

Separace proteinů pomocí SDS-PAGE

Elektroforetické metody se používají na separaci látek (např. proteinů nebo nukleových kyselin), buněk nebo jiných částic nesoucích elektrický náboj. Pohyblivost molekul závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí a síle elektrického pole. Pro dělení proteinů se nejčastěji používá polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE).

Elektroforetická metoda SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát - polyakrylamidová gelová elektroforéza) patří k základním technikám umožňujícím úspěšnou identifikaci a charakterizaci proteinů v biologickém vzorku. Dodecylsírán sodný (SDS) je anionaktivní detergent schopný „maskovat“ náboj studovaných bílkovin, kdy výsledné komplexy SDS-bílkovina mají stejnou hodnotu povrchového náboje. Separace pak probíhá na základě velikosti molekul separovaných látek. Při použití standardu je možné stanovit molekulovou hmotnost proteinů v testovaném vzorku.

Úloha 1: Separace proteinů a stanovení jejich molekulových hmotností pomocí polyakrylamidové elektroforézy v denaturujících podmínkách (SDS-PAGE)

Pomůcky: centrifuga, vortex, automatické pipety, špičky, mikrozkuhavky, sada pro nalévání PAA gelů, komůrka pro vertikální elektroforézu, zdroj stejnosměrného proudu, termoblok, výrobek ledu

Použité roztoky a gely:

Připraví vedoucí cvičení:

30% AA/Bis (roztok akrylamidu) 19:1

- 28,5 g akrylamidu
- 1,5 g bisakrylamidu
- 100 ml dH₂O

LAEMMLIHO NANÁŠECÍ PUFER 2x; pH 6,8 (LSB 2x)

- 4 ml 10% SDS
- 1 ml 2-mercaptoethanol
- 2 ml glycerol
- 0,4 mg bromfenolová modř
- 1,25 ml Tris HCl
- doplnit vodou na objem 10 ml

BARVÍCÍ ROZTOK:

- 0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue R-250 v 40% methanolu a 10% kyselině octové, přefiltrovat
- před použitím ředit 5x do dH₂O

ODBARVOVACÍ ROZTOK

- 20% methanol a 10% kyselina octová v dH₂O

Připravíte ve dvojicích/jednotlivě:

12% DĚLÍCÍ GEL

- 4,9 ml dH₂O
- 6 ml 30% roztoku akrylamidu
- 3,8 ml 1,5 M Tris pH 8,8
- 0,15 ml 10% SDS
- 0,15 ml 10% persíranu amonného
- 0,006 ml TEMED (tetramethylethylenediamin)

5% ZAOSTŘOVACÍ GEL

- 3,4 ml dH₂O
- 0,83 ml 30% roztoku akrylamidu
- 0,63 ml 1 M Tris pH 6,8
- 0,05 ml 10% SDS
- 0,05 ml 10% persíranu amonného
- 0,005 ml TEMED

Elektroforetický pufr připravený během některého z minulých cvičení

Biologický materiál: proteinové extrakty z předcházejícího cvičení

Postup:

1. Skla pro přípravu gelu omyjte teplou vodou s jarem, opláchněte dH₂O a 100% EtOH.
2. Sestavte aparaturu pro nalévání gelu a upevněte do ní suchá čistá skla.
3. Připravte si dvě falkony 15 a 50 ml pro přípravu zaostřovacího a dělicího gelu. Namíchejte dělicí gel dle rozpisu (použijte 12% gel a poměr AA:BisAA 19:1), opatrně promíchejte a rychle naneste do prostoru mezi skly. Převrstvěte 100% alkoholem a nechte zatuhnout.
4. Opatrně odsajte alkohol pomocí filtračního papíru.
5. Namíchejte zaostřovací gel dle rozpisu do 15 ml falkonky.
6. Dělicí gel převrstvěte zaostřovacím gelem. Do gelu opatrně vsuňte hřebínek pro vytvoření jamek.
7. Po zatuhnutí gelu vyjměte hřebínek. Gel umístěte do aparatury pro elektroforézu a převrstvěte dostatečným množstvím elektroforetického pufru. Zkontrolujte, zda vše dobře těsní.

8. Na gel nanášíte cca 20 µg proteinů daného vzorku (doředit na objem 15 µL přidáním stejného dílu dH₂O a barvičky LSB, pracujte na ledu).
9. Vzorky před nanesením vortexujte, stočte, denaturujte při 97 °C po dobu 5 min, opět vortexujte a stočte. Následně naneste do připravených jamek v gelu. Nezapomeňte nanést na gel marker proteinové velikosti (3 µL na jamku), tento před nanesením také denaturujte po dobu 5 min.
10. Uzavřete elektroforetickou aparaturu, připojte ke zdroji a proveďte elektroforetickou separaci 20 min při 60 V pro „zaostření“ vzorků a poté 1 – 4 h při 125 V.
11. Po proběhnutí elektroforetické separace od sebe opatrně oddělte skla pomocí plastové špachtle – gel zůstane na jednom ze skel.
12. Opatrně odřízněte zaostřovací gel a zbytek gelu s vzorky „sloupněte“ do barvicího roztoku. Gel barvěte po dobu 10 min na třepače.
13. Následně proveďte odbarvení gelu, vyfoťte a vyhodnoťte.