



Katedra Farmacji Stosowanej  
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:  
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”

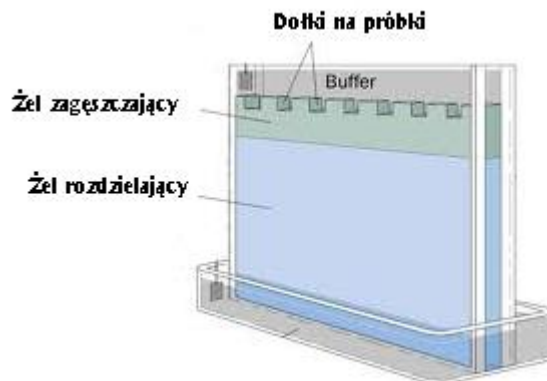
Farmacja  
2017

Katedra Farmacji Stosowanej  
Wydział Farmaceutyczny, WUM  
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa  
farmacjamolekularna@wum.edu.pl

# Analiza białek

## 1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

Żele poliakrylamidowe powstają w wyniku polimeryzacji dwóch składników: akrylamidu i N, N-metyleno-bisakrylamidu. Reakcja polimeryzacji jest inicjowana chemicznie, poprzez dodanie odczynników: nadsiarczanu amonu (APS) oraz TEMEDu. Rozdział elektroforetyczny białek na żelu poliakrylamidowym odbywa się poprzez dwustopniowy rozdział materiału (najpierw w żelu zagęszczającym - 4%, potem w żelu rozdzielającym - 10%) w warunkach denaturujących. Procentowość żelu rozdzielającego zależy od ilości akrylamidu/bis-akrylamidu i jest zależna od wielkości molekularnej poszukiwanego (analizowanego) białka.



Potrzebne materiały i odczynniki:

- statyw do wylewania żelu
- przyrząd do składania płytek
- 2 szklane szybki - mała i duża z wbudowanymi przekładkami
- etanol
- grzebień

**UWAGA!!** Grzebień powinien mieć grubość stosowanych przekładek!

- woda destylowana
- zlewki
- składniki żelu rozdzielającego
- składniki żelu zagęszczającego



**a) żel rozdzielający**

1,5M Tris/Cl pH 8.8	3,13 ml
Woda	5,03 ml
10% SDS	125 µl
Akrylamid:Bisakrylamid	4,18 ml
10% nadsiarczan amonu (APS)	42,5 µl
TEMED	8,5 µl

**b) żel zagęszczający**

0,5M Tris/Cl pH 6.8	625 µl
Woda	1,5 ml
10% SDS	25 µl
Akrylamid:Bisakrylamid	325 µl
10% nadsiarczan amonu (APS)	25 µl
TEMED	3,75 µl

- a) Przygotować mieszaninę żeli w dwóch osobnych zlewkach. Mieszaninę żelu zagęszczającego przygotować tuż przed użyciem tj. po spolimeryzowaniu żelu rozdzielającego.
- b) Przygotować przyrząd do formowania żelu poliakrylamidowego.
1. Szybki odłuszczyć etanolem
  2. Przyrząd do składania płytek ustawić pionowo na płaskiej powierzchni; zakładki powinny być w pozycji otwartej
  3. Mniejszą szybkę umieścić na większej, tak aby przekładki utworzyły przestrzeń pomiędzy płytkami, a napis na większej płytce był na górze
  4. Złożone płytki umieścić w przyrządzie do składania płytek i zamknąć zakładki, ściskając tym samym płytki.

**UWAGA!!** Na równej powierzchni, należy upewnić się, że płytki są równo złożone - zapobiegnie to wyciekaniu żelu

5. Przyrząd umieścić w plastikowym statywie, unosząc lekko jego górną część, która przytrzymuje złożone płytki. Podstawa płytek powinna przylegać do szarej uszczelki.

**UWAGA!!** Należy upewnić się, że płytki są równo złożone i dolna część płytek równo dociska do gumowej podstawki - zapobiegnie to wyciekaniu żelu

Należy unikać kontaktu gumowej podstawki z wodą - ulega odkształceniom!



- c) Przygotowany żel rozdzielający delikatnie wlewać w rogu do utworzonej przestrzeni, do ok 2 cm od góry
- d) Nawarstwić żel wodą (300  $\mu$ l) - zapobiega to deformacji dolnego żelu
- e) Polimeryzacja żelu rozdzielającego - 30 – 60 min
- f) Zlać wodę z żelu rozdzielającego i wlać w rogu przygotowany roztwór żelu zagęszczającego do granicy płytek
- g) Włożyć grzebień
- h) Polimeryzacja żelu zagęszczającego - 10 min

## 2. Izolacja białka

Potrzebne materiały i odczynniki:

- bufor RIPA
- lód
- wirówka

Skład buforu RIPA

**UWAGA!! Studenci otrzymują kompletny bufor RIPA (zawierający inhibitory proteaz)**

Odczynnik	Stężenie początkowe	Ilość (ml)	Stężenie końcowe
Tris Cl pH 7,5	1M	0,1	10mM
NaCl	5M	0,3	150mM
NP40	10%	1	1%
Deoksycholalan sodu	10%	0,5	0,5%
SDS	20%	0,05	0,1%
Woda	-	7,5	-
<b>Inhibitory proteaz - dodawać bezpośrednio przed użyciem - ilości na 10 ml buforu RIPA</b>			
PMSF	10 mg/ml	0,1	0,1 mg/ml
Aprotynina	1,7 mg/ml	0,3	0,51 mg/ml
Pepstatyna A	2 mg/ml	0,025	5 $\mu$ g/ml
Leupeptyna A	5 mg/ml	0,02	10 $\mu$ g/ml
Ortowanadan sodu	100 mM	0,1	1mM

- a) komórki rozmrozić na lodzie
- b) do eppendorfa zawierającego 1mln komórek dodać 50  $\mu$ l buforu RIPA
- c) pipetować mieszaninę w górę i w dół, aż do zawieszenia komórek w buforze
- d) mieszaninę inkubować w lodzie przez 30 min, wortexować co jakiś czas
- e) materiał zwirować (4°C, 12500rpm, 20 min)
- f) powstały supernatant przenieść do nowej probówki

**UWAGA!! Po odwirowaniu białka znajdują się w supernatancie!!!**



### 3. Denaturacja białka

Potrzebne materiały i odczynniki:

- bufor redukujący 5x (bufor Laemmliego 5x) - (10%  $\beta$ -merkaptoetanol; 10% SDS; 5% glicerol, 1M Tris pH 6,8; 0,4mg/ml Bromophenol Blue)
  - łaźnia wodna o temp 100°C lub termocykler
- a) próbkę badaną połączyć z buforem redukującym w stosunku 1:4 np. 20  $\mu$ l próby + 5  $\mu$ l buforu redukującego
  - b) Wymieszać próbkę na wortexie lub dokładnie przepipetować
  - c) przeprowadzić denaturację białek poprzez inkubację mieszaniny z pkt a) w łaźni wodnej lub termocyklerze o temp 100°C przez ok.5 min
  - d) po denaturacji próby należy ochłodzić przez ok 5 min, pozostawiając je na blacie
  - e) próby wytrząsnąć na wytrząsarce

### 4. Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE)

Potrzebne materiały i odczynniki:

- bufor do elektroforezy (Tris base, Glicyna, 10% SDS, Woda)
  - komora elektroforetyczna
  - żel poliakrylamidowy
  - wzmacniacz prądu
- a) Płytki wyciągnąć ze statywu oraz przyrządu do polimeryzacji i wpiąć je w stojak elektrodowy
  - b) Delikatnie usunąć grzebień, a powstałe dołki zalać buforem do elektroforezy
  - c) Długim tipsem wyczyścić każdą kieszeń z ewentualnych włókien żelu
  - d) Umieścić żele w stojaku elektrodowym w komorze elektroforetycznej
  - e) Wypełnij przestrzeń pomiędzy żelami buforem do elektroforezy do granicy obu płytek
  - f) Nawarstwić dołki z buforem badanymi próbami w ilości 16  $\mu$ l (próby muszą być zdenaturowane)
  - g) Zalać komorę elektroforetyczną buforem do elektroforezy (680 ml na 4 żele)
  - h) Podłączyć zasilacz. Elektroforezę prowadzić w warunkach:

22 V	5 min
30 V	10 min
60V	10 min
100 V	60 min



## 5. Oznaczenie stężenia białka metodą Bradforda

Potrzebne materiały i odczynniki:

- RIPA
- odczynnik Bradforda
- woda
- eppendorfy
- płytki 96-dołkowa
- spektrofotometr (czytnik płytek)

- a) przygotować 10x rozcieńczone próby: a) próbę badaną (nie zdenaturowaną próbkę białka) i b) bufor RIPA poprzez dodanie 2  $\mu$ l próby do 18  $\mu$ l wody. Dokładnie przepipetować.
- b) 5  $\mu$ l przygotowanych prób nałożyć na dołek pomiarowy w płytce 96 dołkowej
- c) dodać 200  $\mu$ l odczynnika Bradforda i delikatnie przepipetować
- d) dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm
- e) stężenie białka odczytać z krzywej wzorcowej
- f) obliczyć jaką masę białka rozdzielono na żelu poliakrylamidowym, uwzględniając objętość nakładanych prób na żel oraz rozcieńczenie buforem redukującym (bufor Laemmliego 5x)

**UWAGA!!** Studenci otrzymują gotową krzywą wzorcową o określonych parametrach ( $y=ax+b$ ; R)!

Odczytane stężenie białka:

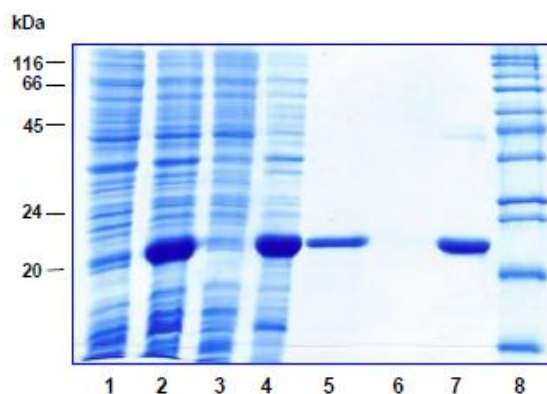
Miejsce na obliczenia:

## 6. Barwienie żeli barwnikiem Coomassie Brilliant Blue

Potrzebne materiały i odczynniki:

- szalki petriego
- barwnik Coomassie Brilliant Blue
- odbarwiacz (metanol, kwas octowy lodowaty, woda)
- woda destylowana

- a) Po zakończonej elektroforezie białek, odłączyć aparat do elektroforezy od prądu i wyciągnąć stojak elektrodowy z żelami
- b) wyciągnąć żele ze stojaka elektrodowego i delikatnie odrzucić mniejszą szybkę
- c) odciąć żel zagęszczający
- d) żel zanurzyć w szalce z wodą destylowaną
- e) zlać wodę i dodać 10 ml barwnika Coomassie Brilliant Blue
- f) Barwić żele ok 4 min delikatnie kołyszac szalkę
- g) zlać barwnik, a żel płukać w odbarwiaczu aż do wypłukania nie związanego barwnika. Podczas odbarwiania, roztwór odbarwiacza wymieniać kilkakrotnie.



Ryc. 2. Przykładowe wybarwienie białek rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym.