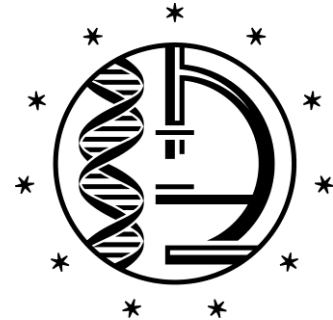


**UNIwersYTET MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ**  
**WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII**  
**ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ**



**UMCS**  
UNIwersYTET MARIi CURIE-SKŁODOWSKIEJ



## **Techniki laboratoryjne**

**Ćwiczenia dla studentów II roku biotechnologii  
oraz III roku mikrobiologii**

**LUBLIN 2016**

Wersja 1.0

## **Spis treści:**

1. Frakcjonowanie komórek
  - 1.1 Oznaczanie ilościowe białka
  - 1.2 Dezintegracja komórek
  - 1.3 Wirowanie różnicowe i w gradiencie gęstości
  - 1.4 Wysalanie
  - 1.5 Dializa
2. Chromatografia białek
  - 2.1 Chromatografia jonowymienna
  - 2.2 Chromatografia oddziaływań hydrofobowych
  - 2.3 Sączenie molekularne
  - 2.4 Chromatografia powinowactwa
3. Elektroforeza żelowa białek
  - 3.1 Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących (SDS/PAGE)
  - 3.2 Barwienie białek po rozdziale elektroforetycznym
4. Immunologiczne metody identyfikacji białek

# 1. FRAKCJONOWANIE KOMÓREK

Fracjonowanie 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). Fracjonowanie 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 Oznaczanie ilościowe białka

Znanych jest wiele metod oznaczania stężenia białka w próbce, z których większość opiera się na spektrofotometrii. Ich znajomość pozwala na wybranie odpowiedniej metody, pozwalającej na wyeliminowanie czynników zakłócających pomiar.

### METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE

Białka charakteryzują się zdolnością absorpcji promieniowania ultrafioletowego, której maksimum przypada na fale o długości 280nm oraz 235nm. Wiąże się to z obecnością aminokwasów aromatycznych (tyrozyna, tryptofan) oraz wiązań peptydowych w łańcuchu polipeptydowym. Na wartość absorpcji mogą wpływać zanieczyszczenia kwasami nukleinowymi, dla których maksimum absorpcji promieni UV przypada na fale o długości 260nm.

#### **Metoda *Beavena i Holidaya***

Zasada metody polega na spektrofotometrycznym pomiarze absorpcji promieni UV o długości 280 nm oraz 260 nm, przez jednocentymetrową warstwę badanego roztworu białka. Uzyskane wartości podstawia się do wzoru i oblicza stężenie białka w mg/ml:

$$C_{\text{białka(mg/ml)}} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

Metoda ta obarczona jest pewnym błędem, wynikającym z różnej zawartości aminokwasów aromatycznych w różnych białkach oraz zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi.

### **Metoda Whitakera i Granuma**

Jest to metoda spektrofotometrycznego oznaczenia stężenia białka, w której wykonuje się pomiar absorpcji promieni UV o długości fali 280 nm oraz 235 nm. Otrzymane wartości absorpcji podstawia się do wzoru i oblicza stężenie białka w mg/ml.

$$C_{\text{białka(mg/ml)}} = \frac{A_{235} - A_{280}}{2,51}$$

W oznaczeniach stężenia białka tą metodą nie przeszkadza obecność kwasów nukleinowych, dla których wartość absorpcji fal świetlnych o długości 235 nm i 280 nm jest taka sama.

### **Materiały i odczynniki**

1. Roztwory badanych białek
2. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet

### **Wykonanie ćwiczenia**

Przeprowadzić spektrofotometryczny pomiar absorpcji promieni UV przez badany roztwór białka przy trzech długościach fal 235 nm, 260 nm oraz 280 nm. Pomiar wykonać względem próby kontrolnej (bufor lub H<sub>2</sub>O dest. bez białka). Jeśli zaistnieje konieczność, (tzn. wielkość absorpcji przekracza 1), należy próbkę białka rozcieńczyć, a następnie uwzględnić to przy obliczaniu jego stężenia. Znając wartość absorpcji (A) obliczyć stężenie białka według podanych wyżej wzorów.

## **METODA KOLORYMETRYCZNA**

### **Metoda 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 próbie (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 absorbencję 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  $\mu$ l 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.

## 1.2 Dezintegracja 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 ssacze, roślinne, drożdżowe, bakteryjne, tkanka, organ), co wynika z obecności lub braku ściany komórkowej (komórki bakteryjne i komórki ssacze) 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 homogenizatora (Dounce'a, Potter-Elvehjema)	Miękkie tkanki 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), glukonaza (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 ssacze
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

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z trzema różnymi metodami dezintegracji komórek.

**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. Hodowla komórek bakteryjnych (osad komórek w objętości 0,5 ml w probówce typu Falcon o poj. 15 ml)
2. Hodowla komórek drożdżowych (osad komórek w objętości 0,5 ml w probówce typu Falcon o poj. 15 ml)
3. Hodowla komórkowa fibroblastów mysich NIH 3T3 lub komórek HeLa o gęstości komórek ok. 90% (jedna płytką Petriego)
4. Sonikator
5. Bufor PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5)
6. Bufor do lizy kom. ssaczy (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 250 mM sacharoza, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100)
7. Bufor do lizy komórek drożdżowych (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 80 mM KCl  
12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 6 mM β- MET)
8. Zdrapywacz do komórek
9. Homogenizator szklano-teflonowy o pojemności 2 ml
10. 100 mM PMSF
11. 0,5 M EDTA
12. Bufor próbkowy SDS/PAGE (4x stężony) : 1,25 M roztwór Tris-HCl pH 6,8 - 0,5ml  

Glicerol	1,0 ml
10 % roztwór SDS	2,0 ml
DTT	154 mg
H <sub>2</sub> O	1,3 ml

1% roztwór błękitu bromofenolowego 200 μl
13. 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, z uzyskanego dezintegratu komórek, przenieść po 1,5 ml do dwóch nowych probówek typu Eppendorf o poj. 1,5 ml i poddać wirowaniu przy 10000 rpm przez 10 min. w 4°C w celu osadzenia niezdezintegrowanych komórek oraz dużych fragmentów błoniastych.
4. Uzyskany supernatant przenieść do nowej probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml i oznaczyć w nim stężenie białka metodą Bradford.
5. Przygotować dwie próbki zawierające po 20 µg białka w końcowej obj. 30 µl, dodać po 10 µl buforu próbkowego (4x stężonego) i wymieszać. Następnie, próbki ogrzewać przez 3 min. w temp. 90°C, po czym zamrozić w -20°C do kolejnych ćwiczeń.
6. W przypadku, gdy stężenie białka w preparacie jest zbyt niskie aby przygotować próbki zawierające 20 µg białka w końcowej obj. 30 µl, należy białka wytrącić z roztworu przez dodanie 3 objętości oziębionego acetonu. Całość pozostawić do kolejnych ćwiczeń (minimum na 24 godziny) w temp. -20°C.

### **Dezintegracja komórek drożdżowych kulkami szklanymi**

1. Osad komórek drożdżowych zawiesić w 0,5 ml buforu do lizy i przenieść do probówki typu Eppendorf o pojemności 2 ml.
2. Do probówki dodać 0,5 ml szklanych kulek.
3. Zawiesinę komórek ze szklanymi kulkami wytrząsać przez worteksowanie w cyklach po 45s wytrząsania i 60s przerwy na chłodzenie w lodzie (min. 8 cykli) po czym poddać wirowaniu przy 5000 rpm przez 5 min. w 4°C w celu osadzenia nierozbitych komórek.
4. Uzyskany ekstrakt przenieść do nowej probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml. i odwirować przy 12000 rpm przez 10 min w 4°C.
5. Uzyskany supernatant przenieść do nowej probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml i oznaczyć w nim stężenie białka metodą Bradford.
6. Przygotować dwie próbki zawierające po 20 µg białka w końcowej obj. 30 µl, dodać po 10 µl buforu próbkowego (4x stężonego) i wymieszać. Następnie, próbki ogrzewać przez 3 min. w temp. 90°C, po czym zamrozić w -20°C do kolejnych ćwiczeń.

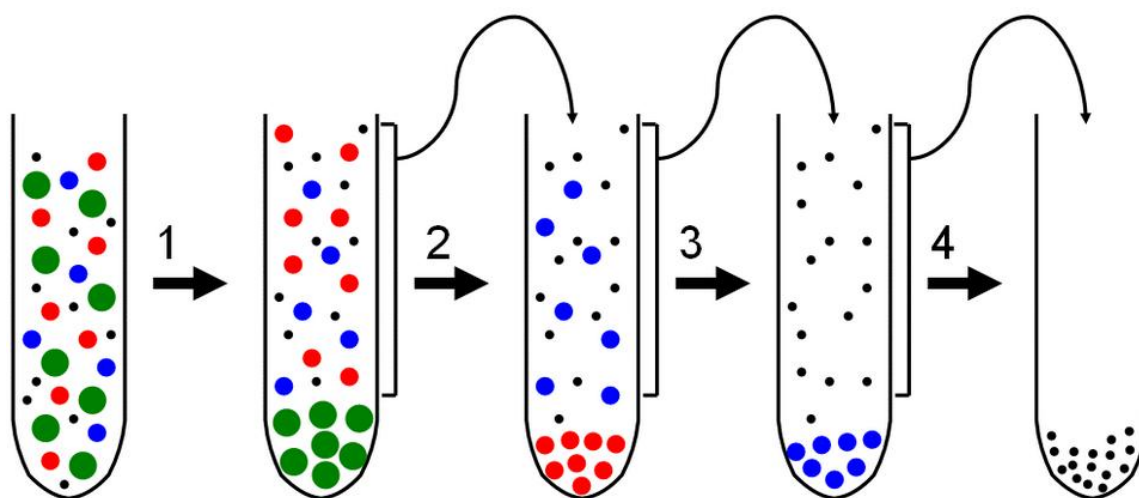
7. W przypadku, gdy stężenie białka w preparacie jest zbyt niskie aby przygotować próbki zawierające 20 µg białka w końcowej obj. 30 µl, należy białka wytrącić z roztworu przez dodanie 3 objętości oziębionego acetonu. Całość pozostawić do kolejnych ćwiczeń (minimum na 24 godziny) w temp. -20°C.

### **Homogenizacja komórek ssaczych**

1. Płytkę Petriego z komórkami ssaczymi o gęstości ok. 90% przenieść na lód i ściągnąć pipetą płyn hodowlany.
2. Przepłukać komórki na płytce za pomocą 5 ml oziębionego buforu PBS.
3. Po ściągnięciu pipetą buforu PBS zeszkrobać komórki z płytki za pomocą specjalnego zdrapywacza do komórek. Zawiesinę komórek spłukać z płytki 0,8 ml oziębionego PBS i przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 2 ml.
4. Powtórnie popłukać płytkę Petriego 0,8 ml oziębionego PBS i połączyć zawiesinę z zawiesiną otrzymaną w punkcie 3.
5. Zawiesinę komórek odwirować przy prędkości 1500 rpm przez 5 min w 4°C. Supernatant odrzucić, a osad zawiesić w 1 ml buforu do lizy komórek ssaczych i inkubować 20 min. w lodzie.
6. Przenieść zawiesinę komórek do homogenizatora szklano-teflonowego i dezintegrować wykonując 40 ruchów teflonowym tłoczkiem (stopień dezintegracji można zweryfikować przy użyciu mikroskopu świetlnego).
7. Uzyskany homogenat komórek przenieść do probówki Eppendorfa o poj. 1,5 ml i odwirować przy prędkości 1500 rpm przez 10 min w 4°C w celu osadzenia niezdezintegrowanych komórek oraz jąder komórkowych.
8. Uzyskany supernatant przenieść do nowej probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml i poddać wirowaniu przy 10000 rpm przez 10 min. w 4°C
9. Uzyskany supernatant przenieść do nowej probówki typu Eppendorf o poj. 1,5 ml i oznaczyć w nim stężenie białka metodą Bradford.
10. Przygotować dwie próbki zawierające po 20 µg białka w końcowej obj. 30 µl, dodać po 10 µl buforu próbkowego (4x stężonego) i wymieszać. Następnie, próbki ogrzewać przez 3 min. w temp. 90°C, po czym zamrozić w -20°C do kolejnych ćwiczeń.
11. W przypadku, gdy stężenie białka w preparacie jest zbyt niskie aby przygotować próbki zawierające 20 µg białka w końcowej obj. 30 µl, należy białka wytrącić z roztworu przez dodanie 3 objętości oziębionego acetonu. Całość pozostawić do kolejnych ćwiczeń (minimum na 24 godziny) w temp. -20°C.

### 1.3 Wirowanie różnicowe i w gradiencie gęstości

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 zawieszynie 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 (100000xg 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.

## 1.4 Wysalanie białek

Dzięki obecności grup polarnych w białkach, następuje wiązanie cząsteczek wody, które wytwarzają tzw. płaszcz hydratacyjny. Dodanie niektórych soli (np. siarczanu amonu bądź siarczanu magnezu) do roztworu białka, powoduje jego odwodnienie, co prowadzi do wytrącenia białka z roztworu. Proces ten nosi nazwę **wysalania**. Wysolone białko można ponownie rozpuścić w wodzie lub w odpowiednim buforze bez straty jego właściwości biologicznych. Dzięki temu wysalanie białek stosuje się często w praktyce jako jeden z etapów ich łagodnego wydzielenia z roztworu. Aby uzyskać określony stopień nasycenia siarczanem amonu, należy dokładnie znać objętość badanego roztworu i na podstawie załączonej tabeli odważyć potrzebną ilość gramów soli. Podczas procedury wysalania białek ważna jest znajomość temperatury roztworu. Wytrącone białka obserwuje się jako bezpostaciowe lub kłaczkowate osady zawierające pewną ilość soli, która wpływa ujemnie na pomiar stężenia białka. Usunięcie soli z roztworu białka możliwe jest poprzez dializę.

### Wysalanie globulin i albumin z surowicy

Rozpuszczalność globulin i albumin w wodnych roztworach soli nieorganicznych nie jest jednakowa. Wykorzystując tę właściwość białek, można je wybiórczo wydzielić z roztworu poprzez wysalanie określonym stężeniem siarczanu amonu. Globuliny tracą płaszcz hydratacyjny już przy około 50 % nasyceniu roztworu tą solą. Albuminy z powodu większego powinowactwa do wody ulegają wysoleniu dopiero przy około 100% nasyceniu siarczanem amonu.

**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. roztwór surowicy bydlęcej 10-krotnie rozcieńczony w 0,9 % roztworze NaCl
2.  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  cz.d.a. w postaci stałej
3. 0,1 M roztwór Tris

4. płyn fizjologiczny (0,9% roztwór NaCl)
5. uniwersalne papierki wskaźnikowe
6. zlewka o poj. 100 ml
7. mieszadło magnetyczne
8. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet

### **Wykonanie ćwiczenia**

1. Do 10 ml, 10-krotnie rozcieńczonej surowicy w zlewce o poj. 100 ml, umieszczonej w lodzie na mieszadle magnetycznym, dodawać małymi porcjami siarczanu amonu w ilości odpowiadającej 50% nasyceniu soli w roztworze. Przez cały czas wysalania należy utrzymywać pH roztworu w granicach 7,0, przez dodawanie 0,1M Trisu, gdyż siarczan amonu zakwaszając środowisko, może doprowadzić do denaturacji białka.
2. Po zakończonym dodawaniu siarczanu amonu (ok. 5 min.), zawiesinę pozostawić w lodzie na okres 30 min. przy stałym mieszaniu.
3. Wytrącony osad globulin (może wystąpić tylko zmętnienie roztworu) odwirować przy 10.000 rpm przez 10 minut w 4°C.
4. Zlać ostrożnie płyn z nad osadu (supernatant) do przygotowanej wcześniej zlewki o poj. 100 ml. Uwzględniając, że nasycenie siarczanu amonu w roztworze surowicy wynosi już 50%, przygotować kolejną jego odważkę, która po dodaniu do odwirowanego supernatantu stanowić będzie 100% nasycenia siarczanem amonu.
5. Po zakończonym dodawaniu siarczanu amonu (ok. 5. min.), zawiesinę pozostawić w lodzie na okres 30 min. przy stałym mieszaniu. W tych warunkach wytrącają się albuminy, które należy odwirować jak wyżej.
6. Oba odwirowane osady (globulin i albumin) rozpuścić oddzielnie w jednakowej ilości płynu fizjologicznego. Następnie, roztwory białek dializować wobec płynu fizjologicznego celem usunięcia siarczanu amonu lub przeprowadzić odsalanie białek metodą sączenia molekularnego na kolumnie z Sephadexem G-25.

TABELA WYSYCEŃ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (temp. pokojowa)

		Końcowe nasycenie siarczanem amonu w %																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
Nasycenie początkowe %		Ilość gramów siarczanu amonu, którą należy dodać do 1 dm <sup>3</sup> roztworu																
0		56	114	144	176	196	209	243	727	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10			57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20				29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25					30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30						19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33							12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35								31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40									31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45										32	65	99	134	171	210	250	339	431
50											33	66	101	137	176	214	302	392
55												33	67	103	141	179	264	353
60													34	69	105	143	227	314
65														34	70	107	190	275
70															35	72	153	237
75																36	115	198
80																	77	157
90																		79

**Uwaga !** Przystępując do wysalania białek w temperaturze 4<sup>0</sup>C należy pomnożyć wyliczoną z Tabeli ilość gramów siarczanu amonu przez współczynnik 0,92, który uwzględni zmniejszoną rozpuszczalność tego związku w niższej temperaturze.

**Przykład :** Jeżeli procedurę wysalania białka (0% - 50% nasycenia) prowadzimy w temp. 4<sup>0</sup>C, wówczas na 1 dm<sup>3</sup> roztworu białka należy przygotować odważkę 288g (313 g × 0,92) siarczanu amonu. By zwiększyć nasycenie siarczanem amonu od 50% do 100%, należy odważyć dodatkowo 360g (392 g × 0,92) soli.

## 1.5 Dializa białek

Metoda dializy pozwala m.in. na usunięcie soli i innych związków niskocząsteczkowych z roztworu białka oraz zmianę buforu w którym białko jest zawieszone.

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. 2% roztwór węgla sodu
2. 0,5 M roztwór EDTA, pH 8,0
3. Rozwór badanego białka
4. Roztwór dializacyjny (zgodnie z zaleceniami prowadzącego)
5. Celulozowe „węże” do dializy
6. Zaciski do „węży” dializacyjnych

### Wykonanie ćwiczenia

1. Uciąć potrzebną długość „węża” dializacyjnego i gotować przez 10 minut w 200 ml 2% roztworu węgla sodu z dodatkiem 1 mM EDTA w celu usunięcia metali ciężkich i siarczków. Długość „węża” obliczyć następująco:
  - długość dializowana (mm) =  $[\text{poj. (w } \mu\text{l}) \times 3,2] / [\text{szer. „węża”}^2 \text{ (w mm}^2\text{)}]$
  - dodać 10 % długości dializowanej
  - dodać 4 cm na zaciski
2. Po oziębieniu, dokładnie przepłukać „węże” wodą destylowaną (tak przygotowane „węże” można przechowywać w wodzie z dodatkiem substancji konserwujących, np.  $\text{NaN}_3$  w  $4^\circ\text{C}$ ).
3. Jeden koniec przygotowanego „węża” zamknąć zaciskiem tak, aby wystawał on co najmniej na 1 cm. Otrzymany woreczek wypełnić wodą destylowaną w celu sprawdzenia jego szczelności.

4. Po wylaniu wody, napelnić woreczek roztworem białka przygotowanym do dializy. Z niewypełnionej części woreczka usunąć powietrze ściskając delikatnie woreczek nad płynem.
5. Zamknąć zaciskiem drugi koniec „węza” i umieścić woreczek w roztworze dializacyjnym. Dializę należy prowadzić, przy stałym mieszaniu, w temperaturze 4<sup>0</sup>C.
6. Roztwór dializacyjny powinien być zmieniany co najmniej 3 razy w trakcie trwania dializy. Zaleca się wymianę po upływie 2-4 godzin, 6-8 godzin i 10-14 godzin. Całkowita objętość roztworu powinna być ok. 100 razy większa niż objętość próbki białkowej.
7. Po zakończeniu dializy, zdjąć jeden zacisk, otworzyć woreczek i usunąć roztwór za pomocą pipety.



## 2. CHROMATOGRAFIA BIAŁEK

Przygotowanie materiału białkowego 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.

### 2.1 Chromatografia jonowymienna

Chromatografia jonowymienna jest obecnie jedną z najczęściej stosowanych metod separacji białek. Metoda ta wykorzystuje właściwości elektryczne białek i polega na odwracalnej adsorpcji obdarzonych ładunkiem elektrycznym cząsteczek na tzw. złożu jonowymiennym (jonowymieniaczu). Jest to najczęściej złożo chromatograficzne z unieruchomionymi na powierzchni polarnymi cząsteczkami posiadającymi ładunek elektryczny określonego znaku. Najczęściej spotykane grupy funkcyjne jonowymieniaczy to anionowymieniacze takie jak: dietyloaminoetyl (DEAE) , trimetyloaminoetyl (TMAE) czy czwartorzędowe aminy (Q) oraz kationowymieniacze takie jak: karboxymetyl (CM), ortofosforan (P) czy metylosulfonian (S). Podstawą chromatografii jonowymiennej jest współzawodnictwo jonów i polarnych cząsteczek o możliwość oddziaływania z obdarzonymi przeciwnym ładunkiem elektrycznym grupami funkcyjnymi jonowymieniacza. Przy niewielkim stężeniu konkurujących jonów dochodzi do adsorpcji cząsteczek na jonowymieniaczu. Selekttywnej desorpcji (elucji) dokonać można zwiększając ilość/stężenie konkurujących jonów lub zmianę wartości pH, co skutkuje zmianą ładunku elektrycznego makromolekuł białkowych i w rezultacie ich oddysocjowaniem.

### 2.2 Chromatografia oddziaływań hydrofobowych

Duża część cząsteczek białkowych posiada skomplikowaną strukturę przestrzenną, w której wyróżnić można obszary eksponowane na zewnątrz (tzw. hydrofilowe) oraz obszary ukryte we wnętrzu cząsteczki (tzw. hydrofobowe), eksponowane na zewnątrz jedynie przy zmianie środowiska na niepolarnie. Odmienne właściwości hydrofobowe cząsteczek białkowych stanowią istotę rozdziału metodą chromatografii hydrofobowej. Chromatografia ta polega na adsorpcji molekuł białkowych na specjalnym złożu z silnie hydrofobowymi grupami wyeksponowanych ligandów, trwale umocowanych do nośnika. Krytyczny wpływ na

parametry rozdzielczości i selektywności tej metody mają m.in. stężenie soli i ich rodzaj, typ liganda oraz jego gęstość na powierzchni nośnika, temperatura, skład rozpuszczalników oraz stężenie jonów wodorowych jak również typ nośnika. Zaletą tej techniki jest możliwość wielokrotnego zatężenia wyjściowego materiału i bardzo wysoka rozdzielczość.

### 2.3 Sączenie molekularne

Filtracja żelowa (inaczej sączenie molekularne) polega na wykorzystaniu różnic w kształcie i masie rozdzielanych cząsteczek. Polega na wykorzystaniu porowatej struktury ziaren żelu (nośnika) oraz zjawiska dyfuzji, któremu podlegają zarówno rozdzielane cząsteczki jak i stosowany rozpuszczalnik. Krytycznym parametrem w tej technice jest objętość nanoszonej na kolumnę próbki i nie powinna ona przekraczać 3-5% objętości całkowitej kolumny. Materiał białkowy po naniesieniu na kolumnę wnika w porowatą strukturę żelu. Małe cząsteczki z łatwością penetrują ziarna żelu, cząsteczki o rozmiarach porównywalnych do porów lub większe przepływają przez kolumnę wraz z rozpuszczalnikiem, nie wnikając w pory żelu. Im mniejsze cząsteczki tym głębiej i dłużej będą penetrować pory żelu, a ich prędkość przepływu będzie mniejsza od prędkości przepływu rozpuszczalnika. Cząsteczki duże, nie mające zdolności do penetrowania struktury wewnętrznej żelu przemieszczają się znacznie szybciej niż cząsteczki małe, z prędkością porównywalną do rozpuszczalnika. Kolumnę opuszczają więc najpierw cząsteczki o największej masie i największym kształcie a następnie wymywane są cząsteczki mniejsze – proporcjonalnie do ich rozmiarów. Głównymi zaletami tej metody są: łatwość zastosowania, możliwość separacji wszystkich rodzajów cząsteczek oraz prowadzenie zarówno rozdziału jak i elucji w tym samym rozpuszczalniku. Stosowane w tej technice złoża różnią się nie tylko rodzajem użytego materiału, ale również rozmiarami ziaren żelu oraz jego porowatością. Parametry te odpowiadają za zakres mas cząsteczkowych, które można rozdzielać. Wśród najczęściej stosowanych znajdują się: *Sephadex* (usieciowany dextran z dodatkiem epichlorohydryny), *Sepharose* (sieciowana agarozą) czy *Sephacryl* (dextran-bisakrylamid). Poniżej opisany jest przykład zastosowania metody sączenia molekularnego do pozbywania się soli z roztworu białka.

## **Odsalanie białka metodą sączenia molekularnego na kolumnie z Sephadexem G-25**

Sephadex, czyli chemicznie zmodyfikowany dekstran, jest związkiem hydrofilnym, który pęczniejąc w wodzie lub buforze tworzy żel. Substancje poddawane sączeniu molekularnemu, w zależności od masy cząsteczkowej różnią się zdolnością penetracji spęczniałego żelu. Cząsteczki duże (np. białka) nie wnikają do wnętrza mikrogranulek żelu lub wnikają w stopniu nieznacznym. Związki niskocząsteczkowe (np. siarczan amonu) penetrują granulki żelu, stąd ich czas migracji przez Sephadex jest wydłużony w stosunku do czasu migracji białek pomiędzy granulkami.

**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. Sephadex G-25 (coarse)
2. 10% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA)
3. 2% roztwór  $\text{AgNO}_3$
4. roztwór albuminy białej lub globuliny w 0,9 % roztworze NaCl
5. zestaw do chromatografii kolumnowej
6. Jałowe probówki Eppendorfa o pojemności 1,5 i 2 ml oraz końcówki do pipet

### **Wykonanie ćwiczenia**

Kolumnę chromatograficzną zamocować na statywie. Na dolny wylot kolumny nałożyć wężyk polietylenowy. Wylot wężyka zacisnąć. Na dnie kolumny umieścić zwitek waty szklanej przy pomocy bagietki. Do tak przygotowanej kolumny wlać ostrożnie po ściankach odpowiednią ilość spęczniałego w wodzie destylowanej żelu Sephadex G-25. Otworzyć wypływ kolumny. Po uformowaniu się słupa żelowego przemyć kolumnę  $\text{H}_2\text{O}$  dest. Zamknąć wylot kolumny pozostawiając 1cm warstwę płynu nad żelem. Przy zamkniętym

wyplywie kolumny, naniesć na górną powierzchnię żelu 0,5 ml roztworu albuminy lub globuliny w 0,9% NaCl. Ostrożnie otworzyć wypływ z kolumny. Po wsiąknięciu materiału w kolumnę zawierającą żel, podłączyć butlę z dolnym odpływem zawierającą H<sub>2</sub>O destylowaną lub bufor. Zbierać frakcje o objętości 2ml. Szybkość wypływu frakcji można regulować zaciskiem kolumny lub umieszczeniem zbiornika z H<sub>2</sub>O na odpowiedniej wysokości. Doświadczenie zakończyć po sprawdzeniu obecności białka we frakcjach. Wykonuje się to przez dodanie 10% roztworu TCA w ilości 100µl do 200µl porcji pobieranych z każdej frakcji (wytrąca się biały osad białka). Jony chlorkowe pochodzące z 0,9% roztworu NaCl (wypływają z kolumny później) wykrywa się 2% roztworem AgNO<sub>3</sub>, który daje biały osad w reakcji z NaCl.

Po zakończeniu ćwiczenia, kolumnę z Sephadexem należy zregenerować przez przemycie jej trzykrotną objętością wody destylowanej.

#### **2.4 Chromatografia powinowactwa**

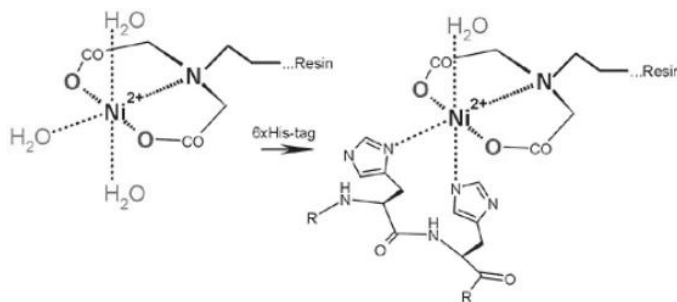
Chromatografia powinowactwa jest szczególnym typem chromatografii adsorpcyjnej wykorzystującym wzajemne powinowactwo dwóch substancji. Ze względu na wysoką unikalność tych reakcji metoda ta pozwala znacznie uprościć proces oczyszczania białka przy jednoczesnym zachowaniu jego biologicznej aktywności. 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 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. Poniżej opisany jest przykład zastosowania

techniki chromatografii powinowactwa do oczyszczania rekombinowanego ludzkiego białka P2 z dołączoną etykietą histydynową.

### Oczyszczanie ludzkiego białka P2 na drodze chromatografii powinowactwa

Rybosomalne białko P2 *Homo sapiens* poddane heterologicznej ekspresji w komórkach *Echerichia coli* eksprimowane było w postaci białka fuzyjnego z dołączoną etykietą histydynową (6xHis-tag), umożliwiającą jego późniejsze oczyszczanie na drodze chromatografii powinowactwa. Etykieta histydynowa jest krótkim homopeptydem zbudowanym z 6 reszt histydynowych dołączonych do C- lub N- końca białka rekombinowanego. Przyłączenie etykiety odbywa się na etapie konstrukcji wektora ekspresyjnego, kiedy do sekwencji DNA kodującej białko dołącza się fragment DNA kodujący 6 reszt histydyny zakończony kodonem STOP.

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



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*).

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./4<sup>0</sup>C) w celu usunięcia wytrąconych w trakcie zamrażania / rozmrażania białek.

## **Materiały i odczynniki**

1. Frakcja białek cytoplazmatycznych *E. coli* zawierająca hP2 z etykietką histydynową
2. 50% zawiesina złoża NiNTA
3. Bufor B (do wiązania białka do złoża NiNTA) – 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5mM imidazol; pH 8
4. Bufor W (do płukania złoża NiNTA) – 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol; pH 8
5. Bufor E (do elucji związanych ze złożem NiNTA białek) - 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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 specyficznego 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.

### 3. ELEKTROFOREZA ŻELOWA BIAŁEK

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 ( $H_2C=CH-CO-NH_2$ ) połączone wiązaniami poprzecznymi za pomocą  $N,N'$ -metyleno-bis-akrylamidu ( $H_2C=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2$ ). 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 detergencem 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. Przy analizach złożonych mieszanin białek rozdzielczość jednokierunkowego rozdziału elektroforetycznego jest często niezadowalająca. Wówczas można zastosować elektroforezę dwukierunkową (dwuwymiarową) - 2D (ang. *two-dimensional*).

Elektroforeza 2D pozwala na wykrycie zmian w ekspresji białek, ich izoform czy modyfikacji potranslacyjnych (takich jak fosforylacja, glikozylacja czy ograniczona proteoliza). Składa się z dwóch etapów. Pierwszym etapem (kierunkiem, wymiarem) jest



najczęściej ogniskowanie izoelektryczne (IEF), w którym białka są rozdzielane w gradiencie pH w zależności od ich punktu izoelektrycznego (pI). W ogniskowaniu izoelektrycznym stosowane są komercyjne paski żeli z immobilizowanym gradientem pH gwarantującym wysoką rozdzielczość i powtarzalność uzyskanych wyników, bądź kapilary z żelem poliakrylamidowym z określonym gradientem pH. Drugim etapem (kierunkiem, wymiarem) jest elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS/PAGE) w której białka są rozdzielane zgodnie z ich masą cząsteczkową. W wyniku rozdziału białek metodą elektroforezy 2D, a następnie wybarwienia uzyskanego żelu (najczęściej stosowanymi barwnikami są - błękit *Coomassie Brilliant Blue* oraz sole srebra) otrzymujemy „mapę białkową” składającą się z wielu plam, z których każda stanowi białko o określonych parametrach masy cząsteczkowej i punktu izoelektrycznego.

W trakcie ćwiczeń przeprowadzimy elektroforezę białek SDS/PAGE, a następnie żel poliakrylamidowy z rozdzielonymi białkami podzielimy na dwie części, z których jedną wybarwimy barwnikiem *Coomassie Brilliant Blue*, a drugą metodą srebrową.

### 3.1 Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 probówki 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.

Płytki 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 płytki z żelem do wybarwienia .

## 3.2 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 <sub>2</sub> O	500 ml
Błękit <i>Coomassie</i>	2,5 g

Odbarwiacz:

Metanol	400 ml
Kwas octowy	100 ml
H <sub>2</sub> O	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. Czulość metody zależy w dużej mierze od zastosowanego przepisu barwienia.

## B. Barwienie srebrem

Jest to metoda 10-100 razy czulsza od metody barwienia białek błękitem *Coomassie*. W metodzie srebrzej większość białek ulega zabarwieniu na kolor czarny lub brązowy. Lipoproteiny wybarwiają się na niebiesko, a glikoproteiny na brązowo lub czerwono.

### Odczynniki

1. Roztwór A (40 ml metanolu, 13,5 ml 37% formaldehydu, 46,5 ml H<sub>2</sub>O)
2. Roztwór B - 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,02 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> w 100 ml H<sub>2</sub>O)
3. Roztwór C - 0,1% AgNO<sub>3</sub> (100 mg AgNO<sub>3</sub> w 100 ml H<sub>2</sub>O)
4. Roztwór D (3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 50 µl 37% formaldehydu + 2 ml 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – dopełnić wodą do 100 ml)
5. Roztwór E – 20% kwas cytrynowy ( 10 g kw. cytrynowego w 50 ml H<sub>2</sub>O)

**Uwaga! Roztwory A, B, C, D przygotować bezpośrednio przed użyciem. Barwienie wykonywać w naczyniu przeznaczonym wyłącznie do tego celu.**

### Wykonanie ćwiczenia

1. Żel poliakrylamidowy po elektroforezie utrzymywać przez 10 min. w 100 ml roztworu A.
2. Płukać 2 x 5 min. w 100 ml wody dejonizowanej.
3. Dodać 100 ml roztworu B i mieszać przez 2 min.
4. Płukać 2 x 20 sek. w 100 ml wody dejonizowanej.
5. Barwić w 100 ml roztworu C, stale mieszając przez 10 min.
6. Płukać 3 x 15 sek. w 100 ml wody dejonizowanej.
7. Płukać żel 20 sek. w 10 ml roztworu D.
8. Dodać 90 ml roztworu D (wywoływacza barwy) i mieszać do momentu pojawienia się wyraźnych prążków białkowych.
9. Płukać 3 x 20 sek. w 100 ml wody destylowanej.
10. Zatrzymać barwienie przez dodanie 100 ml roztworu E na 10 min.
11. Przepłukać żel wodą i zeskanować lub wysuszyć.

## 4. IMMUNOLOGICZNE METODY IDENTYFIKACJI BIAŁEK

Do metod immunologicznych często wykorzystywanych do detekcji i identyfikacji białek należą techniki: ELISA, immunobloting oraz immunohistochemia.

### Detekcja białek metodą immunoblotingu

Technika immunoblotingu, zwana inaczej techniką 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 półsuchy), 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. Wyróżniamy dwa typy transferu: transfer mokry i półsuchy.

#### Transfer

Aby przeprowadzić transfer białek na membranę, należy przygotować „kanapkę” złożoną z żelu, membrany i bibuły Whatman. W przypadku transferu mokrego, „kanapka” ułożona jest pionowo pomiędzy dwiema elektrodami, a całość umieszczana jest w aparacie wypełnionym buforem. Transfer mokry stosuje się zwłaszcza w przypadku białek dużych (>100 kDa), hydrofoowych lub trudno rozpuszczalnych ze względu na możliwość prowadzenia go nawet przez 24 godziny, bez ryzyka wyparowania buforu. Należy wówczas zapewnić chłodzenie, aby utrzymać temperaturę w granicach 10 – 30°C. Transfer mokry przeprowadza się przy stałym napięciu prądu, zwykle 20 – 30 V.

W przypadku transferu półsuchego „kanapka” ułożona jest poziomo między elektrodami. Żel i membrana umieszczone są pomiędzy bibułami Whatman nasączonymi buforem. Transfer ten prowadzi się przy stałym natężeniu prądu, wynoszącym zwykle 0,8 – 1,5 mA/cm<sup>2</sup> membrany.

Transfer białek z żelu można przeprowadzić na membrany nitrocelulozowe lub membrany z polifluorku winylidenu (PVDF). Wielkość porów w obu typach membranach

waha się od 0,1  $\mu\text{m}$  do 0,45  $\mu\text{m}$ . Membrany nitrocelulozowe są tańsze, wiążą 80-200  $\mu\text{g}$  białka na  $\text{cm}^2$ . Membrany te od razu nasącza się buforem do transferu, bez uprzedniego zanurzania ich w metanolu. Membrany PVDF wiążą 150-200  $\mu\text{g}$  białka na  $\text{cm}^2$  i mają dużo większą wytrzymałość mechaniczną niż membrany nitrocelulozowe. Należy pamiętać o wcześniejszym zanurzeniu ich w metanolu i dopiero później w buforze do transferu.

### **Blokowanie membran**

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.

### **Wiązanie przeciwciał**

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.

### **Detekcja**

Najczęściej dołączanymi do przeciwciał znacznikami są enzymy: alkaliczna fosfataza i peroksydaza chrzanowa. Wizualizacja tych znaczników może być przeprowadzona kolorymetrycznie (w miejscu wiązania 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 rybosomalnych białek P drożdży stosując skróconą odmianę metody immunoblotingu zwaną dot blot. W tym celu wykorzystamy niewyznakowane przeciwciała pierwszorzędowe rozpoznające drożdżowe, rybosomalne białka P i przeciwciała drugorzędowe sprzężone z alkaliczną fosfatazą. Technika dot blot różni się od metody western blot tym, że nie przeprowadza się elektroforetycznego rozdzielania białek, tylko bezpośrednio nakrapla się próbkę białka na membranę.

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. Membrana nitrocelulozowa (paski 1,5 cm x 1,5 cm)
2. Roztwory badanych białek
3. Przeciwciała pierwszorzędowe (poliklonalna surowica skierowana przeciwko drożdżowym białkom P)
4. Drugorzędowe przeciwciała sprzężone z alkaliczną fosfatazą
5. Roztwór blokujący (10 % roztwór mleka odtłuszczonego w PBS)
6. Bufor PBS
7. Bufor PBS-T (PBS z 0,1 % Tween 20)
8. Bufor AP
9. NBT (18 mg NBT rozpuścić w 1400  $\mu$ l DMF i 600  $\mu$ l wody). Przechowywać w  $-20^{\circ}\text{C}$ .
10. BCiP (8 mg BCiP rozpuścić w 2 ml DMF). Przechowywać w  $-20^{\circ}\text{C}$ .
11. 6-dołkowe płytki testowe.
12. Probówki Falcona o pojemności 15 ml i 50 ml.
13. Pęsety.
14. Rękawiczki nitrylowe.

### **Wykonanie ćwiczenia**

1. Na 6 pasków membrany nitrocelulozowej ((1,5 cm x 1,5 cm), umieszczonych w 6-dołkowej płytce testowej nanieść po 2  $\mu$ l badanych roztworów białek (**uwaga: nie dotykać membrany palcami, używać rękawiczek i pęsety**).
2. Poczekać aż naniesione na nitrocelulozę roztwory białka wyschną.
3. Do każdego dołka płytki z paskiem membrany nitrocelulozowej dodać po 2 ml roztworu blokującego i zostawić na kołyszce laboratoryjnej w temp. pokojowej na 15 min.



4. Wylać roztwór blokujący i dodać do każdego dołka z membraną po 2 ml przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych kolejno 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 i 1:6400 w buforze PBS i pozostawić przez 20 min. na kołyszce w temp. pokojowej.
5. Odpłukać przeciwciała roztworem PBST: 4 razy po 2 ml/dołek przez 1 min.
6. Do każdego dołka z membraną dodać po 2 ml przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych 1:10000 w 15 ml PBST i pozostawić na kołyszce w temperaturze pokojowej na 20 min.
7. Odpłukać przeciwciała roztworem PBST: 4 razy po 2 ml/dołek przez 1 min.
8. Przepłukać membrany buforem AP: 2 razy po 2 ml/dołek przez 1 min.
9. 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 dodać po 2 ml roztworu barwników do każdego dołka z paskiem membrany. Pozostawić na kołyszce do pojawienia się prążków. Reakcje barwienia przerwać poprzez płukanie wodą dejonizowaną, po czym membranę wysuszyć na powietrzu.

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

- APS - nadsiarczan amonowy (ang. *Ammonium Persulphate*)
- $\beta$ -MET -  $\beta$ -merkaptoetanol (ang.  *$\beta$ -Mercaptoethanol*)
- DTT - ditiotreitol (ang. *Dithiothreitol*)
- EDTA - kwas etylenodwuaminoczteroowy (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- HeLa - linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy Henrietty Lacks (ang. *Henrietta Lacks cell*)
- NIH 3T3 - linia komórkowa fibroblastów mysich (ang. *National Institute of Health, 3-day Transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells*)
- PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- PMSF - sulfofluorek fenylometanu (ang. *Phenylmethylsulphonyl Fluoride*)
- SDS - sól sodowa siarczanu dodecyłu (ang. *Sodium Dodecyl Sulphate*)
- SDS-PAGE - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- TEMED - N,N,N',N'-czterometyletylenodiamina (ang. *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*)
- Tris - trójhydroksymetyloaminometan; 2-amino-2(hydroksymetylo)-1,3-propanodiol
- UV - promieniowanie ultrafioletowe (ang. *Ultraviolet*)

## WYKAZ WYBRANYCH SUBSTANCJI CHEMICZNYCH STOSOWANYCH NA ĆWICZENIACH

Aceton – substancja wytrącająca białka z roztworu

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

$\beta$ -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

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – substancja buforująca, utrzymuje pH roztworu

$\text{NaCl}$  – 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