

## Μέρος 4<sup>ο</sup>: Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνικών δειγμάτων με αποδιατακτική (SDS) ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου - Στοιχεία θεωρίας

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική μέθοδος με την οποία οι βιοχημικοί μπορούν να εξετάσουν την κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Στις μοντέρνες ηλεκτροφορητικές μεθόδους τα μόρια διαχωρίζονται σε ρυθμιστικά διαλύματα μέσα σε μια μήτρα πηκτής (gel). Η μετατόπιση των μορίων επηρεάζεται από:

- το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο
- το μέγεθος των πόρων της πηκτής
- το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, και τη χημική σύσταση των προς διαχωρισμό μορίων.

Πρόκειται για μια σχετικά γρήγορη και εύχρηστη μέθοδο, ικανή να αναλύσει πολλά διαφορετικά είδη βιομορίων, κυρίως όμως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.

### 1. ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Η κίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου, σε ένα μέσο όταν εφαρμόζεται σε αυτό ηλεκτρικό πεδίο δίνεται από την **εξίσωση 1**.

$$v = \frac{E \times q}{f} \qquad \text{Εξίσωση 1}$$

όπου

E = ηλεκτρικό πεδίο σε volt/cm

q = το συνολικό φορτίο του μορίου

f = συντελεστής τριβής, εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του μορίου

v = η ταχύτητα μετατόπισης του μορίου

Το φορτισμένο σωματίδιο μετακινείται με ταχύτητα που εξαρτάται ανάλογα από το ηλεκτρικό πεδίο (E) και το φορτίο (q) και αντιστρόφως ανάλογα από την τριβή (f). Η εφαρμοζόμενη τάση (E στην εξίσωση 1) συνήθως παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης παρόλο που σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζονται συνθήκες σταθερής έντασης (οπότε η τάση μεταβάλλεται σε συνάρτηση με την

αντίσταση) ή σταθερής ισχύος (γινόμενο τάσης και έντασης). Σύμφωνα με την εξίσωση 1, σε συνθήκες σταθερής τάσης, η μετατόπιση ενός φορτισμένου μορίου εξαρτάται μόνο από το λόγο  $q/f$ . Για μόρια με παρόμοια διαμόρφωση (για παράδειγμα, μια συλλογή γραμμικών τμημάτων DNA ή σφαιρικών πρωτεϊνών), το  $f$  εξαρτάται από το μέγεθος αλλά όχι το σχήμα των μορίων, δηλαδή η μετατόπιση των μορίων μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο γίνεται με ρυθμό ανάλογο του λόγου φορτίο προς μάζα.

Θεωρητικά, αν το φορτίο ενός μορίου είναι γνωστό θα ήταν δυνατό να συλλέξουμε πληροφορίες για το σχήμα του συγκεκριμένου μορίου μελετώντας την κινητικότητα του κατά την ηλεκτροφόρηση. Όμως η εξίσωση 1 ΔΕΝ περιγράφει επαρκώς τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Σημαντικοί παράγοντες, οι επιδράσεις των οποίων δεν προβλέπονται από την εξίσωση είναι π.χ. η αλληλεπίδραση των μετατοπιζόμενων μορίων με την πηκτή και η θωράκιση των μορίων από τα ιόντα των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Αυτό σημαίνει πως η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για τη συλλογή πληροφοριών όσο αφορά το σχήμα του μορίου αντίθετα χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εύρεση της σύστασης/καθαρότητας πρωτεϊνικών διαλυμάτων και τον προσδιορισμό του μεγέθους (μοριακού βάρους) των μακρομορίων. Κάθε μόριο σε ένα μείγμα έχει το δικό του φορτίο και μέγεθος επομένως ο τρόπος που κινείται μέσα στη μήτρα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι μοναδικός. Το συμπέρασμα αυτό αποτελεί τη βάση για την ανάλυση και το διαχωρισμό σε όλες τις ηλεκτροφορητικές μεθόδους.

## II. ΜΕΘΟΔΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

Όλα τα είδη ηλεκτροφόρησης βασίζονται στις αρχές που περιγράφηκαν παραπάνω.

Η βασική διαφορά μεταξύ τους εντοπίζεται κυρίως στο είδος της μήτρας, το οποίο μπορεί να είναι είτε κυτταρίνη είτε πηκτές διαφορετικού πάχους. Η κυτταρίνη χρησιμοποιείται ως μέσο για το διαχωρισμό βιομορίων χαμηλού μοριακού βάρους όπως αμινοξέα και υδατάνθρακες ενώ οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου και αγαρόζης χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων μεγάλου μοριακού βάρους (πρωτεΐνες και DNA αντίστοιχα). Διαφορές στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά (κάθετη ή οριζόντια ηλεκτροφόρηση), στα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται, στις πυκνότητες (άρα και στο μέγεθος των πόρων) των πηκτών και στις ηλεκτροφορητικές συνθήκες παρέχουν άφθονες δυνατότητες σχεδιασμού πειραμάτων με πηκτές

πολυακρυλαμιδίου ή/και αγαρόζης ώστε να προκύπτουν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα.

Στο συγκεκριμένο πείραμα θα χρησιμοποιηθεί ένα είδος πηκτής πολυακρυλαμιδίου - συγκεκριμένα αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου με απορρυπαντικό Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) η οποία παρουσιάζεται λεπτομερώς στη συνέχεια.

### Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου ή Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

Οι πηκτές που προέρχονται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου έχουν αρκετά πλεονεκτήματα κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης:

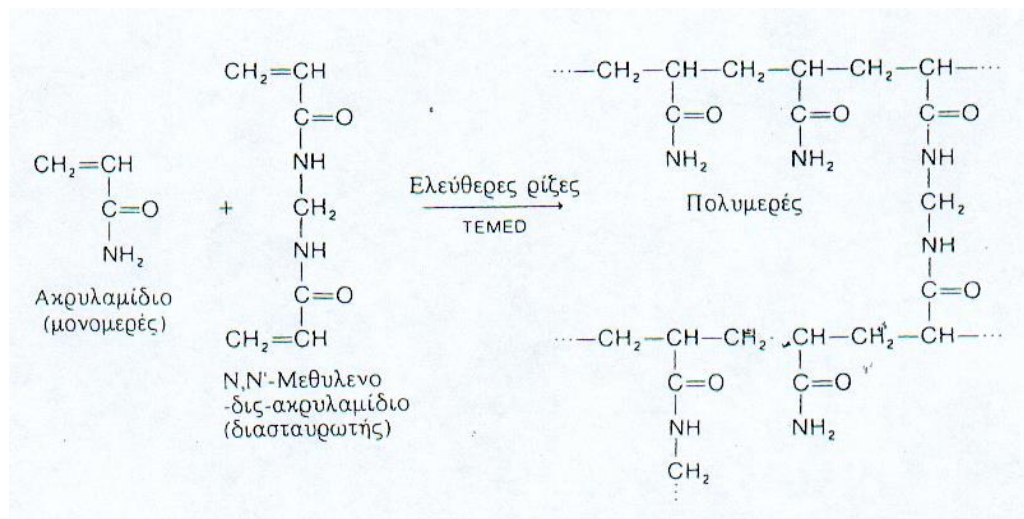
- Υψηλή διακριτική ικανότητα όσον αφορά το διαχωρισμό μικρού και μέτριου μεγέθους πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (μέχρι  $1 \times 10^6$  daltons) η οποία αποτελεί συνδυασμό της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου και του μοριακού κοσκινίσματος.
- Ικανότητα διαχωρισμού σχετικά μεγάλης ποσότητας δειγμάτων
- Αμελητέα αλληλεπίδραση των μετακινούμενων μορίων με τη μήτρα της πηκτής
- Φυσική σταθερότητα της μήτρας

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζονται κατά τον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου (μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών) και του παράγοντα δημιουργίας διασταυρώσεων N,N μεθύλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (Εικόνα 1). Τα συστατικά αυτά είναι σταθερά από μόνα τους αλλά πολυμερίζονται γρήγορα με την προσθήκη ενός συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Ουσιαστικά, παρασκευάζεται ένας συνδυασμός ρυθμιστικού διαλύματος, μονομερούς, αντιδραστηρίου διασταύρωσης και συστήματος ελευθέρων ριζών στον κενό χώρο που διαμορφώνεται μεταξύ δύο ορθογώνιων τζαμιών (ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli). Χρησιμοποιούνται κυρίως χημικές ή φωτοχημικές πηγές ελευθέρων ριζών. Στη χημική μέθοδο, μια ουσία που προκαλεί τη δημιουργία ελευθέρων ριζών όπως το υπερθειικό αμμώνιο (APS) προστίθεται με τον καταλύτη, N,N,-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Στη φωτοχημική μέθοδο το APS αντικαθίσταται από μια φωτοευαίσθητη ουσία (ριβοφλαβίνη) που δίνει ελεύθερες ρίζες με ακτινοβολία φωτός UV. Είναι προφανές ότι το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθορίζεται τόσο από την αναλογία ακρυλαμιδίου/δισ ακρυλαμιδίου όσο και από την ποσότητα του μείγματος αυτού στο διάλυμα παρασκευής της πηκτής (Πίνακας 1).

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Σχέση σύστασης πηκτής με το μέγεθος των πόρων

Ποσοστό ακρυλαμίδιου* (διάλυμα Α)	Πρωτεΐνες που μπορούν να διαχωριστούν
Πηκτή 15%	15 με 45 kDa
Πηκτή 12,5%	15 με 60 kDa
Πηκτή 10%	18 με 75 kDa
Πηκτή 7,5%	30 με 120 kDa
Πηκτή 5%	60 με 212 kDa

\* Διάλυμα Α: 30% ακρυλαμίδιο, 0,8% δις ακρυλαμίδιο

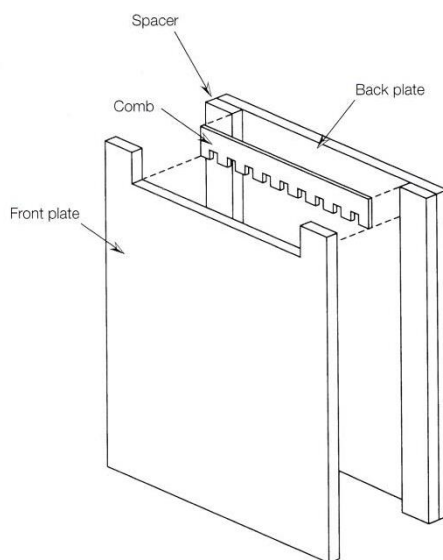


**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Σχηματισμός πηκτών πολυακρυλαμίδιου

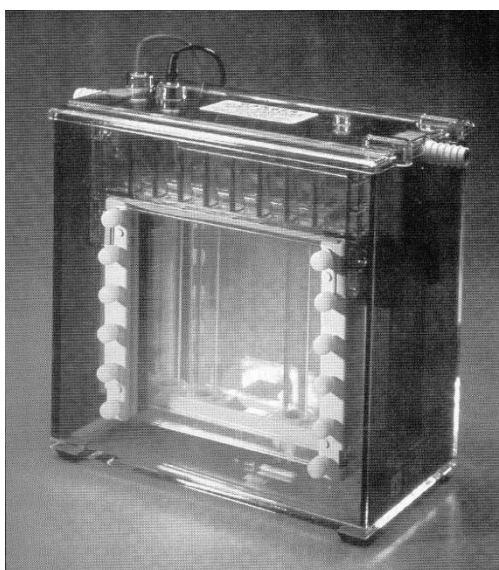
Ο πιο διαδεδομένος τρόπος εφαρμογής της μεθόδου περιλαμβάνει το σχηματισμό της πηκτής (slab gel) στον κενό χώρο που διαμορφώνεται μεταξύ δύο ορθογώνιων τζαμιών τα οποία κρατούνται σε απόσταση με τη βοήθεια συνθετικών διαχωριστικών (spacers) ανάλογου πάχους (Εικόνα 2). Τα διαχωριστικά εξασφαλίζουν ομοιόμορφο πάχος σε όλη την έκταση της πηκτής το οποίο ποικίλει από 0,5 έως 2,0 mm. Ένα πλαστικό ‘κτένι’ εισέρχεται στο πάνω μέρος του διαλύματος της πηκτής (πριν αυτό πολυμεριστεί) το οποίο αφαιρείται όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός διαμορφώνοντας τις θέσεις που θα τοποθετηθούν τα προς διαχωρισμό πρωτεϊνικά διαλύματα. Στη συνέχεια, όλη η διάταξη τοποθετείται μέσα στη δεξαμενή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (tank buffer), τα πρωτεϊνικά δείγματα τοποθετούνται καθένα ξεχωριστά σε κάθε ‘πηγάδι’ θέση στην κορυφή της πηκτής και εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα (Εικόνα 3). Όταν ολοκληρωθεί

η διαδικασία, η πηκτή απομακρύνεται από τα τζάμια και τοποθετείται σε διάλυμα βαφής για την εμφάνιση των πρωτεϊνών.

Αρκετές παραλλαγές πάνω στο βασικό αυτό πρωτόκολλο έχουν αυξήσει θεαματικά την ευελιξία και το εύρος χρησιμότητας της μεθόδου ως αναλυτικό εργαλείο. Παρακάτω θα δούμε με περισσότερες λεπτομέρειες δύο από αυτές τις παραλλαγές/βελτιώσεις.



**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Σχηματική διάταξη για τη συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Front/back plates-ορθογώνια τζάμια, spacers-πλαστικά διαχωριστικά, comb-κτένι για το σχηματισμό θέσεων τοποθέτησης δειγμάτων



**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (Courtesy of Hoefer Pharmacia Biotech, Inc., San Francisco).

### Μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής - Discontinuous ('disc') Gel Electrophoresis

Η μέθοδος αυτή διαφοροποιείται από το κλασσικό σχήμα για τρεις κυρίως λόγους:

(1) Η πηκτή αποτελείται από δυο στοιβάδες, αυτή που ξεκινά από τη βάση της πηκτής και σταματά 3 περίπου εκατοστά πριν από την κορυφή και αποτελεί την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) και την αμέσως από πάνω στοιβάδα που αποτελεί την πηκτή επιστοίβασης (stacking gel).

(2) Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των δυο αυτών στρωμάτων έχουν διαφορετικό pH και διαφορετική ιονική ισχύ.

(3) Η πηκτή επιστοίβασης έχει χαμηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου επομένως το μέγεθος των πόρων της είναι μεγαλύτερο (σε σχέση με την πηκτή διαχωρισμού).

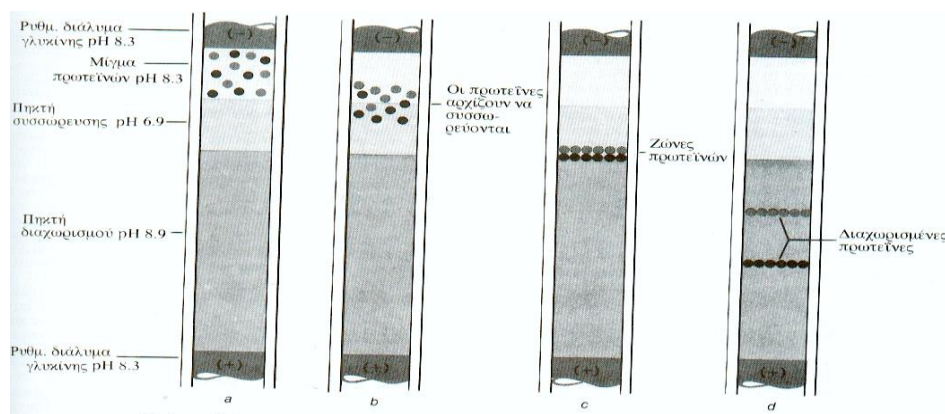
Λόγω των παραπάνω διαφοροποιήσεων στις πειραματικές συνθήκες, τα πρωτεϊνικά δείγματα σχηματίζουν ζώνες υψηλής συγκέντρωσης κατά την πορεία τους μέσα στην πηκτή επιστοίβασης γεγονός που οδηγεί στον καλύτερο διαχωρισμό τους στη συνέχεια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ως εξής:

Το πρωτεϊνικό δείγμα βρίσκεται σε ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-χλωρίου, pH 8 με 9 (ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης) κατά τη στιγμή της τοποθέτησής του στην πηκτή. Η γλυκίνη έχει κυρίως δυο μορφές όσον αφορά το φορτίο του μορίου στο pH αυτό, ουδέτερη και αρνητική (**Εξίσωση 2**).



Ο μέσος όρος του φορτίου στα ανιόντα της γλυκίνης είναι περίπου -0,2 σε pH 8,5 (ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης) αφού το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της γλυκίνης είναι περίπου 6. Όταν εφαρμοστεί η διαφορά δυναμικού, ιόντα χλωρίου και γλυκίνης που περιέχονται στο ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης (pH 8-9) καθώς και τα προς ανάλυση πρωτεϊνικά δείγματα εισέρχονται στην πηκτή επιστοίβασης (pH 6,9). Μόλις συμβεί αυτό, η ισορροπία που περιγράφεται στην εξίσωση 2 μετατοπίζεται προς τα αριστερά, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ουδέτερων μορίων γλυκίνης τα οποία αφού δεν έχουν φορτίο δεν έχουν και ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Για να διατηρηθεί σταθερή ροή ρεύματος πρέπει να υπάρχει αντίστοιχα σταθερή ροή ανιόντων, επομένως αφού οι περισσότερες πρωτεΐνες (και τα νουκλεϊκά οξέα) εξακολουθούν να επιδεικνύουν αρνητικό φορτίο σε pH 6,9 αντικαθιστούν τα ιόντα γλυκίνης στη ροή του ρεύματος. Συνεπώς, η σχετική κινητικότητα των ιόντων στην πηκτή επιστοίβασης

είναι: ιόντα χλωρίου > πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα > ουδέτερα μόρια γλυκίνης. Τα πρωτεϊνικά δείγματα συσσωρεύονται και σχηματίζουν στενές ζώνες υψηλής συγκέντρωσης μεταξύ ιόντων χλωρίου και γλυκίνης καθώς κινούνται μέσα στην πηκτή (εικόνα 4). Όπως προαναφέρθηκε, η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πηκτή επιστοιβάσης είναι χαμηλή (2-3% , μεγάλοι πόροι), οπότε η παρεμπόδιση της κίνησης λόγω τριβών είναι μικρή ακόμα και για μόρια μεγάλου μοριακού βάρους.



**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Μετατόπιση πρωτεϊνών σε ηλεκτροφόρηση ασυνεχούς πηκτής

Καθώς το μέτωπο των ιόντων εισέρχεται στην πηκτή διαχωρισμού η υψηλή συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (pH 8-9) προκαλεί τις εξής αλλαγές:

- Η γλυκίνη που προχωρεί τιτλοδοτείται πάλι σε pH 8-9 οπότε αποκτά μεγαλύτερο αρνητικό φορτίο (μεγαλύτερη κινητικότητα) και ξεπερνά τα μόρια των πρωτεϊνών.
- Οι πρωτεΐνες τιτλοδοτούνται σε pH 8-9 (αύξηση του αρνητικού τους φορτίου) και όμως εισέρχονται σε πηκτή με μεγαλύτερη πυκνότητα (συγκέντρωση) πολυακρυλαμιδίου (άρα μικρότερους πόρους) πράγμα που προκαλεί επιβράδυνση λόγω τριβών. Συνεπώς, η σχετική κινητικότητα των ιόντων στην πηκτή διαχωρισμού είναι: ιόντα χλωρίου > ανιόντα γλυκίνης > πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα. Κάτω από τις νέες αυτές συνθήκες, κάθε πρωτεΐνη μετατοπίζεται σε συνάρτηση του φορτίου και του μεγέθους της.

#### Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με SDS (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis-SDS PAGE)

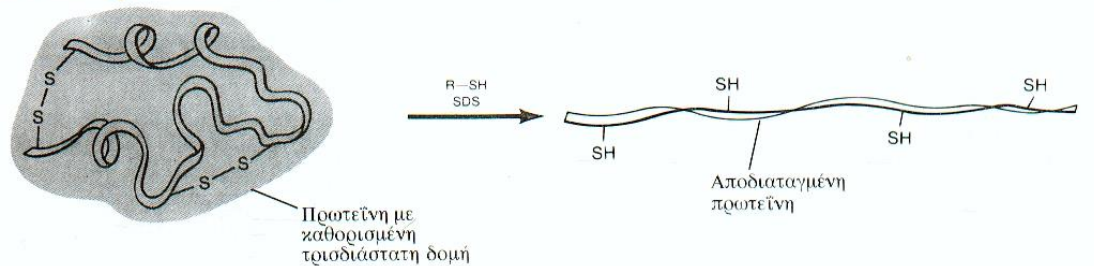
Τα συστήματα ηλεκτροφόρησης πηκτής ακρυλαμιδίου που αναφέρθηκαν παραπάνω, δεν μπορούν να εφαρμοστούν για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των βιολογικών μορίων επειδή η κινητικότητά τους εξαρτάται και από το

επιφανειακό φορτίο και από το μέγεθός τους. Εάν όμως τα μόρια τροποποιηθούν με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν λίγο πολύ όλα το ίδιο φορτίο τότε η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα θα εξαρτάται μόνο από το μέγεθός τους. Με βάση τη σκέψη αυτή, τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών μπορούν να προσδιοριστούν εάν η παραπάνω ηλεκτροφόρηση πραγματοποιηθεί παρουσία ενός ανιονικού απορρυπαντικού (δωδεκυλοθειικό νάτριο, Sodium dodecyl sulfate, SDS), και ενός παράγοντα αναγωγής δισουλφιδικών δεσμών (μερκαπτοαιθανόλη). Η μέθοδος στην περίπτωση αυτή συχνά αναφέρεται ως αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

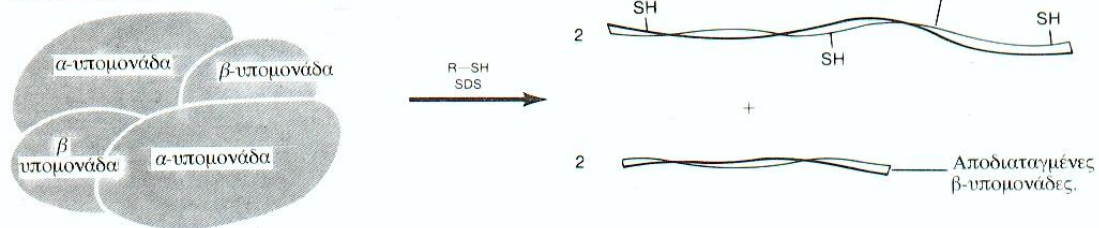
Οι δυο χημικές ενώσεις που προαναφέρθηκαν χρησιμοποιούνται για να διαχωρίσουν και να χαρακτηρίσουν τον αριθμό και το μέγεθος των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών ή των υπομονάδων τους σε ένα δείγμα. Αρχικά, το παρασκευάσμα της πρωτεΐνης αντιδρά με περίσσεια μιας διαλυτής θειόλης (π.χ. μερκαπτοαιθανόλης, R-SH) και ενός απορρυπαντικού (SDS). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η περίσσεια R-SH ανάγει όλους τους δεσμούς -S-S- που υπάρχουν στις πρωτεΐνες και το απορρυπαντικό SDS ενώνεται σ' όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης και αποκαλύπτει όλες τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ολική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων ώστε να προκύψουν ισχυρά ανιονικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων (Εικόνα 5). Συγκεκριμένα, το απορρυπαντικό προσδένεται στις υδρόφοβες περιοχές των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών με ένα σταθερό λόγο (περίπου 1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης). Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια απορρυπαντικού που έχουν προσδεθεί στην πρωτεΐνη καλύπτουν το φυσικό φορτίο της. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που προκύπτουν από την κατεργασία αυτή έχουν σταθερό λόγο φορτίου-μάζας και ομοιόμορφο σχήμα. Τελικά, η συγκέντρωση της πηκτής επιδρά σαν μοριακό κόσκινο, όπου το ιξώδες και το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθορίζουν την κινητικότητα των πρωτεϊνών. Προφανώς όσο πιο μικρό είναι το μόριο τόσο πιο μεγάλη είναι η κινητικότητά του. Στην πραγματικότητα, η σχετική κινητικότητα κάθε ανιονικής αποδιαταγμένης αλυσίδας πολυπεπτιδίου, είναι μια λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού του βάρους (Εικόνα 6). Πρέπει να τονιστεί όμως ότι η SDS-PAGE μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών υπομονάδων. Για παράδειγμα, μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δυο υπομονάδες με MB 80 και 40KDa θα δώσει δυο μπάντες που αντιστοιχούν στα παραπάνω MB και όχι μια μπάντα που αντιστοιχεί σε MB 120KDa.



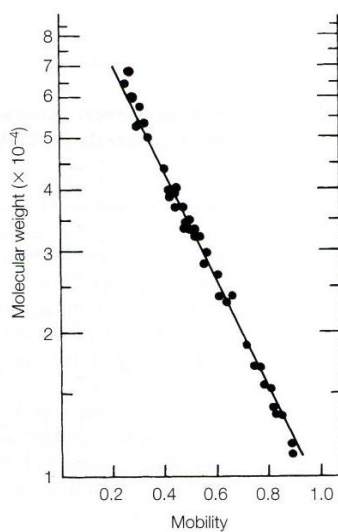
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΧΩΡΙΣ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ



ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΜΕ ΥΠΟΜΟΝΑΔΕΣ



**ΕΙΚΟΝΑ 5.** Αποδιάταξη πρωτεϊνών με περίσσεια θειόλης και SDS



**ΕΙΚΟΝΑ 6.** Διαγραμματική παράσταση της γραμμικής σχέσης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας μιας πρωτεΐνης σε συνάρτηση με το  $\log$  του μοριακού της βάρους. Παρουσιάζονται τριανταεπτά διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες με MW από 11 έως 70 KDa (Από K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem. **244**, 4406-1969).

**Πείραμα 1<sup>δ</sup>: Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός πρωτεϊνικών δειγμάτων με αποδιατακτική (SDS) ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου**

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ**

-Συσκευή ηλεκτροφόρησης

-Σύριγγες Hamilton 50μl

-Δείγματα α-λακταλβουμίνης (εμπορική α-λακταλβουμίνη και BSA 1mg/ml για standard, κλάσματα από τα προηγούμενα στάδια)

-Διαλύματα:

A. 30% w/v ακρυλαμίδιο, 0,8% w/v δις-ακρυλαμίδιο

B. Ρυθμιστικό διάλυμα 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS

Γ. Ρυθμιστικό διάλυμα 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS

Δ. NH<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 10% w/v σε H<sub>2</sub>O (παρασκευάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί)

E. TEMED

Z. Sample buffer (5x), 10ml (αποθηκεύεται στους -20 °C, σε κλάσματα του 1ml):

60mM Tris-HCl pH 6,8

25% glycerol

2 w/v% SDS

14,4 mM 2-mercaptoethanol

0,1 % w/v bromophenol blue

H. Ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης (1000ml):

25mM Tris

192mM γλυκίνη

0,1 % w/v SDS

(Τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε νερό και το pH του διαλύματος πρέπει να είναι περίπου 8,3).

Θ. Βαφή με Coomassie Blue R-250. Διάλυμα χρωστικής:

1 g Coomassie Blue

450 ml μεθανόλη

450 ml νερό

100 ml οξικό οξύ

I. Διάλυμα αποχρωματισμού:

800 ml νερό

100 ml μεθανόλη

100 ml οξικό οξύ.

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

#### **ΠΡΟΣΟΧΗ!**

Το ακρυλαμίδιο στη μη πολυμερισμένη μορφή του ερεθίζει το δέρμα και μπορεί να δράσει ως νευροτοξικό. Να φοράτε πάντοτε γάντια και μάσκα όταν το ζυγίζετε και να μην αναπνέετε ποτέ τη σκόνη. Να παρασκευάζετε όλα τα διαλύματα του ακρυλαμιδίου στον απαγωγό. Κρατάτε τα διαλύματα του ακρυλαμιδίου μακριά από το στόμα.

Όταν έχει ήδη αρχίσει η εφαρμογή της τάσης μην αγγίζετε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης ή τα καλώδια. Η τάση μπορεί να είναι μέχρι και 300 Volts και μπορεί να σας προκαλέσει ηλεκτροσόκ!!!!!!

#### **- Παρασκευή του πήγατος πολυακρυλαμιδίου:**

Πλύνετε τις γυάλινες πλάκες ηλεκτροφόρησης με απορρυπαντικό και μετά με ζεστό νερό. Ξεπλύνετε με απιονισμένο νερό και μετά με 95% αιθανόλη. Φτιάξετε στρώματα πηκτής (gels) πάχους 0,7 – 1,0 mm ακολουθώντας τις οδηγίες που περιέχονται στις οδηγίες χρήσης της συσκευής. Συγκεντρώστε τα παρακάτω διαλύματα (τα γράμματα αναφέρονται σε διαλύματα που έχετε ήδη παρασκευάσει προηγουμένως). Οι παρακάτω ποσότητες έχουν υπολογιστεί για δύο μικρά gel πάχους 0,75mm. Προσαρμόστε τις ποσότητες ανάλογα με τις ανάγκες σας:

#### **Πηκτή διαχωρισμού**

4,5 ml διαλύματος A

2,5ml διαλύματος B

3 ml νερού

Ανακατεύετε καλά το παραπάνω διάλυμα πηκτής διαχωρισμού και επιπλέον προσθέτετε:

100μl  $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$  10% w/v σε  $\text{H}_2\text{O}$

15μl TEMED

Ανακατεύετε και πάλι καλά.

Προσθέστε το μίγμα ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες χρησιμοποιώντας μια πιπέτα Pasteur. Γεμίστε μέχρι ένα ύψος 15mm από το πάνω μέρος. Καλύψετε το πάνω μέρος της πηκτής με μια λεπτή στοιβάδα νερού ή 95% αιθανόλης. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσα σε περίπου 30 min. **Αμέσως μετά αφαιρέστε το νερό που υπάρχει στο πάνω μέρος της πηκτής.**

### Πηκτή επιστοιβάσης

Αναμείξτε όπως προηγουμένως:

0,67 ml διαλύματος A

1 ml διαλύματος C

2,3 ml νερού

Ανακατεύετε καλά και στη συνέχεια προσθέστε επιπλέον:

50 μl  $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$  10% w/v σε  $\text{H}_2\text{O}$

15 μl TEMED

Ανακατεύετε και πάλι καλά.

Προσθέστε την πηκτή επιστοιβάσης ανάμεσα στις πλάκες (πάνω από την πηκτή διαχωρισμού). Γεμίστε μέχρι την κορυφή και προσθέστε αμέσως το κτένι δειγμάτων. Πολυμερίστε για 30 min περίπου. Αφαιρέστε προσεκτικά το κτένι και ξεπλύνετε τα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί χρησιμοποιώντας μια σύριγγα με απιονισμένο νερό. Προσαρμόστε το gel στη συσκευή και προσθέστε το ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης.

Τοποθετήστε κάθε δείγμα σε ένα πηγαδάκι. Πριν την τοποθέτηση, κάθε δείγμα αναμιγνύεται με διάλυμα δείγματος (sample buffer) σε αναλογία δείγμα:sample buffer= 4:1. Φυγοκεντρίστε τα δείγματα για λίγα δευτερόλεπτα ώστε να αναμειχθούν τα συστατικά και να συσσωρευτούν στη βάση του σωλήνα.

Συνήθως ο όγκος του διαλύματος που τοποθετείται στα πηγαδάκια είναι περίπου 15μl αλλά αυτό εξαρτάται φυσικά από το πάχος της πηκτής και το μέγεθος του πηγαδιού που σχηματίζεται (όσο πιο πολλά πηγαδάκια διαθέτει το κτένι της συσκευής τόσο πιο λίγο δείγμα μπορεί να τοποθετηθεί στο καθένα).

Αφού γίνουν οι κατάλληλες συνδέσεις της συσκευής ηλεκτροφόρησης με το τροφοδοτικό, ρυθμίστε το ρεύμα στα 25–30mA (ανά πηκτή). Όταν η χρωστική φθάσει στο κάτω μέρος **σβήνετε το τροφοδοτικό** και αφαιρείτε τις γυάλινες πλάκες

από τη συσκευή. Διαχωρίστε προσεχτικά τις δυο πλάκες με μια σπάτουλα και μεταφέρετε την πηκτή (σε ένα κομμάτι) μέσα σε ένα δίσκο που περιέχει το διάλυμα βαφής.

Για τη βαφή με τη χρωστική Coomassie, η πηκτή μένει στο διάλυμα βαφής περίπου 30 min υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, αφαιρέστε το διάλυμα βαφής και προσθέστε διάλυμα αποχρωματισμού. Αναδεύσετε μέχρι να γίνουν εμφανείς οι ζώνες που περιέχουν τις πρωτεΐνες (σκούρες μπλε ζώνες).

Μπορείτε να επισπεύσετε την όλη διαδικασία αν το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται με φρέσκο διάλυμα κάθε 30 min ή/και αν προσθέσετε ένα μικρό, καθαρό κομμάτι από σφουγγάρι στο δοχείο που γίνεται ο αποχρωματισμός.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

R. Boyer, J. Chem. Educ. 68, 430-432 (1991). " Purification of Milk Whey  $\alpha$ -Lactalbumin by Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography".

R. Boyer, Concepts in Biochemistry, (1999), Brooks/Cole (Pacific Grove, CA), pp. 102-105. Protein purification and analysis.

K. Ebner, Acct. Chem. Res. 3, 41-47 (1970). Biological role of  $\alpha$ -Lactalbumin.

R. Garrett and C. Grisham, Biochemistry, 2nd ed. (1999), W.B Saunders (Orlando, FL), pp.153-157. Protein techniques.

L. Hall and P. Campell, in Essays in Biochemistry, Vol.22, R. Marshall and K. Tipton, Editors (1988), Academic Press (London), pp. 1-26. A review on  $\alpha$ -Lactalbumin.

E. Harris and S. Angal, Editors, Protein Purification Applications: A Practical Approach, Vol. 2 (1990), IRL Press (Oxford). An excellent book for undergraduates.

C. Mathews, K. van Holde, and K. Ahern, Biochemistry, 3rd ed. (2000), Benjamin/Cummings (San Francisco), pp. 148-152. Isolation and purification of proteins.

J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage, Nature 258, 598-599 (1975). 'Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation'.

L. Stryer, Biochemistry, 4th ed. (1995), W. H. Freeman (New York), pp. 45-52. Isolation, purification, and characterization of proteins.

D. Voet and J. Voet, Biochemistry, 2nd ed. (1995), John Wiley & Sons (New York), pp. 72-104. Study of proteins.

D. Voet, J. Voet, and C. Pratt, Fundamentals of biochemistry (1999), John Wiley & Sons (New York), pp. 96-107. An introduction to protein purification and analysis.