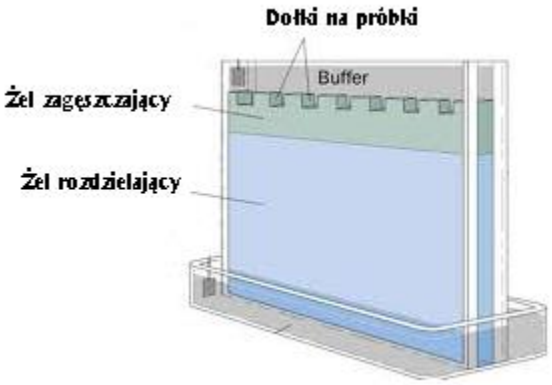
Materiały do ćwiczeń z przedmiotu:
„BIOLOGIA MOLEKULARNA”
Farmacja

Zakład Farmacji Stosowanej
Wydział Farmaceutyczny, WUM
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

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 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, 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 µl) - 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*

Przygotowanie buforu RIPA

Skład buforu RIPA: Tris Cl pH 7,5 (10mM), NaCl (150mM), NP40 (1%), Deoksycholan sodu (0,5%), SDS (0,1%), woda.

Kompletny bufor RIPA do izolacji białka zawiera mieszaninę inhibitorów proteaz, które dodawane są bezpośrednio przed użyciem.
Każdy student przygotowuje swój kompletny bufor RIPA wraz z inhibitorami według protokołu:

1. Do czystej probówki typu eppendorf przenieść 1000 ul buforu RIPA
2. Dodać 10 ul PMSF.
3. Mieszaninę przepipetować kilkukrotnie.
4. Dodać 30 ul aprotyniny.
5. Mieszaninę przepipetować kilkukrotnie.
6. Dodać 2,5 ul pepstatyny A.
7. Mieszaninę przepipetować kilkukrotnie.
8. Dodać 2 ul leupeptyny A.
9. Mieszaninę przepipetować kilkukrotnie.
10. Dodac 10 ul ortowanadanu sodu.
11. Mieszaninę przepipetować kilkukrotnie.

Izolację białka wykonać z osadów komórek według schematu wskazanego przez asystenta.

Schemat nr I

1. Komórki rozmrozić na lodzie.
2. Do eppendorfa zawierającego osad komórek dodać 50 µl przygotowanego buforu RIPA.
3. Pipetować mieszaninę w górę i w dół, aż do zawieszenia komórek w buforze.
4. Mieszaninę inkubować w lodzie przez 10 min.
5. Do próbki dodać 5 ul PMSF.
6. Mieszaninę przepipetować kilkukrotnie.
7. Mieszaninę inkubować przez 15 min w lodzie.
8. Próbkę zwirować (4˚C, 12500rpm, 10 min).
9. Powstały supernatant przenieść do nowej probówki.

Schemat nr II

1. Komórki rozmrozić na lodzie.
2. Do eppendorfa zawierającego osad komórek dodać 100 µl przygotowanego buforu RIPA.
3. Pipetować mieszaninę w górę i w dół, aż do zawieszenia komórek w buforze.
4. Mieszaninę inkubować w lodzie przez 10 min.
5. Do próbki dodać 5 ul PMSF.
6. Przepipetować mieszaninę kilkukrotnie.
7. Mieszaninę inkubować w lodzie przez 15 min.
8. Próbkę zwirować (4˚C, 12500rpm, 10 min).
9. Powstały supernatant przenieść do nowej probówki.

Schemat nr III

1. Butelki hodowlane z przyklejonymi komórki rozmrozić na lodzie.
2. Do butelek hodowlanych dodać 200 µl przygotowanego buforu RIPA.
3. Komórki zdrapać za pomocą zdrapaczki odrywając je od dna naczynia.
4. Komórki przenieść za pomocą pipety do eppendorfa.
5. Mieszaninę inkubować w lodzie przez 10 min.
6. Do próbki dodać 5 ul PMSF .
7. Przepipetować mieszaninę kilkukrotnie.
8. Mieszaninę inkubować w lodzie przez 15 min .
9. Próbkę zwirować (4˚C, 12500rpm, 10 min).
10. 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 µl próby + 5 µl buforu redukującego
b) Wymieszać próbkę na worteksie 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) Umieść 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 µl (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)

Czułość testu wynosi 0,1 – 1,4 mg/ml.

1. W czystym eppendorfie przygotować rozcieńczenia 10x wyizolowanych białek np. Do eppendorfa dodać 2 µl próby i 18 µl wody.
2. Próbki dokładnie przepipetować.
3. Próbki krótko zwirować.
4. 10 ul przygotowanych prób (rozcieńczone próbki białka lub medium komórkowe) przenieść do czystych eppendorfów.
5. Dodać 300 µl odczynnika Bradforda i delikatnie przepipetować.
6. Roztwór przenieść za pomocą pipety do kuwety pomiarowej.
7. Dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm.
8. Stężenie białka odczytać z krzywej wzorcowej.
9. Obliczyć jaką masę białka rozdzielono na żelu poliakrylamidowym, uwzględniając objętość nakładanych prób na żel oraz rozcieńczenie buforem redukującym (bufor redukujący 5x).

Przygotowanie krzywej wzorcowej:

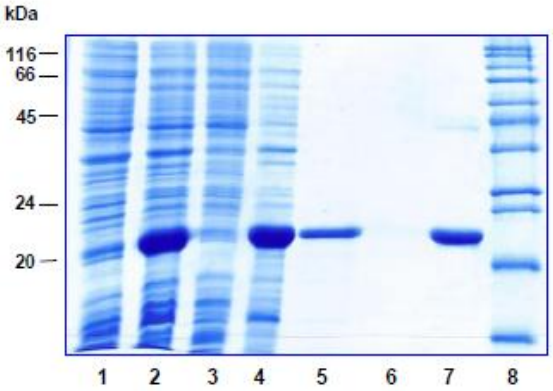
1. Przygotować stężenia roztworów wzorcowych BSA w ilości 1 ml:
   - 1,4 mg/ml
   - 0,7 mg/ml
   - 0,35 mg/ ml
   - 0,17 mg/ml

   1. Przygotować naważkę BSA (1,4 mg) w eppendorfie.
   2. Uzupełnić do 1 ml wodą.
   3. Przepipetować mieszaninę.
   4. Korzystając z szeregu rozcieńczeń przygotować 3 kolejne rozcieńczenia:
      a) Przygotować 4 próbówki 1,5 ml i podpisać od 1-4;
      b) Do każdej przenieść po 500 µl wody;
      c) Do 1 próbówki dodać 500 ul roztworu BSA o stężeniu 1,4 mg/ml;
      d) Przepipetować 15 razy, nie zmieniając końcówki przenieść 500 µl do probówki nr 2;
      e) Powtórzyć punkty c, d) aż do osiągnięcia stężenia 0,17 mg/ml.
2. Przygotować mieszaninę roztworów wzorcowych BSA z odczynnikiem Bradforda
   1. 10 ul wzorcowych roztworów (przygotowane wcześniej) połączyć z 300 ul odczynnika Bradforda w eppendorfie.
   2. Próbki dokładnie przepipetować.
   3. Próbki krótko zwirować.
   4. Roztwór przenieść do kuwety pomiarowej.
   5. Dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm.
   6. Wykreślić krzywą wzorcową na komputerze w programie Excel.

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 kołysząc szalkę
g) zlać barwnik, a żel płukać w odbarwiaczu aż do wypłukania nie związanego barwnika. Podczas odbarwiania, roztwór odbarwiacza wymieniać kilkukrotnie.



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