

IPARI KINYERÉSTECHNIKA GYAKORLAT BIOMÉRNÖK MSc

II.SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

DE TTK BIOMÉRNÖKI TANSZÉK

Gyakorlatvezetők: Kulcsár László, Molnár Ákos Péter

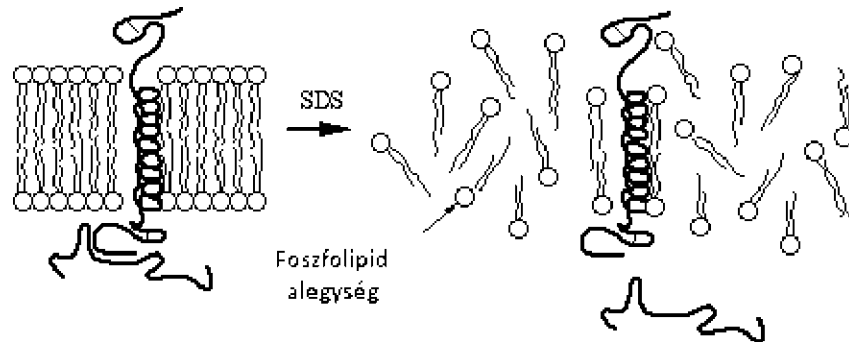
1. A módszer elve

Semleges pH-n a fehérjék az elsődleges szerkezetüktől függően negatív vagy pozitív töltéssel rendelkeznek. Oldatban található makromolekulák elektromos erőtér hatására elektromos töltésüknek, méretüknek és alakjuknak megfelelően vándorolnak. Ezt a folyamatot nevezik elektroforézisnek.

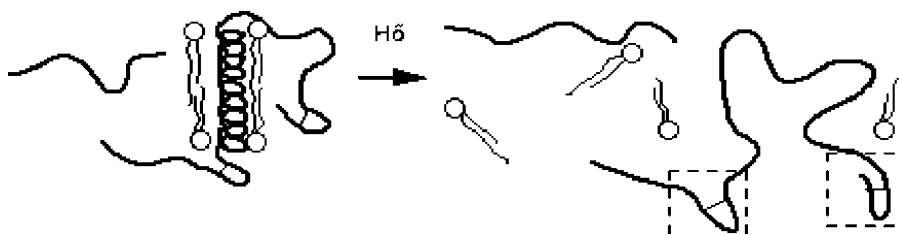
Az SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate- PolyAcrylamide Gel Electroforesis) esetén a vándorlás egy erősen hidratált poliakrilamid gélben történik, amelynek pórusátmérője szabályozható. A fehérjék kicsapására használt oldószer egy anionos detergenst, nátrium dodecil szulfátot tartalmaz, amely hő hatására (60 - 100°C) a fehérjék hidrofób részeihez kötődik, kicsomagolódásukat segíti elő és - lévén anionos detergens - negatív töltést kölcsönöz nekik. A fehérje oldathoz redukáló szert adagolva (β -merkaptotanol), a polipeptid láncok közötti diszulfid hidak (-S-S-) felbomlanak (1. ábra).

Az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátor (ammónium peroxidilszulfát, APS) és iniciátor (tetrametilén etilendiamin, TEMED) jelenlétében polimerizációra képes, és a reakció során nagy mólusúlyú lineáris polimer, ún. poliakrilamid keletkezik. Az APS spontán bomlása szabad gyök keletkezéséhez vezet, de e szabad gyök nem képes az akrilamid kettős kötését felhasítva elindítani a polimerizációt, arra viszont képes, hogy gerjessze a TEMED molekulát és az így keletkező szabadgyök már képes beindítani a polimerizációt. Ha keresztkötő ágenszt, N,N-metilén-bisz-akrilamidot is alkalmazunk, a hosszú poliakrilamid láncok között "hidak" képződnek, és térhálós szerkezetű gél keletkezik. Az elektroforézis során a fehérjéket ebben a gélben futtatjuk meg. Az eljárás különlegesen nagy felbontóképességgel rendelkezik. Ennek az oka az, hogy a relatív töltések különbségén alapuló szeparálással egyidőben a gélben a molekulák méret és alak szerint is elválnak egymástól, a gél molekulaszűrőként viselkedik. Ezt a molekulaszűrő hatást a gél átlagos pórusmérete szabja meg, ami az akrilamid - monomer koncentrációjának és a térhálósító metilén-bisz-akrilamid százalékos arányának alkalmas megválasztásával tág határok között változtatható. A gél mechanikus tulajdonságai kb. 4-20% akrilamid koncentráció - tartományban kedvezőek. A keresztkötő metilén-bisz-akrilamid mennyisége az alkalmazott akrilamid - monomernek rendszerint 1-3%-a.

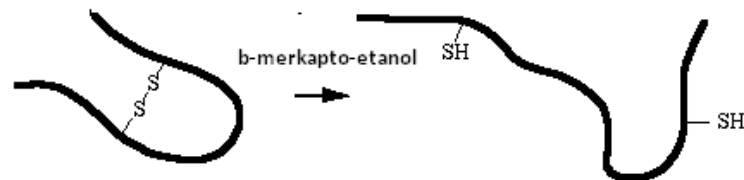
A poliakrilamid nem tartalmaz töltéssel rendelkező csoportokat, melyek az elektroforetikus szeparálást károsan befolyásolnák. Kémiaailag közömbös, stabil vegyület, az elválasztandó fehérjékkel nem lép specifikus kölcsönhatásba, nem zavarja a fehérjék detektálására szolgáló festési reakciókat, kompatibilis a legtöbb általánosan használt puffer rendszerrel.



A SDS részlegesen felbontja a fehérje foszfolipid kölcsönhatást



A SDS denaturálja a fehérjéket és hidrofób részeikhez kötődik



A β -merkaptóetanol felbontja a polipeptid láncok közötti diszulfid hidakat

1. ábra: A fehérjék denaturálása

2. A munka menete

készülék típusa

2.a. Előkészületek

A gél öntéshez használt üveglapok felületét alaposan tisztítsuk le mosószeres vízzel, desztillált vízzel és végül 70%-os etanollal. Szárítsuk le az üveg felületét papírtörülközővel. A gél öntő lapok összeállítását a 2. ábra mutatja.



2.b. Gél öntése:

FIGYELEM: Az akrilamid súlyosan károsítja az idegrendszert. Mind a gyűjtő, mind az elválasztó gél készítésekor gumikesztyűt kell viselni!!!

Először a 8%-os alsó **futtató gél** mérjük össze:

steril desztillált víz: 4,7 ml,

30%-os akrilamid metilén-bisz-akrilamid mix: 2,7 ml,

1.5M Tris-HCl pH 8,8: 2,5 ml,

10% SDS: 100µl.

Az ammónium-perszulfát-oldat és a tetrametiléndiamin (TEMED) hozzáadása előtt az oldatot körkörös mozzgatás közben addig tartjuk vákuum alatt, amíg több buborék már nem képződik benne (kb.10 perc). 10% APS-ből 50 μ l-t, TEMED-ből 5 μ l-t mérünk az oldatba, óvatosan elegyítjük majd a két üveglap közé öntjük. A gélünk vastagságát a spacerek vastagsága fogja meghatározni. A gél a képen látható jelleg pipettázzuk, úgy hogy a folyadék szintje kb. 2 cm-rel a kisebb üveglap felső szélé alatt legyen. A futtató géltre 100 μ l vízzel telített butanolt pipettázunk, ez elszigeteli a gélünket a levegőtől (O₂ jelenlétében nem polimerizálódik be a gél, ez a szerepe a kilevegőztetésnek is), simává varázsolja a gél felszínét és megakadályozza, hogy kiszáradjon (hiszen vízzel telített) (2/A. ábra). A gél dermedése kb. 30 perc.

Megj.: Ez a gél a fehérjék molekulatömeg alapján történő szétválasztására szolgál. A futtató gél akrilamid koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy az elválasztani kívánt fehérje méret tartományban a maximális molekula szűrő hatást fejtse ki.

Mérjük össze az 5%-os felső **gyűjtő gél** :

steril desztillált víz: 5,7 ml,

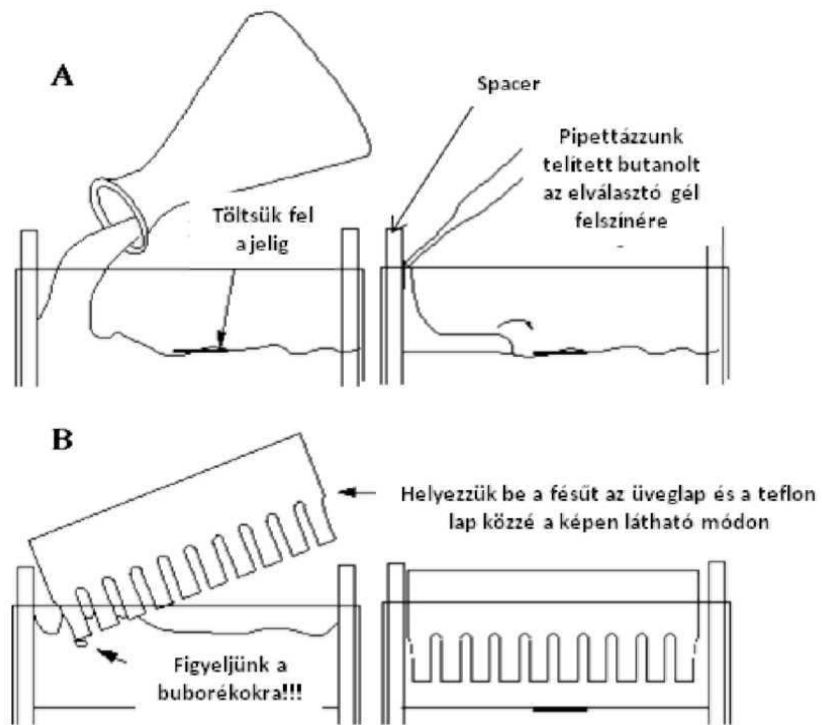
30%-os akrilamid metilén-bisz-akrilamid mix: 1,7 ml,

0,5M Tris-HCl pH 6,8: 2,5 ml,

10% SDS: 100ul,

Az ammónium-perszulfát-oldat és a tetrametiléndiamin (TEMED) hozzáadása előtt az oldatot körkörös mozzgatás közben addig tartjuk vákuum alatt, míg több buborék már nem képződik benne (kb.10 perc). 10% APS-ből 50 μ l-t, TEMED-ből 10 μ l-t mérünk az oldatba, óvatosan elegyítjük. A 30 perc letelte után ellenőrizzük, hogy megszilárdult-e a futtató gél. Ha igen, szűrőpapír segítségével leitatjuk a butanolt és óvatosan, buborékok nélkül rá pipettázzuk az 5%-os felső **gyűjtő gél**, majd behelyezzük a fésűt a 2/B ábrán látható módon. Fél órát várunk a gél teljes megszilárdulására.

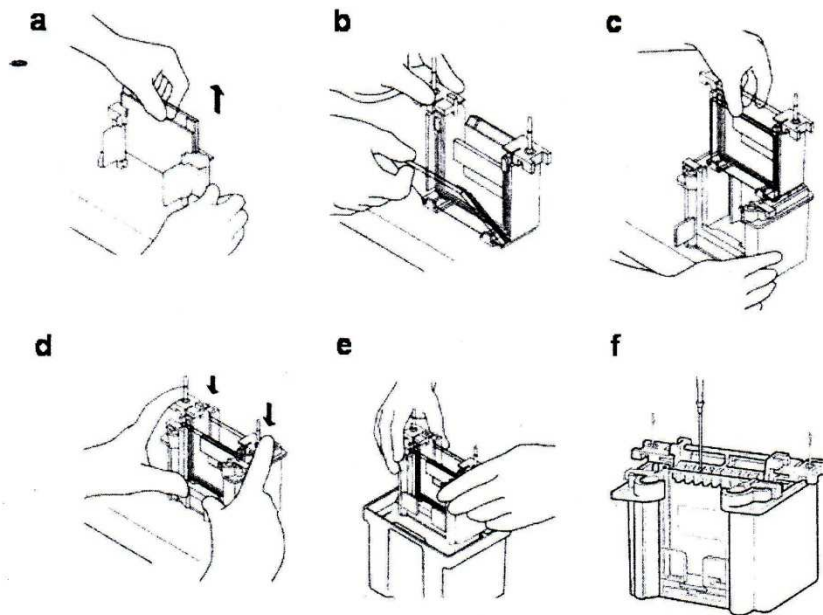
Megj.: Ez a gél a zsebekbe töltött fehérjék elválasztó gélbe való belépés előtti sűrítésére szolgál. A gyűjtő gél pH -ja 6.8. Ezen a pH - n a fehérjék gyorsabban mozognak, mint a futtató pufferben levő glicin anionok, a gélben levő klorid ionoknál viszont lassabban. Ezért a fehérjék a klorid glicin határfelületen koncentrálnak. Amikor a klorid glicin határfelület áthalad az elválasztó gélbe melynek pH - ja 8,8 a glicin teljes mértékben disszociál mobilitása nagyobb lesz mint a fehérjéké, a klorid glicin front elhagyja a fehérjéket.



3. ábra: A gél öntés menete

2. c. Minták felvitele és futtatása

Első lépés az elektroforézis modul összeállítása (4. ábra).



4. ábra Az elektroforézis modul összeállítása (a-e) és a minta felvitele (f).

- a. Távolítsa el a gél-szendvicset (poliakrilamid gél két üveglap között) az öntőkeretből.
- b. Helyezze a gél-szendvicset az elektródokat tartalmazó blokkhoz úgy, hogy a rövid üveglap befelé nézzen.
- c. A gél-szendvicset és az elektród blokkot együtt csúsztassa a tartó állványba.
- d. Miközben a blokkot lefelé nyomja a két kar benyomásával rögzítse a kerethez.
- e. Az így összeállított futtató kamrát eressze a futtató kádba.

Ha megszilárdult a gélnk, öntsünk 500 ml 1x futtató puffert a felső és alsó kamrákba, ügyelve arra, hogy a puffer ellepje a mintafelvívő vályúkat. Majd óvatosan vegyük ki a fésűt.

A mintákat úgy kell meghígítani, hogy a felvitt fehérjemennyiség sávonként kb. 10ug legyen. A hígított mintákhoz 1:2 arányban minta puffert keverünk, majd 95°C-on 5 percig hevítjük. A mintákat (10 - 30 μ l - t), és egy fehérje markert (5 μ l - t, ezzel a későbbiekben beazonosíthatjuk, hogy egy adott molekula tömegű fehérje hol helyezkedik el a gélben) a vályúkba pipetázunk.

Megj.: 10X futtató puffer készítése (pH 8,3): 1 l steril desztillált vízben feloldjuk a következőket: Tris: 30.3 g, glicin: 144 g, SDS: 10 g.

Minta puffer: deszt. víz: 3.55 ml, 0,5M Tris-HCl pH 6,8: 1.25ml, glicerin: 2.5ml, 10% SDS: 2ml, 0,5% brómfenolkék: 0.2ml. Közvetlenül a mintához való adagolás előtt 950 μ l mintapufferhez 50 μ l β -merkaptóetanolt adunk. (β -merkaptóetanol elbomolhat). Az előkészítés lényege az, hogy az SDS hatására a fehérjék denaturálódnak, a glicerin megnöveli a minta sűrűségét, ami lehetővé teszi a puffer alá való rétegezést, a festék színe megkönnyíti a felvitelt és az elválasztás követését, a β -merkaptóetanol diszulfid kötéseket bontja, puffer- pH=6,8, lásd fentebb.

Kezdetben, a gyűjtő gélben 80 V - os feszültséggel futtatjuk a mintáinkat, majd később az elválasztó gélben a feszültséget felemelhetjük 110 V - ra. A minták futtatása 1-2 órát vesz igénybe. Fél óra alatt jutnak be a minták az elválasztó gélbe és kb. kétórányit futnak benne (ezek az értékek erősen készülékfüggőek).

2.d A gél festése

A Coomassie festés a legáltalánosabban alkalmazott fehérjefestési módszer, mellyel sávonként 1-10 µg mennyiségű fehérjét lehet kimutatni. A gélt Coomassie Blue R250 festőoldatba (30% etanol, 10% ecetsav, 0,1% Coomassie Blue R250) helyezzik, és legalább 30 percen át benne hagyjuk.

A gélfestés minden egyes lépését szobahőmérsékleten, enyhe rázogatózás közben (például körkörös rázógéppel), egy erre alkalmas tartályban végezzük. A gélfestés során kesztyűt kell viselni, különben az ujjlenyomatok is megfestődnek.

A festőoldat eltávolítása után 10%-os ecetsavas oldattal enyhe rázogatózás közben szobahőmérsékleten a mosófolyadék többszöri cseréjével kimossuk a felesleges festéket. (kb 3× 20 perc) A mosást akkor lehet abbahagyni, ha a világoskék háttéren a sötétebb kék fehérje sávok jól láthatók.

2.e A gélkép fotózása

A jegyzőkönyv tartalmazzon:

- rövid elméleti bevezetést, az alkalmazott módszer bemutatásával,
- a gyakorlat leírását, szerzett tapasztalatokat.

A gyakorlathoz kapcsolódó elméleti ismeret:

Fehérjék szerkezete és funkciója

Forrás: Biorad, Mini-Protean Tetra Cell, Instruction Manual, Catalog numbers: 165-8000, 165-8001