

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS PAGE) in Western prenos (Teorija je v skriptih na straneh 67-74.)

Namen vaje: Spoznavanje elektroforeznih metod za ločevanje bioloških molekul in njihova detekcija ter Western prenos.

Uvod: Elektroforeza temelji na, Molekule se pri nativni PAGE ločujejo na osnovi, pri NaDS PAGE na osnovi in pri izoelektričnem fokusiranju na osnovi

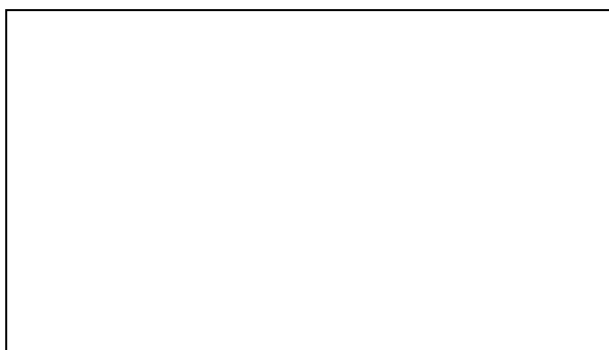
Potek dela:

1. Asistent pripravi plošči, razmaknjeni za 0,75 mm, med kateri boš vlij raztopino za gel.
2. V steklenički zmešaj komponente za 15% ločevalni gel:
 - 3,75 mL 40% raztopine akrilamida (vsebuje akrilamid : bisakrilamid v razmerju 37,5 : 1),
 - 2,5 mL 1M Tris/HCl, pH 8,8,
 - 3,6 mL dH₂O,
 - 0,1 mL 10% NaDS,
 - 0,05 mL 10% amonijevega persulfata,
 - 0,05 mL reagenta TEMED,in previdno vlij med v naprej pripravljene ploščici. Na površino nanesi približno 2 mm visoko plast dH₂O ali butanola, da se površina gela izravna.
3. Po 30 min, ko gel v celoti spolimerizira, odstrani dH₂O oz. butanol, spero z vodo in zmešaj reagente za koncentracijski gel:
 - 0,5 mL 40% raztopine akrilamida (vsebuje akrilamid : bisakrilamid v razmerju 37,5 : 1),
 - 1,25 mL 0.5 M Tris/HCl, pH 6,8,
 - 3,2 mL dH₂O,
 - 0,05 mL 10% NaDS,
 - 0,05 mL 10% amonijevega persulfata in
 - 0,01 mL reagenta TEMED,ter previdno vlij na ločevalni gel ter vstavi glavniček, tako da je spodnji rob žepkov okoli 0,5 cm nad zgornjim robom ločevalnega gela. V 30 min gel v celoti spolimerizira.
4. Asistent vpne pripravljen gel v aparaturo za elektroforezo in doda elektroforezni pufer (vsebuje 0,1% NaDS, 0,4 M Tris/HCl in 0,2 M glicin).
5. V prvo mikrocentrifugirko, ki vsebuje 10 µL proteinskega vzorca, dodaj 10 µL 2x nanašalnega pufera brez reducenta (vsebuje 0,2% barvila bromfenolmodro, 20% glicerol, 0,4% NaDS) in v drugo mikrocentrifugirko (z istim vzorcem) 10 µL 2x nanašalnega pufera z reducentom (vsebuje še 3,1% DTT). Vzorce inkubiraj 5 minut pri 100°C in nanesi na gel po navodilih asistenta. Pripravi naslednje vzorce: soja tripsinski inhibitor (STI), goveji serumski albumin (BSA), fibrinogen in vzorec po obarjanju z amonijevim sulfatom iz ene od prejšnjih vaj.
6. Asistent priključi napetost in pusti, da elektroforeza poteka pri konstantni napetosti 240V in začetnem toku 60 mA/2 gela dokler barvilo bromfenolmodro ne pride do spodnjega roba.
7. Po končani elektroforezi asistent odstrani gel za koncentriranje ter ločevalni gel 15 minut stresa v raztopini barvila Coomassie Brilliant Blue (vsebuje 0,025% Coomassie Brilliant Blue, 30% EtOH in 7% AcOH). Gel nato razbarva v raztopini, ki vsebuje 30% EtOH in 7% AcOH.
8. Drugi gel po elektroforezi ustrezno obreži in izmeri njegove dimenzije. Odreži zgornji desni vogal gela, da ga boš pravilno orientiral.
9. Gel prenesi v Towbinov pufer in ga namakaj 5-15 minut, da zavzame končne dimenzije.
Predolgo namakanje ni dobro, ker lahko pride do difuzije vzorcev.
10. Izreži 2 kosa Whatmann 3MM filter papirja in 1 kos PVDF (poliviniliden fluorid) membrane, vse v dimenzijah gela.
PVDF membrano prijemaj na konceh s pinceto.
11. Whatmann 3MM filter papirje in 2 blazinici iz tanka namoči v Towbinovem pufru.
12. PVDF membrano omoči v MeOH, nato jo namoči v Towbinov pufer. PVDF membrano za orientacijo zareži na istem koncu kot gel.

13. Plastično mrežo iz tanka razpri. Na črni del položi omočeno blazinico, nanjo položi omočen filter papir, nanj postavi gel tako, da se sprednja stran dotika filter papirja (odrezani rob je zgoraj levo). Na gel položi pravilno orientirano membrano (odrežan zgornji rob), nanjo položi omočen filter papir in še omočeno blazinico. Vmes večkrat povaljaj s stekleno epruveto ali plastično pipeto, da odstraniš vse zračne mehurčke med plastmi, ti bi namreč preprečili prenos proteinov.
14. Plastično mrežo zapri in jo postavi v tank tako, da je črni del mreže ob črnem delu tanka. V tank daj magnetni mešalček, tank pa v posodico z ledom, da se pufer med prenosom ne segreva preveč. Do vrha dolij Towbinov pufer.
Proteini so v Towbinovem pufru negativno nabiti in v električnem polju potujejo proti anodi (+).
15. Tank pokrij tako, da sta elektrodi na ustreznem delu (rdeča na rdečo, črna na črno) in priključi električno napetost (tok na začetku je 300 mA pri maksimalni napetosti). Prenos poteka 45-60 minut pri sobni T.
16. Nato razstavi sendvič. PVDF membrano dobro sperj z vodo in jo barvaj v raztopini barvila Coomassie Brilliant Blue (vsebuje 0.1 % Coomassie Brilliant Blue, 40% MeOH, 0.5% AcOH) eno minuto, razbarvaj jo v raztopini, ki vsebuje 40% EtOH.

Rezultati in odgovori na vprašanja:

1. V pravokotnik nariši, kar vidiš na gelu.



Komentar:

2. Oцени relativno molekulsko maso proteina v vzorcu STI: Ali je možno, da ima protein v vzorcu STI relativno molekulsko maso 43000? S katero metodo bi lahko to preveril?
3. Zakaj delamo diskontinuirno elektroforezo?
4. Opiši postopek, s katerim lahko po izoelektričnem fokusiranju detektiramo encime.
5. Ali lahko uporabljamo izoelektrično fokusiranje v preparativne namene?
6. Kako nespecifično detektiramo proteine na poliakrilamidnih gelih?
7. Proti kateri elektrodi bo potoval protein z izoelektrično točko 9,5 pri nativni PAGE izvedeni pri pH 8,0? Proti kateri elektrodi pa pri NaDS PAGE?
8. Encim katepsin L smo analizirali z NaDS PAGE in z izoelektričnim fokusiranjem. Oba gela smo pobarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue ter fotografirali (slika v skriptih na strani 117).
Kakšna je relativna molekulska masa katepsina L?Kakšna je njegova izoelektrična točka?..... Ali vsebuje disulfidne vezi?.....Ali lahko rečemo, da je protein čist?