol a nalijte startovací gel až po horní okraje skleněných desek.

Složení 20 ml startovacího gelu

2,47 ml	1 mol/dm^3 Tris-HCl, pH 6,8
16,6 ml	roztoku AA-BIS (1,21 g akrylamidu + 20,8 mg bisakrylamidu v objemu 16,6 ml)
0,2 ml	10 % roztoku SDS
741 µl	1 % roztoku APS
20 µl	TEMED

Složení elektroforetického roztoku

- 3 g Tris-HCl
- 14,1 g glycinu
- 1 g SDS 10 %, rozpustit a doplnit do 1000 ml destilovanou vodou, upravit pH = 8,3

Složení barvicího roztoku

- 95 ml 10 % kyseliny trichloroctové a 5 ml 0,5 % roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 v ethanolu.

Postup

Příprava aparatury na elektroforézu

1. Očistěte skleněné desky teplou vodou a ethanolem.
2. Pro přípravu ploten použijte dvě nestejně velká skla.
3. Po důkladném očištění je spojte svorkami.

Příprava gelu

1. Připravte gely do skleněných desek: dělící a zaostřovací.
2. Nalijte dělící gel asi 1,5 cm pod horní okraj menší desky. Pro vyrovnání povrchu gelu nakapejte 3 – 5 kapek butanolu. Dělicí gel nechte polymerovat 30 minut.
3. Po polymeraci dělicího gelu odstraňte butanol a nalijte startovací gel až po horní okraj skleněných desek.
4. Startovací gel polymeruje velmi rychle (do 1 minuty), proto je třeba jej po přípravě co nejrychleji nalít do ploten. Po ztuhnutí startovacího gelu vyjměte z ploten hřebeny. Do jamek, které zůstaly ve startovacím gelu po hřebeni naneste vzorky v množství 5 µl. Připravené desky s nanesenými vzorky umístěte do elektroforetické komory a přidejte elektrodový roztok.

Separace proteinů

1. Elektroforetické dělení probíhá při velikosti proudu 30 mA 6 – 8 hodin, při konstantní teplotě 15 °C, dokud marker nedosáhne spodního okraje gelu.
2. Prvních 15 minut probíhá dělení při velikosti proudu 5 mA, dalších 25 minut při 10 mA a ostatní hodiny při velikosti proudu 40 – 60 mA.

Barvení gelu a vizualizace bílkovin

1. Všechny frakce bílkovin separované v SDS-PAGE barvitě v roztoku připraveném smícháním 95 ml 10 % kyseliny trichloroctové a 5 ml 0,5 % roztoku Coomassie Brilliant Blue R 250 v ethanolu. Přebytečné barvivo z gelu odstraňte promýváním gelů v destilované vodě po dobu 16 hodin.

Nakládání s chemickými látkami

Chemikálie	**Forma**	**H-věty**	**P-věty**
HCl	Kapalina	H314, H335	P261, P280, P305, P351, P338, P304, P340, P310
C_2H_5OH	Kapalina	H225	P210, P233
Akrylamid	Pevná	H301, H317, H340, H350, H361f, H372	P201, P280, P302, P352, P308, P313
Bisakrylamid	Pevná	H301, H340, H350, H361fd, H372	P260, P280, P301, P31, P308, P313
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Pevná	H228, H311, H319, H335	P210, P261, P305, P351, P338, P280, P312
Peroxodisíran amonný (APS)	Pevná	H272, H302, H315, H317, H319, H302, H334, H335	P261, P280, P302, P313, P332, P338, P351, P352
Tetramethylethylenndiamin (TEMED)	Kapalina	H225, H302, H314, H331	P210, P280, P312, P303, P361, P353, P304, P340, P310, P305, P351, P338
Coomassie Brilliant Blue	pevná	H319, H335	P261, P280, P305, P351, P338, P403, P233, P405, P501

Chemikálie	Forma	H-věty	P-věty
Kyselina trichloroctová	Kapalina	H314, H335, H400, H410	P260, P280, P303, P304, P361, P353, P340, P310, P305, P351, P338

Zdroje rizik a vyhodnocení závažnosti rizika

Většina chemikálií použitých k přípravě gelu je nebezpečná a řazená do skupiny jedů, proto s nimi pracujeme velmi opatrně as použitím všech pravidel pro práci s nebezpečnými látkami. Používáme osobní ochranné prostředky (rukavice, brýle, plášť).

Způsob nakládání sodpady

Odpady vzniklé při analýze likvidujeme do předem k tomu určených nádob.

Opatření k omezení rizika

Použití osobních ochranných prostředků (brýle, rukavice, plášť). Z hlediska bezpečnosti a ochrany zdraví při práci je výhodné zakoupit hotové polyakrylamidové gely, které již nejsou toxické.

Literatura

1. CHŇAPEK, M.: *Využitie bielkovinových markerov pri identifikácii, diferenciácii a charakteristike genotypov pšenice letnej, tvrdej, špaldy a jačmeňa jarného*. Doktorandská dizertačná práca. Nitra: SPU, 2007.

Pracovní list

Experimentální údaje

1. Zaznamenávejte hodnoty proudu v časovém intervalu 15 min

Čas [min]	Proud [mA]	Čas [min]	Proud [mA]
0:15		4:15	
0:30		4:30	
0:45		4:45	
1:00		5:00	
1:15		5:15	
1:30		5:30	
1:45		5:45	
2:00		6:00	
2:15		6:15	
2:30		6:30	
2:45		6:45	
3:00		7:00	
3:15		7:15	
3:30		7:30	
3:45		7:45	
4:00		8:00	

2. Změřte vzdálenost elektroforetické cely (výška gelu) od začátku po konec *l*

Výpočty

1. Zaznamenejte vzdálenosti skvrn standardů (od začátku po střed skvrny) pro jednotlivé standardy proteinů *a*

Molekulová hmotnost	*a* [mm]	Molekulová hmotnost	*a* [mm]

1. Zaznamenejte a porovnejte vzdálenosti skvrn proteinů ve vzorcích se standardy a identifikujte jednotlivé proteiny.

Otázky

1. Podle jakého principu separace se dělí proteiny v SDS-PAGE elektroforéze.

2. K čemu slouží barvicí roztok?

3. opište, jaké pracovní elektroforetické parametry ovlivňují ujetou vzdálenost proteinů v akrylátovém gelu.

4. Napište z jakých částí/modulů se skládá elektroforetické zařízení.

5. Popište jednotlivé elektroforetické principy.

6. Uveďte chyby a jejich zdroje při elektroforetickém stanovení proteinů. Navrhněte možná řešení.

Závěr

Shrňte stručně cíl experimentu, hlavní výsledky a porovnejte je s očekávanými hodnotami.

Prohlášení o vyloučení odpovědnosti

Financováno Evropskou unií. Vyjádřené názory a postoje jsou názory a prohlášeními autora(ů) a nemusí nutně odrážet názory a stanoviska Evropské unie nebo Slovenské akademické asociace pro mezinárodní spolupráci, Národní agentury programu Erasmus+ pro vzdělávání a odbornou přípravu. Evropská unie ani organizace udělující grant za ně nepřebírají žádnou odpovědnost.