

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ



UMCS
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ



Biomateriały

**Ćwiczenia dla studentów III roku inżynierii nowoczesnych
materiałów**

LUBLIN 2018

Wersja 1.0

Spis treści:

1. Produkcja rekombinowanego ludzkiego białka P2 w komórkach *Escherichia coli*.
 - 1.1 Hodowla komórek *E. coli*.
 - 1.2 Dezintegracja i frakcjonowanie komórek.
 - 1.3 Oznaczanie stężenia białka metodą Bradford.
 - 1.4 Oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa.
2. Elektroforeza jednokierunkowa białek w warunkach denaturujących (SDS/PAGE)
3. Identyfikacja białek metodą Western Blot.

1. PRODUKCJA REKOMBINOWANEGO LUDZKIEGO BIAŁKA P2 W KOMÓRKACH *Escherichia coli*

Systemy ekspresji rekombinowanych białek w komórkach *E. coli* należą do najczęściej stosowanych m. in. ze względu na dobrze poznany układ transkrypcyjny i translacyjny, czy możliwość prowadzenia hodowli na tanich podłożach z wykorzystaniem prostych czynników selekcyjnych jakimi są antybiotyki.

Rybosomalne białko P2 *Homo sapiens* poddane heterologicznej ekspresji w układzie pET (opartym o komórki *E. coli*) produkowane jest w postaci białka fuzyjnego z dołączoną etykietą histydynową (6xHis-tag), umożliwiającą jego późniejsze oczyszczanie na drodze chromatografii powinowactwa. Etykieta histydynowa jest krótkim homeopeptydem zbudowanym z sześciu reszt histydynowych dołączonych do C- lub N- końca białka rekombinowanego. Przyłączenie etykiety odbywa się na etapie konstrukcji wektora ekspresyjnego, kiedy to do sekwencji DNA kodującej białko poddawane heterologicznej ekspresji dołącza się fragment DNA kodujący sześć reszt histydyny. Gen kodujący ludzkie białko P2 na plazmidzie pET znajduje się pod kontrolą promotora dla polimerazy RNA z faga T7. Ekspresja uruchamiana jest przez dodanie do pożywki syntetycznego induktora IPTG (izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd) w stężeniu 0,5 mM, gdy hodowla *E. coli* osiągnie wartość $OD_{600\text{ nm}}$ równą 0,6-0,8. Po czterech godzinach od indukcji komórki bakterii odwirowuje się, a następnie poddaje frakcjonowaniu w celu oczyszczenia eksprymowanego białka.

Frakcjonowanie komórek to metoda rozdzielania struktur subkomórkowych polegająca na wstępnej dezintegracji oraz poddaniu homogenatu wirowaniu różnicowemu (kilkukrotnemu wirowaniu ze stopniowo wzrastającą siłą odśrodkową) albo wirowaniu w gradiencie sacharozy czy chlorku cezu (poszczególne struktury subkomórkowe osadzają się w roztworze o różnej gęstości). Frakcjonowanie komórek stanowi ważną metodę w dziedzinie proteomiki, gdyż ułatwia badanie lokalizacji białek i pozwala na wzbogacenie uzyskanego preparatu w białka występujące w komórce w niskim stężeniu.

1.1 Hodowla komórek *E. coli*

Do kolby zawierającej 100 ml płynnego podłoża LB z dodatkiem ampicyliny wprowadzić 1 ml całonocnej hodowli szczepu BL21 *E. coli* i całość inkubować w warunkach ciągłego wytrząsania w temperaturze 37°C. Po osiągnięciu przez hodowlę OD₆₀₀ około 0,6 - 0,8 indukować ekspresję poprzez dodanie IPTG w stężeniu 0,5 mM i dalej inkubować przez 4 godziny. Po tym czasie hodowlę odwirować przy 10 000 rpm przez 10 minut w temperaturze 4°C. Osad przechowywać w temp. -20°C.

1.2 Dezintegracja i frakcjonowanie komórek

W celu wyizolowania pożądaných cząsteczek (białka, kwasy nukleinowe) znajdujących się wewnątrz komórek przeprowadza się proces dezintegracji, polegający na uwolnieniu danej makromolekuły z komórek poprzez rozbicie barier zewnętrznych takich jak ściana komórkowa czy błona komórkowa. Wybór metody dezintegracji komórek zależy głównie od rodzaju materiału biologicznego, który poddany będzie dezintegracji (komórki ssące, roślinne, drożdżowe, bakteryjne, tkanka, organ), co wynika z obecności lub braku ściany komórkowej (komórki bakteryjne i komórki ssące) bądź też różnic w jej budowie (komórki roślinne i komórki drożdżowe). Niezależnie od metody dezintegracji uwolnienie interesujących nas cząsteczek powinno przebiegać z wysoką wydajnością przy jednoczesnym zachowaniu ich właściwości biologicznych, dlatego też komórki przed dezintegracją zawieszane są w odpowiednim roztworze buforującym, który stabilizuje cząsteczki i chroni je przed degradacją.

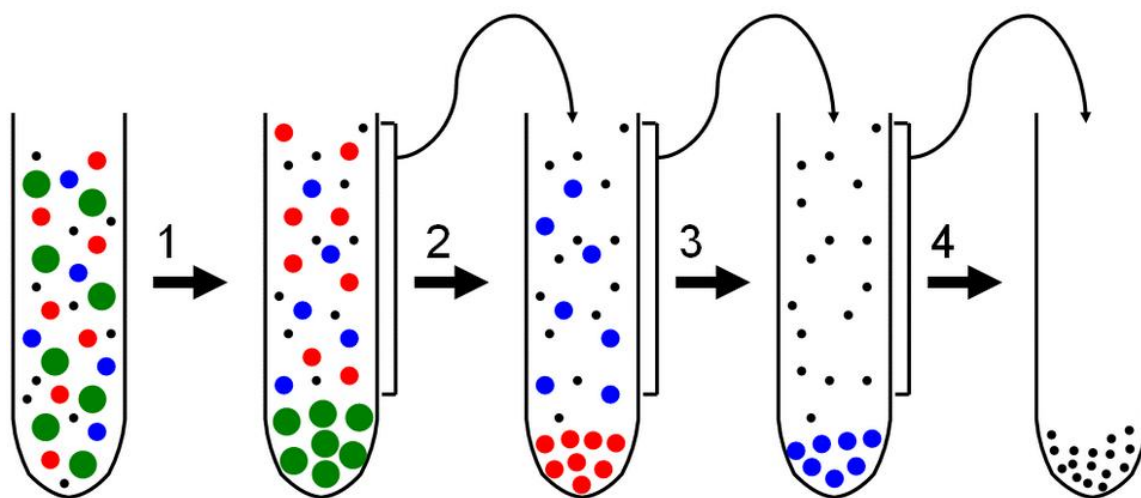
Do najczęściej stosowanych metod dezintegracji komórek zaliczamy: homogenizację, rozcieranie, wytrząsanie z kulkami szklanymi, sonikację, szok osmotyczny, zamrażanie-rozmrażanie (metody fizyczne); trawienie enzymatyczne (metody biologiczne); liza alkaliczna, liza detergentami (metody chemiczne).

Metoda	Zasada metody	Materiał biologiczny
Homogenizacja	Dezintegracja mechaniczna przy użyciu	Miękkie tkanki

	homogenizatora (Dounce'a, Potter-Elvehjema)	i komórki zwierzęce
Sonikacja	Dezintegracja mechaniczna za pomocą fal dźwiękowych wysokiej częstotliwości (ultradźwięki)	Komórki bakteryjne, zwierzęce
Wytrząsanie z kulkami szklanymi	Dezintegracja mechaniczna za pomocą kulek szklanych wytrząsanych w zawiesinie komórek	Komórki drożdżowe
Szok osmotyczny	Dezintegracja mechaniczna poprzez zawieszenie komórek w roztworze hipotonicznym	Komórki pozbawione ściany komórkowej
Trawienie enzymatyczne	Degradacja ściany komórkowej poprzez działanie enzymów: lizozym (bakterie), glukanaza (drożdże)	Komórki bakteryjne i drożdżowe
Liza alkaliczna	Chemiczna dezintegracja ścian i błon komórkowych na skutek działania roztworu NaOH-SDS	Komórki bakteryjne
Liza detergentami	Chemiczna dezintegracja błon komórkowych na skutek działania detergentów (Triton X-100, NP-40)	Komórki ssące
Zamrażanie-rozmrażanie	Dezintegracja mechaniczna ścian i błon komórkowych na skutek powstających wewnątrz komórki kryształów lodu	Komórki bakteryjne
Rozcieranie	Mechaniczna dezintegracja ścian i błon komórkowych na skutek ucierania komórek z substancjami ściernymi (piasek)	Komórki bakteryjne, drożdżowe, tkanki roślinne

W wyniku dezintegracji komórek białka, kwasy nukleinowe, lipidy, ulegają uwolnieniu z wnętrza komórki i przechodzą do roztworu. Aby odseparować interesujące nas cząsteczki od pozostałych składników komórki wykorzystuje się zjawisko sedymentacji cząstek o większej gęstości w roztworze o mniejszej gęstości pod wpływem działania siły odśrodkowej. W tej samej zawiesinie większe cząstki osiadają szybciej od mniejszych cząstek tej samej wielkości. Uzyskany po dezintegracji homogenat poddawany jest wirowaniu

różnicowemu (wirowaniu ze wzrastającą szybkością), w którym zawieszynę poddaje się najpierw wirowaniu przy niskich obrotach i przez krótki czas, a następnie supernatant nad uzyskanym w ten sposób osadem przenosi się do nowej probówki i wiruje dłużej przy większych obrotach, aby oddzielić cząstki mniejsze. W ten sposób niejednorodną zawieszynę można podzielić na kilka frakcji bardziej jednorodnych. W wyniku powtarzających się cykli wirowania z ekstraktu komórkowego sekwencyjnie uzyskuje się frakcję jądrową (1000xg przez 10 min), mitochondrialną (30000xg przez 20 min), cytoplazmatyczną (100000xg przez 1h) i rybosomalną (1000000xg przez 1h).



Rys. 1 Schemat wirowania różnicowego

Lepszą precyzję frakcjonowania uzyskuje się stosując wirowanie w gradiencie gęstości. W tym celu do probówek wirówkowych wprowadza się od dna ku górze tzw. roztwór rozdzielający (np. sacharoza) o malejącym stężeniu a tym samym malejącej gęstości. Na powierzchnię tego roztworu wprowadza się preparat, który ma zostać poddany separacji. Podczas wirowania rozdzielane cząsteczki będą przemieszczać się do warstwy roztworu rozdzielającego o gęstości równej gęstości tych cząstek.

Celem ćwiczenia jest dezintegracja komórek *E. coli* metodą sonikacji, otrzymanie frakcji białek cytoplazmatycznych *E. coli* zawierającej ludzkie białko P2 (hP2) z etykietką histydynową i oczyszczenie białka hP2 metodą chromatografii powinowactwa.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin

chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materialy i odczynniki

1. Hodowla komórek bakteryjnych (osad komórek w objętości 0,5 ml w probówce typu Falcon o poj. 15 ml)
2. Sonikator
3. Bufor PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,5)
4. 100 mM PMSF
5. 0,5 M EDTA
6. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet

Wykonanie ćwiczenia

Uwaga! Poniższe czynności należy wykonywać w temp. + 4° C

Dezintegracja komórek bakteryjnych ultradźwiękami (sonikacja)

1. Osad komórek bakteryjnych w probówce typu Falcon o poj. 15 ml zawiesić przez pipetowanie w 5 ml oziębionego buforu PBS z dodatkiem 1 mM PMSF (inhibitor proteaz serynowych) i 5 mM EDTA (chelator jonów dwudodatnich niezbędnych do aktywności proteaz komórkowych).
2. Uzyskaną zawiesinę komórek umieścić w lodzie i dezintegrować z wykorzystaniem sonikatora. Proces sonikacji prowadzić w cyklach po 30s dezintegracji i 30s przerwy na chłodzenie w lodzie (min. 5 cykli przy amplitudzie 60%).
3. Następnie, uzyskany dezintegrat komórek, przenieść do probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 ml i poddać wirowaniu przy 12000 rpm przez 10 min. w 4°C w celu osadzenia niezdezintegrowanych komórek oraz dużych fragmentów błoniastych.
4. Odebrać 100 µl uzyskanego supernatantu (frakcja S30) do probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml, a pozostałą część supernatantu wirować przy 400000 x g przez 30 min. w 4°C. W wyniku wirowania otrzymuje się frakcję cytoplazmatyczną (frakcja S100).

5. Uzyskany supernatant przenieść do probówki typu Eppendorf. Oznaczyć stężenie białka metodą Bradford w obu frakcjach: S30 i S100, a następnie przygotować próbki do elektroforezy SDS/PAGE zawierające po 30 µg białka w objętości 30 µl. Dodać do próbek po 10 µl buforu próbkowego (4x stężonego) i wymieszać. Następnie, próbki ogrzewać przez 3 min. w temp. 90°C. Probki przechowywać w temp. -20°C do kolejnych ćwiczeń.

1.3 Oznaczanie stężenia białka metodą *Bradford*

Metoda ta pozwala na szybkie oznaczenie stężenia białka w roztworze. W metodzie *Bradford* wykorzystywana jest zdolność białka do tworzenia kompleksu z barwnikiem zwanym błękitem *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue*). Błękit *Coomassie* w środowisku kwaśnym posiada zabarwienie brunatne, które zmienia się na błękitne w reakcji z białkiem. Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka. Absorbencję powstałego kompleksu barwnego odczytuje się w zakresie światła widzialnego przy długości fali 595 nm.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Odczynnik *Bradford* (preparat handlowy)
2. Roztwór wzorcowy albuminy wołowej o stężeniu 100µg/ml
3. Roztwór badanego białka
4. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet

Wykonanie ćwiczenia

- a) wykreślenie krzywej wzorcowej

Przygotować 8 ponumerowanych probówek, do których odmierzyć (według tabeli) następujące ilości roztworu białka wzorcowego i wody destylowanej:

Nr probówki	1	2	3	4	5	6	7	8
Wzorzec albuminowy (μl)	20	40	80	100	120	160	200	0
Woda (μl)	780	760	720	700	680	640	600	800
Ilość białka w próbce (μg)	2	4	8	10	12	16	20	0

Do wszystkich probówek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradford* i dokładnie wymieszać.

Po upływie 5 min, zmierzyć absorpcję w kolorymetrze przy długości fali 595nm.

Pomiarów dokonywać względem próby kontrolnej (nr 8). Wykreślić krzywą wzorcową odkładając na osi odciętych (X) stężenia białka, a na osi rzędnych (Y) wartości absorpcji.

b) wykonanie pomiaru w badanej próbce białka.

Do dwóch probówek odmierzyć 2 – 20 μl badanego roztworu białka (zgodnie z zaleceniami prowadzącego ćwiczenia) i uzupełnić wodą do objętości 0,8 ml. Do wszystkich probówek dodać po 0,2 ml odczynnika *Bradford* i dokładnie wymieszać. Po upływie 5 min, zmierzyć absorpcję w kolorymetrze przy długości fali 595 nm.

Stężenie białka odczytać z przygotowanej krzywej wzorcowej.

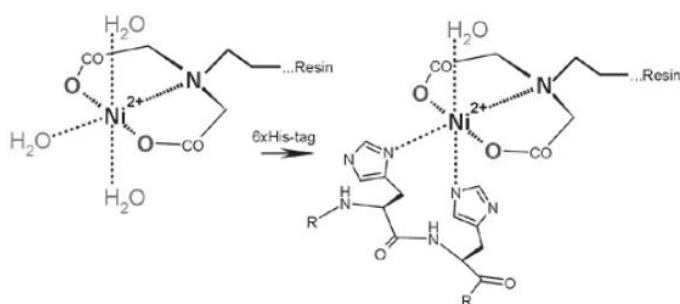
1.4 Oczyszczanie ludzkiego białka P2 metodą chromatografii powinowactwa

Oczyszczanie białek jest skomplikowanym procesem, w którym wykorzystuje się zarówno fizyczne jak i chemiczne właściwości danej cząsteczki. Białka oczyszcza się głównie w oparciu o takie ich cechy jak: wielkość, rozpuszczalność, ładunek i specyficzne powinowactwo wiązania. Cząsteczki białkowe najczęściej rozdziela się wykorzystując chromatografię cieczową, gdzie wyróżnia się kilka typów: chromatografia sączenia molekularnego, jonowymienną, oddziaływań hydrofobowych czy powinowactwa.

Chromatografia powinowactwa jest szczególnym typem chromatografii adsorpcyjnej wykorzystującym wzajemne powinowactwo dwóch substancji. Ze względu na wysoką unikalność tych reakcji metoda ta pozwala znacznie uprościć proces oczyszczania białka przy jednoczesnym zachowaniu jego biologicznej aktywności. Wyróżnia się kilka typów interakcji substancji rozpuszczonej będącej w fazie ruchomej z unieruchomionym ligandem, takich jak: hormon-receptor, enzym-substrat, enzym-inhibitor, przeciwciało-antygen, kw. nukleinowe-białka, komplementarne odcinki kw. nukleinowych, lektyny-glikoproteiny, itp. W technice tej nie ma znaczenia, który z nich wybrany zostanie jako ligand. Chromatografię powinowactwa przeprowadza się zwykle w dwóch etapach. W pierwszym, nanosi się rozdzielany materiał na kolumnę wypełnioną złożem. Przemieszczające się wzdłuż kolumny cząsteczki wiążą się do złoża a po odpłukaniu nieswoiście zaadsorbowanych cząsteczek rozpoczyna się drugi etap, w którym następuje dysocjacja powstałych kompleksów ligand-oczyszczane białko i elucja oczyszczanego białka. Dysocjacji można dokonać na kilka sposobów. Pierwszym z nich jest zastosowanie specyficznego eluenta, zawierającego czynnik kompetencyjny, współzawodniczący o to samo miejsce wiązania co oczyszczana cząsteczka. Inną metodą jest elucja w sposób niespecyficzny, z pomocą buforów o wysokiej lub niskiej wartości pH, roztworów o wysokiej sile jonowej czy związków chaotropowych (rozrywających wiązania wodorowe). Po zakończeniu elucji należy usunąć z roztworu białka stosowane do elucji substancje na drodze dializy lub filtracji żelowej.

Celem ćwiczenia jest oczyszczenie rekombinowanego ludzkiego białka P2 zawierającego etykietkę 6xHis na drodze chromatografii powinowactwa na złożu niklowym Ni-NTA IMAC (ang. *immobilized metal affinity chromatography*).

Oczyszczanie białka fuzyjnego zawierającego etykietkę histydynową opiera się na powinowactwie pierścieni imidazolowych zawartych w resztach histydyny do immobilizowanych na złożu chromatograficznym jonów metali (Ni, Co, Zn).



Opisana procedura oczyszczania jest wariantem oczyszczania białka w warunkach natywnych. Preparatem wyjściowym jest **frakcja rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych** (supernatant po ultrawirowaniu, S-100). Preparat ten po rozmrożeniu należy odwirować (12 tys. rpm./10 min./4⁰C) w celu usunięcia wytrąconych w trakcie zamrażania / rozmrażania białek.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Frakcja białek cytoplazmatycznych *E. coli* zawierająca białko hP2 z etykietką histydynową
2. 50% zawiesina złoża NiNTA
3. Bufor B (do wiązania białka do złoża NiNTA) – 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5mM imidazol; pH 8
4. Bufor W (do płukania złoża NiNTA) – 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol; pH 8
5. Bufor E (do elucji związanych ze złożem NiNTA białek) - 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol; pH 8
6. Probówki typu Falcon o poj. 15 ml
7. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet

Wykonanie ćwiczenia

Przygotowanie złoża chromatograficznego NiNTA

1. Pobrać 300 ul 50% zawiesiny złoża NiNTA do probówki typu Falcon o poj. 15 ml.
2. Odwirować próbkę przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek.
3. Supernatant usunąć, a osad ze złoża delikatnie zawiesić w 500 µl buforu B

4. Próbkę ponownie odwirować przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek i usunąć supernatant.

Wiązanie białka do złoża, płukanie i elucja

1. Do przygotowanego złoża NiNTA należy dodać 2 ml preparatu rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych, delikatnie wymieszać i inkubować w lodzie 20 min.
2. Po zakończeniu inkubacji preparat odwirować przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek a supernatant zebrać do nowej probówki jako tzw. frakcję białek nie wiążących się ze złożem (ang. *flow through fraction*),
3. Do osadu złoża dodać 5 ml buforu płuczającego W, zawiesinę delikatnie wymieszać i następnie odwirować przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek w celu usunięcia białek niespecyficznie wiążących się ze złożem.
4. Po odwirowaniu supernatant zebrać do nowej probówki jako tzw. frakcję białek odpłukanych ze złoża (ang. *wash 1*)
5. Do osadu złoża ponownie dodać 5 ml buforu płuczającego W, zawiesinę delikatnie wymieszać i następnie odwirować przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek w celu usunięcia białek niespecyficznie wiążących się ze złożem.
6. Po odwirowaniu supernatant zebrać do nowej probówki jako tzw. frakcję białek odpłukanych ze złoża (ang. *wash 2*)
7. Do osadu złoża dodać 400 µl buforu elucyjnego E, zawiesinę delikatnie wymieszać i inkubować w lodzie przez 5 min., a następnie odwirować przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek. w celu uwolnienia specyficznie związanego białka
8. Po odwirowaniu supernatant zebrać jako preparat białek eluowanych ze złoża (ang. *elution 1*).
9. Do osadu złoża ponownie dodać 400 µl buforu elucyjnego E, zawiesinę delikatnie wymieszać i inkubować w lodzie przez 5 min., a następnie odwirować przy 1.5 tys. rpm przez 45 sek.
10. Po odwirowaniu supernatant zebrać jako preparat białek eluowanych ze złoża (ang. *elution 2*), po czym złoże zebrać do wspólnego naczynia w celu jego późniejszej regeneracji.
11. Zmierzyć stężenie białka w otrzymanym preparacie i przygotować próbkę do elektroforezy SDS/PAGE.

2. ELEKTROFOREZA JEDNOKIERUNKOWA BIAŁEK W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS/PAGE)

Elektroforeza białek umożliwia monitorowanie składu mieszaniny białek, sprawdzanie czystości białek, oznaczanie masy cząsteczkowej, analizy struktury podjednostkowej czy określenie punktu izoelektrycznego białka. W analizie białek stosowane są żele poliakrylamidowe. Żel poliakrylamidowy posiada następujące cechy: jest bezbarwny, pozbawiony ładunków, odznacza się dużą wytrzymałością mechaniczną, łatwy w przygotowaniu i formowaniu w odpowiednich naczyniach. Żel poliakrylamidowy to łańcuchy akrylamidu ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) połączone wiązaniami poprzecznymi za pomocą N,N'-metyleno-bis-akrylamidu ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). W ten sposób tworzy się sieć, przez „oczka” której migrują rozdzielane cząsteczki. Wielkość „oczek” sieci żelu zależy od stężenia akrylamidu oraz bisakrylamidu. Polimeryzacja żelu odbywa się w obecności nadsiarczanu amonu (APS) oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED). Rozdział białek może być jednokierunkowy (1D) – lub dwukierunkowy (2D).

Elektroforeza jednokierunkowa w żelu poliakrylamidowym (PAGE) umożliwia rozdział cząsteczek białkowych różniących się wielkością i ładunkiem elektrycznym. Rozdział ten można prowadzić w warunkach niedenaturujących oraz w warunkach denaturujących. Elektroforeza białek w warunkach denaturujących określana skrótem SDS-PAGE odbywa się w obecności soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS), który jest detergentem jonowym. SDS łącząc się z grupami hydrofobowymi aminokwasów nadaje białkom ładunek ujemny. Sprawia to, że migrują one w kierunku dodatniej anody. Ilość związanego SDS jest proporcjonalna do wielkości cząsteczek białkowych. Dzięki temu rozdzielają się one w żelu pod względem masy cząsteczkowej. Polipeptydy o niższej masie cząsteczkowej migrują szybciej, zaś większe wolniej. Metoda SDS-PAGE stosowana jest między innymi do: identyfikacji i monitorowania składu mieszaniny białek, sprawdzania jednorodności (homogenności) białek, oznaczania masy cząsteczkowej białek, analizy struktury podjednostkowej aktywnych biologicznie kompleksów białkowych.

Celem ćwiczenia jest sprawdzenie czystości otrzymanego preparatu ludzkiego białka P2 metodą elektroforezy białek w warunkach denaturujących SDS/PAGE. Żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi białkami należy podzielić na dwie części, z których jedną należy wybarwić barwnikiem *Coomassie Brilliant Blue*, a drugą przeznaczyć do identyfikacji rybosomalnego białka P2 metodą Western Blot.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materialy i odczynniki

1. 30% roztwór akrylamidu + 0,8% roztwór bisakrylamidu
2. 1,5M roztwór Tris - HCl pH 8,8
3. 0,5M roztwór Tris - HCl pH 6,8
4. 10% roztwór SDS
5. 10% roztwór APS
6. TEMED
7. Bufor próbkowy (4x stężony) :

1,25M roztwór Tris-HCl pH 6,8	0,5ml
Glicerol	1,0ml
10% roztwór SDS	2,0ml
DTT	154mg
H ₂ O	1,3ml
1% roztwór błękitu bromofenolowego	200μl
8. Bufor elektrodowy:

Glicyna	14,4g
Tris	3,0g
SDS	1,0g

 uzupełnić wodą do 1000ml
9. Wzorce białkowe
10. Zestaw do elektroforezy białek

Przygotowanie żelu i próbek białkowych

Umyte i odtuszczone specjalne płytki szklane do elektroforezy złożyć zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia. Przygotować żel poliakrylamidowy według przepisu:

Uwaga! Pracę z akrylamidem wykonywać w rękawicach ochronnych.

Roztwory dodawać wg przedstawionej kolejności.

TEMED – inicjator polimeryzacji, dodawać jako ostatni składnik, bezpośrednio przed wylaniem mieszaniny między płytki !

Żel separujący

ODCZYNNIK	Żel 12% (8 ml)
H ₂ O	2,6 ml
30% akrylamid + 1% bisakrylamid	3,2 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,0 ml
10% SDS	80 µl
10% APS	80 µl
TEMED	8 µl

Żel zagęszczający

ODCZYNNIK	na 2,5 ml żelu
H ₂ O	1,3 ml
30% akrylamid + 1% bisakrylamid	0,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,625 ml
10% SDS	25 µl
10% APS	25 µl
TEMED	2,5 µl

Polimeryzację żelu wykonać między przygotowanymi płytkami szklanymi, zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia .

Próbki do analizy przygotować w następujący sposób: do każdej próbki Eppendorfa zawierającej analizowane białka lub wzorce białkowe (1-30 μg białka w objętości 30 μl) dodać po 10 μl buforu próbkowego (4x stężonego) i wymieszać. Następnie, próbki ogrzewać przez 3 min. w temp. 90°C. Bufor próbkowy zawierający SDS i DTT niszczy strukturę natywną białek w podwyższonej temperaturze.

Płytkę ze spolimeryzowanym żelem poliakrylamidowym umieścić w aparacie do elektroforezy. Aparat napełnić buforem elektrodowym. Przygotowane próbki białkowe ostrożnie nanieść do studzienek w żelu zagęszczającym. Rozdział prowadzić pod napięciem 150V tak długo, aż barwnik przesunie się do końca żelu separującego. Wyłączyć zasilacz, wyjąć płytkę z żelem do wybarwienia i transferu białek na membranę nitrocelulozową.

3.1 Barwienie białek po rozdziale elektroforetycznym

Celem uwidocznienia oraz identyfikacji rozdzielonych prążków białkowych, żel poliakrylamidowy po elektroforezie poddaje się barwieniu. Najczęściej stosuje się tu roztwór barwnika *Coomassie* lub barwienie metodą srebrową .

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

A. Barwienie błękitem *Coomassie*

Odczynniki

Mieszanina barwiąca:

Metanol	400 ml
Kwas octowy	100 ml
H ₂ O	500 ml

Błękit *Coomassie* 2,5 g

Odbarwiacz:

Metanol 400 ml

Kwas octowy 100 ml

H₂O 500 ml

Wykonanie ćwiczenia

Wyjęty żel poliakrylamidowy umieścić w roztworze barwnika na okres około 15-30 min. Po tym czasie, zlać barwnik, żel przepłukać wodą a następnie odbarwiać go roztworem odbarwiającym tak długo, aż widoczne staną się rozdzielone prążki białka. Po wybarwieniu żel wysuszyć. Barwienie błękitem *Coomassie* pozwala na wykrycie prążków białkowych zawierających około 0,1 µg białka. Czułość metody zależy w dużej mierze od zastosowanego przepisu barwienia.

3. IDENTYFIKACJA LUDZKIEGO BIAŁKA P2 METODĄ WESTERN BLOT.

Technika western blot, składa się z kilku etapów. Pierwszym etapem jest rozdzielenie mieszaniny białek w żelu poliakrylamidowym. Następnie białka przenoszone są na membranę (w naszym przypadku jest to transfer pół-suchy na membranę nitrocelulozową), która niespecyficznie wiąże wszystkie białka. Ostatnim etapem jest detekcja białek przy udziale przeciwciał.

Po rozdziale elektroforetycznym w obecności SDS (jonowego, naładowanego ujemnie, detergentu) białka są zdenaturowane i wszystkie posiadają ładunek ujemny proporcjonalny do ich masy. Transfer odbywa się zatem w kierunku elektrody dodatniej. Należy więc tak ułożyć membranę względem żelu, by znalazła się ona na drodze migracji białek z żelu. Po transferze wolne miejsca wiązania białek na membranie są blokowane, aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciał do membrany. Do blokowania membran używa się odtłuszczonego mleka lub albuminy z surowicy bydlęcej.

Badane białka identyfikuje się przy użyciu wyznakowanych przeciwciał pierwszorzędowych (swoistych dla badanych białek), lub niewyznakowanych przeciwciał pierwszorzędowych i wyznakowanych przeciwciał drugorzędowych (specyficznych dla

pierwszorzędowych). Następnie przeprowadza się detekcję przeciwciał związanych z badanymi białkami, której sposób zależy od rodzaju znacznika, jaki dołączony jest do przeciwciał. Najczęściej dołączanymi do przeciwciał znacznikami są enzymy: alkaliczna fosfataza i peroksydaza chrzanowa. Wizualizacja tych znaczników może być przeprowadzona kolorymetrycznie (w miejscu związania przeciwciał do białka na membranie powstaje barwny produkt) lub chemiluminescencyjnie (enzym przeprowadza reakcję z wytworzeniem światła, odczytu ilości emitowanego światła można dokonać na dwa sposoby, stosując urządzenie do detekcji chemiluminescencji lub za pomocą kliszy fotograficznej).

W trakcie ćwiczeń przeprowadzimy identyfikację rekombinowanego ludzkiego białka P2. W tym celu wykorzystamy niewyznakowane przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające ludzkie białko P2 i przeciwciała drugorzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu. Karty charakterystyki dostępne są pod n/w adresami www:

<http://www.poch.com.pl> oraz <http://www.sigmaaldrich.com/poland.html>

W katalogu należy odszukać odpowiednią substancję a następnie pobrać dołączoną do niej kartę charakterystyki. Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały i odczynniki

1. Żel SDS/PAGE z rozdzielonymi białkami
2. Membrana nitrocelulozowa
3. Bibuła Whatman 3 MM
4. Bufor Novablot do transferu białek z żelu na membranę nitrocelulozową
5. Czerwień Ponceau
6. Przeciwciała pierwszorzędowe (poliklonalna surowica skierowana przeciwko ludzkiemu białku P2)
7. Drugorzędowe przeciwciała sprzężone z alkaliczną fosfatazą
8. Roztwór blokujący (10 % roztwór mleka odtłuszczonego w PBS)
9. Bufor PBS
10. Bufor PBS-T (PBS z 0,1 % Tween 20)
11. Bufor AP
12. NBT (18 mg NBT rozpuścić w 1400 µl DMF i 600 µl wody). Przechowywać w -20°C.

13. BCiP (8 mg BCiP rozpuścić w 2 ml DMF). Przechowywać w -20°C .
14. Prostokątne płytki testowe
15. Probówki Falcona o pojemności 15 ml i 50 ml.
16. Pęsety
17. Rękawiczki nitrylowe
18. Aparat do pół-suchego transferu białek

Wykonanie ćwiczenia

1. Połowę żelu SDS/PAGE z rozdzielonymi białkami przepłukać buforem Novablot, a następnie przeprowadzić transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową (wcześniej nawilżoną buforem Novablot), umieszczoną pomiędzy dwiema potrójnymi warstwami bibuły Whatman 3 MM nawilżonej buforem Novablot. Całość umieścić w aparacie do elektrotransferu pomiędzy grafitowymi elektrodami. Transfer białka prowadzić w kierunku anody przy natężeniu prądu 280 mA przez 45 min.
2. Po zakończeniu transferu, membranę nitrocelulozową inkubować z 0,02% roztworem czerwieni Ponceau (celem wybarwienia markerów białkowych). Po zaznaczeniu ołówkiem pozycji markerów białkowych, odpłukać barwnik za pomocą buforu PBS. Następnie inkubować membranę w roztworze blokującym, w temp. 4°C , do kolejnych ćwiczeń.
3. Wylać roztwór blokujący i dodać do membrany 10 ml przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych 1:1000, w buforze PBS i pozostawić przez 40 min. na kołysce w temp. pokojowej.
4. Odpłukać przeciwciała za pomocą 10 ml roztworu PBST: 4 razy przez 1 min.
5. Na płytkę z membraną wlać 10 ml przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:10000 w 10 ml PBST i pozostawić na kołysce w temperaturze pokojowej na 40 min. (w czasie inkubacji przygotować barwniki do detekcji).
6. Odpłukać przeciwciała za pomocą 10 ml roztworu PBST: 4 razy przez 1 min.
7. Przepłukać membranę za pomocą 10 ml buforu AP: 2 razy przez 1 min.
8. Przeprowadzić detekcję białek na membranie. W tym celu do probówki Falcona dodać 10,5 ml buforu AP a następnie dodać jednocześnie dwa przygotowane wcześniej barwniki (NBT i BCiP). Wymieszać zawartość probówki Falcona i wylać całość na płytkę z membraną. Pozostawić na kołysce do pojawienia się prążków.

Reakcje barwienia przerwać poprzez płukanie membrany wodą dejonizowaną, po czym membranę wysuszyć na powietrzu.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

APS	- nadsiarczan amonowy (ang. <i>Ammonium Persulphate</i>)
β -MET	- β -merkaptoetanol (ang. <i>β-Mercaptoethanol</i>)
DMF	- dimetyloformamid
DTT	- ditiotreitol (ang. <i>Dithiothreitol</i>)
EDTA	- kwas etylenodwuaminoczteroctowy (ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PMSF	- sulfofluorek fenylometanu (ang. <i>Phenylmethylsulphonyl Fluoride</i>)
SDS	- sól sodowa siarczanu dodecyłu (ang. <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (ang. <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TEMED	- N,N,N',N'-czterometyletylenodiamina (ang. N,N,N',N'- <i>tetramethylethylenediamine</i>)
Tris	- trójhydroksymetyloaminometan; 2-amino-2(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
UV	- promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>Ultraviolet</i>)

WYKAZ WYBRANYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH

Aceton – substancja wytrącająca białka z roztworu

APS – inicjator polimeryzacji akrylamidu i N,N'-metylenobisakrylamidu

β -MET – substancja redukująca, m. in. mostki dwusiarczkowe w białkach

DTT – substancja redukująca, m. in. mostki dwusiarczkowe w białkach

EDTA – chelator jonów dwuwartościowych, substancja hamująca nukleazy

NaH_2PO_4 – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu

NaCl – substancja zapewniająca siłę jonową roztworu

PMSF – nieodwracalny inhibitor proteaz serynowych

SDS – anionowy detergent, upłynniający wszystkie błony komórkowe i denaturujący białka,
nadający białkom ujemny ładunek wypadkowy

TEMED – katalizator polimeryzacji akrylamidu i N,N'-metylenobisakrylamidu

Tris – (w formie Tris-HCl, Tris-octan, Tris-glicyna) – substancja buforująca, utrzymuje pH
roztworu w zakresie 7-9