



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

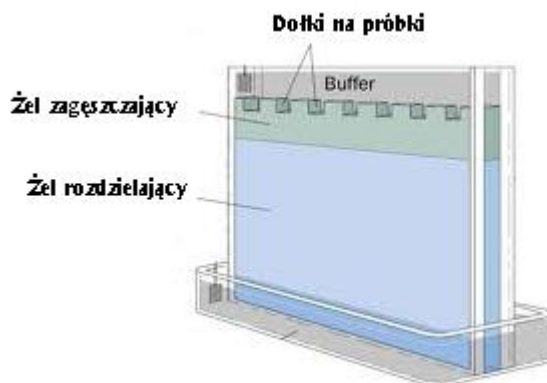
Farmacja
2017/2018

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 - zapobieganie 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 - zapobieganie 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 μ l) - zapobiega to deformacji dolnego żelu
- e) Polimeryzacja żelu rozdzielającego - 30 – 60 min
- f) Zlać wodę znad 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%
Deoksycholan sodu	10%	0,5	0,5%
SDS	20%	0,05	0,1%
Woda	-	7,5	-
Inhibitory proteaz - dodawać bezpośrednio przed użyciem - ilości na 10 ml buforu RIPA			
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 μ g/ml
Leupeptyna A	5 mg/ml	0,02	10 μ g/ml
Ortowanadan sodu	100 mM	0,1	1mM

- a) komórki rozmrozić na lodzie
- b) do eppendorfa zawierającego 1mln komórek dodać 50 μ 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, worteksować 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% β -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 μ l próby + 5 μ 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 próbkami w ilości 16 μ 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
- płytka 96-dołkowa
- spektrofotometr (czytnik płytek)

- a) przygotować 10x rozcieńczone próby: a) próbę badaną (nie zdenaturowaną próbkę białka) i b) bufor RIPA poprzez dodanie 2 μ l próby do 18 μ l wody. Dokładnie przepipetować.
- b) 5 μ l przygotowanych prób nałożyć na dołek pomiarowy w płytce 96 dołkowej
- c) dodać 200 μ 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:

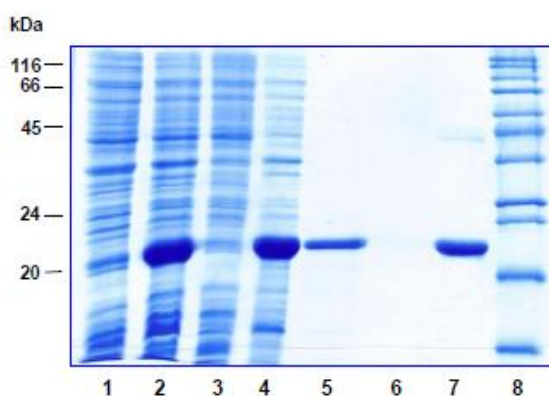
Miejsce na obliczenia:

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.