

## Názov: Delenie proteínov elektroforeticky v SDS-PAGE

### Návod na prácu

**Zadanie:** Rozdeľte frakcie zásobných bielkovín v SDS-PAGE a vyhodnoťte pomocou štandardov (markera).

### Teória

Elektroforetické metódy sú fyzikálno-chemické metódy, ktoré sa používajú na separáciu látok nesúcich elektrické náboje. Ak sa zmes takýchto látok vystaví v určitom prostredí pôsobeniu elektrického poľa, dochádza k pohybu molekúl. Ich pohyblivosť závisí od veľkosti náboja, veľkosti a tvaru molekúl, podmienok prostredia (napríklad charakter nosiča) a sily elektrického poľa. Veľkosť náboja molekuly ovplyvňuje stupeň ionizácie, pH a iónová sila prostredia.

Elektroforézou sa môžu deliť nízkomolekulové i vysokomolekulové látky. V molekulárnej biológii sa pri separácii látok používajú ako nosiče najčastejšie agarózové a polyakrylamidové gély. Gély majú charakter molekulových sít, čo umožňuje, aby sa pri elektroforéze rozdelili aj také látky, ktoré majú rovnaký náboj, ale rozličnú veľkosť molekúl. Podľa príslušného gélu rozlišujeme elektroforézu agarózovú a polyakrylamidovú (PAGE).

Polyakrylamidovú elektroforézu (PAGE) je možné využiť na separáciu nukleových kyselín i proteínov. Polyakrylamidový gél má veľmi dobré mechanické vlastnosti, je priesvitný, pri príprave sa dá zabezpečiť vyžadovaná veľkosť pórov, štruktúra gélu je veľmi dobre reprodukovateľná, má zo všetkých nosičov má najväčšiu rozlišovaciu kapacitu. Polyakrylamidový gél vzniká polymerizáciou základného akrylamidového monoméru a sieťovacieho monoméru N,N'-metylén-bis-akrylamidu. Akrylamid a BIS sú toxické, preto treba s nimi opatrne manipulovať! Polymér už nie je toxický.

Základné zariadenie na elektroforézu sa skladá z elektroforetickej komory a zdroja jednosmerného elektrického prúdu. Elektroforetická komora obsahuje elektrolyt a priestor na umiestnenie gélu. Polyakrylamidový gél sa pripravuje vo forme platní na sklách s rozličnými rozmermi, ktoré bývajú počas elektroforézy vo vertikálnej polohe.

Na separáciu proteínov podľa veľkosti molekúl sa využíva PAGE v prostredí dodecylsírany sodného (SDS). SDS sa viaže na peptidové väzby a zásadité skupiny proteínov, v dôsledku čoho všetky proteíny získajú skoro rovnako veľký záporný náboj (počas elektroforézy sa pohybujú k anóde) a pri elektroforéze sa potom delia len podľa veľkosti svojich molekúl – menšie molekuly sa pohybujú rýchlejšie, veľké molekuly pomalšie. Ak sa k proteínom pridá SDS a redukujúce látky (2-merkaptoetanol, ditiotreitól) s následnou tepelnou denaturáciou, rozruší sa ich trojrozmerná konformácia a molekuly zaujmú približne rovnaký tvar. Proteíny môžeme deliť aj bez prítomnosti SDS, v tomto prípade sa bielkoviny nedelia podľa veľkosti

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



molekuly (tzv. natívna PAGE). Pri elektroforéze proteínov pomocou SDS-PAGE sa pripravuje gél pozostávajúci z dvoch koncentračne odlišných častí – koncentrovanejší deliaci gél (v spodnej časti platne) a menej koncentrovaný štartovací gél. Farbenie gélu sa uskutočňuje špecifickými farbivami, napr. Coomassie Brilliant Blue R-250 alebo farbením pomocou dusičnanu strieborného (farbenie striebrom).

**Pomôcky:** skúmavky, automatické pipety so špičkami, aparátúra na vertikálnu diskontinuálnu elektroforézu Biometra, zdroj jednosmerného elektrického prúdu

**Chemikálie:** TRIS báza, akrylamid, bisakrylamid, dodecyl síran sodný, peroxodisíran amónny (APS), tetrametyléndiamín (TEMED), kyselina trichlóroctová, Coomassie Brilliant Blue R-250, etanol

#### Roztoky

1M Tris-HCl pH 6,8	12,114 g TRIS doplniť do 100 ml vodou a pH upraviť HCl
1M Tris-HCl pH 8,8	12,114 g TRIS doplniť do 100 ml vodou a pH upraviť HCl
A-BIS štartovací	7,29 g akrylamid + 0,125 g bisakrylamid doplniť do 100 ml d. vodou
AA-BIS deliaci	54,49 g akrylamid + 0,72 g bisakrylamid doplniť do 250 ml d. vodou
10 % SDS	5 g SDS doplniť do 50 ml d. vodou
2 % APS	0,02 g PSA + 1 ml redistilovanej vody (každý deň čerstvý!)
Elektródový roztok	28,2 g glycín + 6 g Tris + 2 g SDS doplniť do 2 l d. vodou

#### Zloženie 100 ml deliaceho gélu

38,1 ml	1 mol/dm <sup>3</sup> Tris-HCl, pH 8,8
58,27 ml	roztoku bisakrylamidu (AA-BIS), (12,7 g akrylamidu + 0,168 g bisakrylamidu v objeme 58,27 ml)
1 ml	10 % roztoku SDS
2,53 ml	1 % roztoku APS
50 µl TEMED	Po polymerizácii deliaceho gélu odstráňte butanol a nalejte štartovací gél až po horné okraje sklenených platní.

#### Zloženie 20 ml štartovacieho gélu

2,47 ml	1 mol/dm <sup>3</sup> Tris-HCl, pH 6,8
16,6 ml	roztoku AA-BIS (1,21 g akrylamidu + 20,8 mg bisakrylamidu v objeme 16,6 ml)

0,2 ml	10 % roztoku SDS
741 $\mu$ l	1 % roztoku APS
20 $\mu$ l	TEMED

#### *Zloženie elektroforetického roztoku*

- 3 g Tris-HCl
- 14,1 g glycínu
- 1 g SDS 10 %, rozpustiť a doplniť do 1000 ml destilovanou vodou, upraviť pH = 8,3

#### *Zloženie farbiaceho roztoku*

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

### **Postup**

#### *Príprava aparatúry na elektroforézu*

1. Očistite sklenené platne teplou vodou a etanolom.
2. Na prípravu platní použite dve nerovnako veľké sklá.
3. Po dôkladnom očistení ich spojte svorkami.

#### *Príprava gélu*

1. Pripravte gély do sklenených platní: deliaci a zaostrovací.
2. Nalejte deliaci gél asi 1,5 cm pod horný okraj menšej platne. Na vyrovnanie povrchu gélu nakvapkajte 3 – 5 kvapiek butanolu. Deliaci gél nechajte polymerizovať 30 minút.
3. Po polymerizácii deliaceho gélu odstráňte butanol a nalejte štartovací gél až po horný okraj sklenených platní.
4. Štartovací gél polymerizuje veľmi rýchlo (do 1 minúty), preto ho treba po príprave čo najrýchlejšie naliať do platní. Po stuhnutí štartovacieho gélu vyberte z platní hrebene. Do jamôk, ktoré ostali v štartovacom géli po hrebeni naneste vzorky v množstve 5  $\mu$ l. Pripravené platne s nanesenými vzorkami umiestnite do elektroforetickej komory a pridajte elektródový roztok.

#### *Separácia proteínov*

1. Elektroforetické delenie prebieha pri veľkosti prúdu 30 mA 6 – 8 hodín, pri konštantnej teplote 15 °C, až pokiaľ marker nedosiahne spodný okraj gélu.
2. Prvých 15 minút prebieha delenie pri veľkosti prúdu 5 mA, ďalších 25 minút pri 10 mA a ostatné hodiny pri veľkosti prúdu 40 – 60 mA.

### Farbenie gélu a vizualizácia bielkovín

1. Všetky frakcie bielkovín separované v SDS-PAGE farbíte v roztoku pripravenom zmiešaním 95 ml 10 % kyseliny trichlóroctovej a 5 ml 0,5 % roztoku Coomassie Brilliant Blue R 250 v etanole. Prebytočné farbivo z gélu odstráňte premývaním gélov v destilovanej vode po dobu 16 hodín.

### Nakladanie s chemickými látkami

Chemikália	Forma	H-vety	P-vety
HCl	Kvapalina	H314, H335	P261, P280, P305, P351, P338, P304, P340, P310
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Kvapalina	H225	P210, P233
Akrylamid	Tuhá	H301, H317, H340, H350, H361f, H372	P201, P280, P302, P352, P308, P313
Bisakrylamid	Tuhá	H301, H340, H350, H361fd, H372	P260, P280, P301, P31, P308, P313
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Tuhá	H228, H311, H319, H335	P210, P261, P305, P351, P338, P280, P312
Peroxodisíran amónny (APS)	Tuhá	H272, H302, H315, H317, H319, H302, H334, H335	P261, P280, P302, P313, P332, P338, P351, P352
Tetrametyletyléndiamín (TEMED)	Kvapalina	H225, H302, H314, H331	P210, P280, P312, P303, P361, P353, P304, P340, P310, P305, P351, P338
Coomassie Brilliant Blue	Tuhá	H319, H335	P261, P280, P305, P351, P338, P403, P233, P405, P501
Kyselina trichlóroctová	Kvapalina	H314, H335, H400, H410	P260, P280, P303, P304, P361, P353, P340, P310, P305, P351, P338

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



## **Zdroje rizík a vyhodnotenie závažnosti rizika**

Väčšina chemikálií použitých na prípravu gélu je nebezpečná a radená do skupiny jedov, preto s nimi pracujeme veľmi opatrne a s použitím všetkých pravidiel pre prácu s nebezpečnými látkami. Používame osobné ochranné prostriedky (rukavice, okuliare, plášť).

## **Spôsob nakladania s odpadmi**

Odpady vzniknuté pri analýze likvidujeme do vopred na to určených nádob.

## **Opatrenia k obmedzeniu rizika**

Použitie osobných ochranných prostriedkov (okuliare, rukavice, plášť). Z hľadiska bezpečnosti a ochrany zdravia pri práci je výhodné zakúpiť hotové polyakrylamidové gély, ktoré už nie sú toxické.

## **Literatúra**

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

## Pracovný list

### Experimentálne údaje

1. Zaznamenávajúte hodnoty prúdu v časovom intervale 15 min

Čas [min]	Prúd [mA]	Čas [min]	Prúd [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. Zmerajte vzdialenosť elektroforetickej cely (výška gélu) od začiatku po koniec  $l$

### Výpočty

1. Zaznamenajte vzdialenosti škvŕn štandardov (od začiatku po stred škvŕny) pre jednotlivé štandardy proteínov  $a$

Molekulová hmotnosť	$a$ [mm]	Molekulová hmotnosť	$a$ [mm]

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995




2. Zaznamenajte a porovnajte vzdialenosti škvŕn proteínov vo vzorkách so štandardami a identifikujte jednotlivé proteíny.

### Otázky

1. Podľa akého princípu separácie sa delia proteíny v SDS-PAGE elektroforéze.
2. Na čo slúži farbiaci roztok?
3. Opíšte, aké pracovné elektroforetické parametre ovplyvňujú prejdenú vzdialenosť proteínov v akrylátovom géle.
4. Napíšte z akých častí/modulov sa skladá elektroforetické zariadenie.
5. Opíšte jednotlivé elektroforetické princípy.

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



6. Uved'te chyby a ich zdroje pri elektroforetickom stanovení proteínov. Navrhnite možné riešenia.

### **Záver**

Zhrňte stručne cieľ práce a experimentálne výsledky. Zhodnot'te presnosť merania, identifikujte možné chyby a navrhnite spôsoby ich eliminácie.



**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



### **Vyhlásenie o vylúčení zodpovednosti**

Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a postoje sú názormi a vyhláseniami autora(-ov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory a stanoviská Európskej únie alebo Slovenskej akademickej asociácie pre medzinárodnú spoluprácu, Národnej agentúry programu Erasmus+ pre vzdelávanie a odbornú prípravu. Európska únia ani organizácia udeľujúca grant za ne nepreberajú žiadnu zodpovednosť.