



Zakład Biologii Molekularnej
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”

Zakład Biologii Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. 22 572 0735, 606448502

Ćwiczenie 2

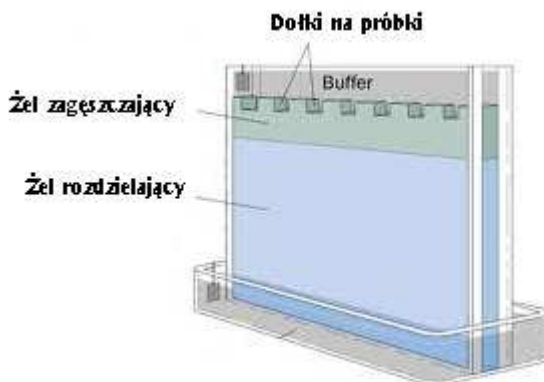
Izolacja i rozdział elektroforetyczny białek

1. Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

UWAGA!!! Roztwór akrylamidu jest silną neurotoksyną!

Rozdział elektroforetyczny białek na żelu poliakrylamidowym odbywa się poprzez dwustopniowy rozdział materiału (najpierw w żelu zagęszczającym 4%, potem w żelu rozdzielającym - 10%).

Jeden pełny żel (zagęszczający i rozdzielający) przygotowuje 5 osób.



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 w zlewce
- 2 kolby stożkowe płaskodenne
- składniki żelu rozdzielającego
- składniki żelu zagęszczającego

Przygotować przyrząd do formowania żelu poliakrylamidowego.

1. Szybki odtłuścić 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
4. Złożone płytki umieścić w przyrządzie do składania płytek i zamknąć zakładki, ściskając tym samym płytki
5. Przyrząd umieścić w plastikowym statywie, unosząc lekko jego górną część, która przytrzymuje złożone płytki

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!

a) żel rozdzielający

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

b) żel zagęszczający

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

- Przygotowany żel rozdzielający delikatnie wlewać w rogu do utworzonej przestrzeni, do ok 2 cm od góry
- Nawarstwić żel wodą (ok 300 μ l wody nalać wzdłuż ścianki mniejszej płytki) - zapobiega to deformacji dolnego żelu
- Polimeryzacja żelu rozdzielającego - min. 30 min
- Zlać wodę znad żelu rozdzielającego i wlać w rogu przygotowany roztwór żelu zagęszczającego do granicy płytek
- Włożyć grzebień
- Polimeryzacja żelu zagęszczającego - ok 10 min
- Przygotowane żele pozostawić na stole, aż do momentu przygotowania prób do wykonania elektroforezy

2. Izolacja białka

Potrzebne materiały i odczynniki:

- bufor RIPA
- lód
- wirówka

Skład buforu RIPA

UWAGA!! Studenci otrzymują kompletny bufor RIPA

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 µg/ml
Leupeptyna A	5 mg/ml	0,02	10 µg/ml
Ortowanadan sodu	100 mM	0,1	1mM

Izolacja białka z osadów komórkowych.

- komórki rozmrozić na lodzie
- odciągnąć od peletu komórek w eppendorfie pozostałość PBS
- do eppendorfa zawierającego 1mln komórek dodać buforu RIPA w takiej ilości aby uzyskać dość gęstą zawiesinę (ok 100 µl)
- mieszaninę inkubować w lodzie przez 30 min
- materiał zwirować (4°C, 12500rpm, 20 min)
- powstały supernatant przenieść do nowej probówki

Izolacja białka z tkanki.

- tkankę rozmrozić na lodzie
- przepłukać PBS
- dodać buforu RIPA wg wagi tkanki (2xwięcej niż objętość tkanki)
- tkankę zhomogenizować w homogenizatorze
- materiał zwirować (4°C, 12500rpm, 20 min)
- powstały supernatant przenieść do nowej probówki

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

3. Oznaczenie stężenia białka metodą Bradforda

Potrzebne materiały i odczynniki:

- RIPA
- odczynnik Bradforda
- woda
- eppendorfy
- spektrofotometr

- rozmrozić stock BSA 4mg/ml (20ul)
- przygotować krzywą wzorcową wg schematu poniżej

4mg/ml	2mg/ml	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,0625 mg/ml	0,03125 mg/ml	0,015625 mg/ml	próba 0		

c) próba 0:

woda	30 μ l
Odczynnik Bradforda	20 μ l
RIPA	30 μ l

d) próby badane:

woda	75 μ l
Odczynnik Bradforda	20 μ l
Próba badana	5 μ l

e) dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm

f) obliczyć jaką ilość białka należy wziąć do rozdziału elektroforetycznego aby mieć 25 μ g białka w studzience.

Odczytane stężenie białka:

Miejsce na obliczenia:

4. Denaturacja białka

Potrzebne materiały i odczynniki:

- bufor redukujący 2x (10% β -merkaptioetanol; 10% SDS; 5% glicerol, 1M Tris pH 6,8; 0,4mg/ml Bromophenol Blue)

➤ łaźnia wodna o temp 100°C

- a) próbkę badaną połączyć z buforem redukującym w stosunku 1:1 50 µl próby + 50 µl buforu redukującego
- b) przeprowadzić denaturację białek poprzez inkubację mieszaniny z pkt a) w łaźni wodnej o temp 100°C przez ok.5 min

UWAGA!! Wieczko eppendorfa należy przekłuć igłą - zapobiegnie to wystrzeleniu prób!

5. Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym

Potrzebne materiały i odczynniki:

- bufor do elektroforezy (Tris base, Glicyna, 10% SDS, Woda)
 - komora elektroforetyczna
 - 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) Nawarstwić dołki z buforem wzorcem wielkości w ilości 10 µl oraz badanymi próbkami w ilości 25 ug (próby muszą być zdenaturowane)
 - e) Stojak elektrodowy z nałożonymi próbkami przenieść do komory elektroforetycznej i zalać buforem do elektroforezy (680 ml na 4 żele)
 - f) Elektroforezę prowadzić w warunkach:

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

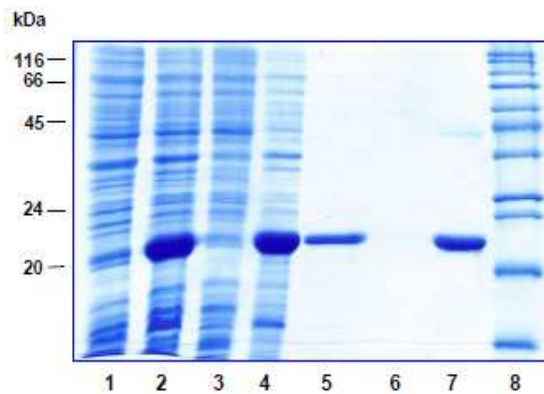
UWAGA!! Należy kontrolować opór elektryczny - dla żelu 10% powinien mieścić się w granicach 8-12 mA.

6. Barwienie żeli

Potrzebne materiały i odczynniki:

- szalka 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
 - c) delikatnie odrzucić mniejszą szybkę i odciąć żel zagęszczający
 - d) żel zanurzyć w szalce z wodą destylowaną
 - e) skalpelem odciąć część żelu z własnymi próbkami
 - f) na szalkę petriego wlać 2-3 ml barwnika Coomassie Brilliant Blue
 - g) do barwnika przełożyć żel i barwić ok 4 min

- h) zlać barwnik, a żel płukać w odbarwiaczu aż do wypłukania nie związanego barwnika
- i) wyniki omówić z asystentem uwzględniając wyliczone ilości białka



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