

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



Naziv: Elektroforetsko razdvajanje proteina u SDS-PAGE

Uputstva za rad

Zadatak: Podelite frakcije proteina za skladištenje u SDS-PAGE i procenite pomoću standarda (markera).

Teorijski deo

Elektroforetske metode su fizičko-hemijske metode koje se koriste za razdvajanje supstanci koje nose električne naboje. Ako je smeša takvih supstanci izložena električnom polju u određenom okruženju, dolazi do kretanja molekula. Njihova pokretljivost zavisi od veličine naboja, veličine i oblika molekula, uslova sredine (na primer, prirode nosača) i jačine električnog polja. Veličina naelektrisanja molekula utiče na stepen jonizacije, pH i jonske jačine u životnoj sredini.

Elektroforezu možemo podeliti na nisko-molekulske i visoko-molekulske supstance. U molekularnoj biologiji, kao nosači u odvajanju supstanci se najčešće koriste agarozni i poliakrilamidni gelovi. Gelovi imaju karakter molekulskih sita, što omogućava supstancama koje imaju isti naboj, ali različite veličine molekula da se podele tokom elektroforeze. Prema vrsti gela, razlikujemo agaroznu i poliakrilamidnu elektroforezu (PAGE).

Poliakrilamidna elektroforeza (PAGE) može se koristiti za razdvajanje nukleinskih kiselina i proteina. Poliakrilamidni gel ima veoma dobra mehanička svojstva, proziran je, potrebna veličina pora može se osigurati tokom pripreme, struktura gela je veoma ponovljiva, ima najveći kapacitet rezolucije od svih nosača. Poliakrilamidni gel se formira polimerizacijom osnovnog akrilamidnog monomera i monomera umrežavanjem sa N,N'-metilen-bis-akrilamidom. Akrilamid i BIS su toksični, tako da sa njima treba postupati pažljivo! Polimer nije toksičan.

Osnovni uređaj za elektroforezu sastoji se od elektroforetske komore i izvora jednosmerne električne struje. Elektroforetska komora sadrži elektrolit i prostor za postavljanje gela. Poliakrilamidni gel se priprema u obliku ploča na staklu različitih dimenzija, koje su obično u vertikalnom položaju tokom elektroforeze.

Za odvajanje proteina prema veličini molekula, PAGE se koristi u okruženju natrijum-dodecil sulfata (SDS). SDS se veže za peptidne veze i osnovne grupe proteina, zbog čega svi proteini dobijaju skoro isti negativni naboj (tokom elektroforeze se kreću ka anodi), a u elektroforezi se zatim dele samo prema veličini svojih molekula – manji molekuli se kreću brže, veliki molekuli sporije. Ako se SDS i redukujuće supstance (2-merkaptoetanol, ditiotreitrol) dodaju proteinima praćenim termičkom denaturacijom, njihova trodimenzionalna konformacija je poremećena i molekuli poprimaju približno isti oblik. Proteini se mogu podeliti čak i bez prisustva SDS-a, u

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



ovom slučaju proteini se ne dele prema veličini molekula (tzv. Izvorna PAGE). U elektroforezi proteina pomoću SDS-PAGE-a, priprema se gel koji se sastoji od dva dela različitih koncentracija – koncentrovanijeg gela za razdvajanje (na dnu ploče) i manje koncentrovanog startnog gela. Gel bojenje se vrši sa specifičnim bojama, npr Coomassie Brilliant Blue R-250 ili bojenje sa srebro-nitratom (srebrno bojenje).

Pribor: epruvete, automatske pipete sa nastavcima, aparatura za vertikalnu diskontinuiranu elektroforezu, DC izvor napajanja

Hemikalije: TRIS baza, akrilamid, bisakrilamid, natrijumdodecil-sulfat, amonijum-peroksodisulfat (APS), tetrametilendiamin (TEMED), trihlorosirćetna kiselina, Coomassie Brilliant Blue R250, etanol

Rastvori

1M Tris-HCl pH 6,8	12.114 g TRIS dopunite do 100 ml vodom i pH podesite HCl-om
1M Tris-HCl pH 8,8	12.114 g TRIS dopunite do 100 ml vodom i pH podesite HCl-om
A-BIS Starter	7,29 g akrilamida + 0,125 g bisakrilamida dopunite do 100 ml d. vodom
AA-BIS deliaci	54,49 g akrilamida + 0,72 g bisakrilamida do 250 ml d. voda
10 % SDS	dopunite 5 g SDS-a do 50 ml vodom
2 % APS	0,02 g PSA + 1 ml redestilovane vode (sveže svaki dan!)
Elektroda uzorak	28,2 g glicina + 6 g Tris + 2 g SDS dopuniti do 2 l d. vodom

Sastojci gela za razdvajanje od 100 ml

38.1 ml	1 mol / dm ³ Tris-HCl, pH 8,8
58.27 cm	rastvor bisakrilamida (AA-BIS), (12,7 g akrilamida + 0,168 g bisakrilamida u zapremini od 58,27 ml)
1 ml	10% rastvor SDS
2.53 ml	1% rastvor APS
50 µl TEMED	Nakon što se gel za odvajanje polimerizuje, uklonite butanol i sipajte starter gel do gornjih ivica staklenih ploča.

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



Sastojci od 20 ml starter gela

2.47 ml	1 mol / dm ³ Tris-HCl, pH 6,8
16.6 ml	AA-BIS rastvor (1,21 g akrilamida + 20,8 mg bisakrilamida u zapremini od 16,6 ml)
0.2 ml	10% rastvor SDS
741 µl	1% rastvor APS
20 µl	TEMED

Sastav elektroforetskog rastvora

- 3 g Tris-HCl
- 14,1 g glicina
- 1 g SDS 10%, rastvorite i dopunite do 1000 ml destilovanom vodom, podesite pH = 8,3

Sastav rastvora za bojenje

- 95 ml 10% trihlorosirćetne kiseline i 5 ml 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 rastvora u etanolu.

Postupak

Priprema aparature za elektroforezu

1. Očistite staklene ploče toplom vodom i etanolom.
2. Koristite dve čaše nejednake veličine za pripremu ploča.
3. Nakon temeljnog čišćenja, povežite ih stezaljkama.

Priprema gela

1. Pripremite gelove za staklene ploče: podelu i fokusiranje.
2. Sipajte gel za podelu oko 1,5 cm ispod gornje ivice manje ploče. Da biste izravnali površinu gela, kapnite 3-5 kapi butanola. Ostavite gel za razdvajanje da se polimerizuje 30 minuta.
3. Nakon što se gel za razdvajanje polimerizuje, uklonite butanol i sipajte starter gel do gornje ivice staklenih ploča.
4. Starter gel se polimerizuje veoma brzo (u roku od 1 minuta), tako da se mora sipati na ploče što je brže moguće nakon pripreme. Nakon što se starter gel postavi, uklonite grebene sa ploča. Nanesite uzorke u količini od 5 µl na kanaliće koje su ostale u starter gelu nakon skidanja grebenova. Stavite pripremljene ploče sa deponovanim uzorcima u elektroforetsku komoru i dodajte rastvor i elektrode.

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



Razdvajanje proteina

1. Elektroforetsko razdvajanje se odvija pri jačini struje od 30 mA tokom 6-8 sati, na konstantnoj temperaturi od 15 °C, sve dok marker ne dođe do donje ivice gela.
2. Prvih 15 minuta se odvija pri jačini struje od 5 mA, sledećih 25 minuta na 10 mA, a ostatak vremena pri struji intenziteta od 40 – 60 mA.

Gel bojenje i vizualizacija proteina

1. Obojite sve frakcije proteina odvojene u SDS-PAGE u rastvoru pripremljenom mešanjem 95 ml 10% trihlorosirćetne kiseline i 5 ml 0,5% Coomassie Brilliant Blue R 250 rastvora u etanolu. Uklonite višak boje iz gela pranjem gelova u destilovanoj vodi 16 sati.

Upravljanje hemijskim supstancama

Hemikalije	Oblik supstance	H-oznake	P-oznake
HCl	Tečnost	H314, H335	P261, P280, P305, P351, P338, P304, P340, P310
C ₂ H ₅ OH	Tečnost	H225	P210, P233
Akrilamid	Čvrst	H301, H317, H340, H350, H361f, H372	P201, P280, P302, P352, P308, P313
Bisakrilamid	Čvrst	H301, H340, H350, H361fd, H372	P260, P280, P301, P31, P308, P313
Natrijumdodecil-sulfat (SDS)	Čvrst	H228, H311, H319, H335	P210, P261, P305, P351, P338, P280, P312
Amonijum-peroksodisulfat (APS)	Čvrst	H272, H302, H315, H317, H319, H302, H334, H335	P261, P280, P302, P313, P332, P338, P351, P352
Tetrametiletildiamin (TEMED)	Tečnost	H225, H302, H314, H331	P210, P280, P312, P303, P361, P353, P304, P340, P310, P305, P351, P338
Coomassie Brilljant plava	Čvrst	H319, H335	P261, P280, P305, P351, P338, P403, P233, P405, P501

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama

Akronim: ChemIQSoc

Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



Hemikalije	Oblik supstance	H-oznake	P-oznake
Trihlorosirćetna kiselina	Tečnost	H314, H335, H400, H410	P260, P280, P303, P304, P361, P353, P340, P310, P305, P351, P338

Izvori procene rizika i ozbiljnosti rizika

Većina hemikalija koje se koriste za pripremu gela su opasne i klasifikovane kao otrovi, tako da radimo sa njima veoma pažljivo i pridržavamo se svih pravila za rad sa opasnim supstancama. Koristimo ličnu zaštitnu opremu (rukavice, naočare, mantil).

Metoda upravljanja otpadom

Otpad koji nastaje tokom analize odlaže se u unapred određene posude.

Mere za ublažavanje rizika

Korišćenje lične zaštitne opreme (naočare, rukavice, mantil). Sa stanovišta zdravlja i sigurnosti na radu, korisno je kupiti gotove poliakrilamidne gelove koji više nisu toksični.

Literatura

1. CHŇAPEK, M.: *Upotreba proteinskih markera u identifikaciji, diferencijaciji i karakterizaciji genotipova letnje, durum pšenice i prolećnog ječma*. Doktorska disertacija. Nitra: SPU, 2007.

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



Radni list

Eksperimentalni podaci

1. Snimanje trenutne vrednosti u vremenskom intervalu od 15 min

Vreme [min]	Jačina struje [mA]	Vreme [min]	Jačina struje [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. Izmerite rastojanje elektroforetske ćelije (visina gela) od početka do kraja l

Proračuni

1. Zabeležite rastojanja mrlja standarda (od početka do centra mrlje) za svaki standard proteina a .

Molekulska težina	a [mm]	Molekulska težina	a [mm]

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



2. Uporedite rastojanja proteina u uzorcima sa standardima i identifikuju pojedinačne proteine.

Pitanja

1. Prema kom principu razdvajanja proteini su podeljeni u SDS-PAGE elektroforezi?
2. Za šta se koristi rastvor za bojenje?
3. Opišite koji radni elektroforetski parametri utiču na udaljenost koju prelaze proteini u akrilnom gelu.
4. Napišite od kojih delova / modula se sastoji elektroforetski uređaj.
5. Opišite pojedinačne principe elektroforeze.

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



6. Navedite izvore grešaka prilikom elektroforetskog rszdvajanja proteina. Predložite moguća rešenja.

Zaključak

Procenite svoj rad.

Naziv projekta: Digitalizacija hemijskih eksperimenata u cilju unapređenja kvaliteta i podrške nastavi hemije u srednjim školama
Akronim: ChemIQSoc
Broj projekta: 2021-1-SK01-KA220-WET-000027995



Izjava o odricanju od odgovornosti

Finansira Evropska unija. Izraženi stavovi su stavovi autora i ne izražavaju nužno stavove i mišljenja Evropske unije ili Slovačke akademske asocijacije za međunarodnu saradnju, Nacionalne agencije za obrazovanje i obuku Erasmus+ programa. Ni Evropska unija ni organizacija koja dodeljuje grantove ne preuzimaju nikakvu odgovornost za njih.