

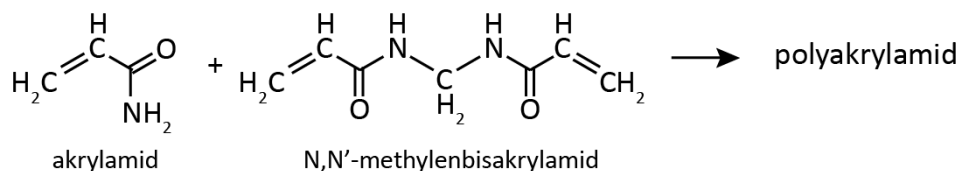
Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek

1. Teoretický úvod

1.1. Elektromigrační metody

Elektroforéza neboli migrace iontů v elektrickém poli, se velmi často používá pro analytické dělení biologických látek. Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Používané nosiče by měly být stabilní a inertní, musí být vodivé a jejich struktura nesmí bránit putování iontů ve vodném prostředí. U běžně používaných gelů, jako je agarosa nebo polyakrylamid, je možné ovlivnit velikost jejich pórů. Separace molekul je založena jednak na elektroforetické pohyblivosti dělených látek, jednak na velikosti molekul. Při gelové elektroforéze se velké molekuly oproti malým relativně zpožďují (obtížněji pronikají gelem).

Běžně používaným nosičem je polyakrylamidový gel, který je inertní, mechanicky pevný, průhledný a skýtá možnost přípravy nosiče různých předem určených vlastností (hustota zesíťování gelu, gradient hustoty gelu aj.). Polyakrylamidový gel vzniká polymerací akrylamidu (AA) a N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), která je zahájena volnými radikály vzniklými při rozkladu persíranu amonného (APS) ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2 SO_4^{\cdot-}$) nebo při rozložení riboflavinu působením světla za přítomnosti malého množství O_2 . Do směsi se vždy přidává stabilizátor volných radikálů TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin).



Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm zesíťování (lineární řetězce vznikají spojováním monomerů akrylamidu, příčné vazby mezi nimi jsou tvořeny BIS - stupeň zesíťování lze ovlivnit změnou poměru AA/BIS). Nejčastější celkové koncentrace akrylamidu jsou 3 - 15 % (značí se % T), přičemž koncentrace N,N'-metylenbisakrylamidu obvykle odpovídá 5 % celkového množství akrylamidu (značí se % C).

$$V = \frac{(a + b) \times 100}{\%T} \quad (a + b) = \frac{b \times 100}{\%C}$$

(a - hmotnost akrylamidu v g, b - hmotnost N,N'-metylenbisakrylamidu v g, V - objem v ml)

Uspořádání elektroforézy může být v trubičkách nebo v tenké vrstvě (mezi dvěma skleněnými deskami). Zásadní dělení technik elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (PAGE) není podle typu gelu či jeho tvaru, ale podle toho, zda je v kontinuálním nebo

diskontinuálním systému. Diskontinuita může být jak v koncentracích gelu, tak především v pH a iontové síle.

Velmi ostré zóny získáme při diskontinuální elektroforéze, která používá dva různé gely a několik odlišných pufrů o různém pH. Dělicí (separační, dolní) gel se překryje asi jednocentimetrovou vrstvou tzv. zaostřovacího (startovacího, horního) gelu s velkými póry. Zaostřovací gel a vzorkovací pufr obsahují Tris-chloridový pufr, jehož pH (6,8) je asi o dvě jednotky nižší než má pufr dělicího gelu (9,2). Elektrodotový roztok obsahuje Tris-glycinátový pufr pH 8,3. V prostředí zaostřovacího gelu je nejpohyblivějším aniontem chloridový, pohyblivost komponent vzorku (bílkovin) je menší. Za zónou chloridů následují zóny bílkovin seřazené podle elektroforetických pohyblivostí. Poslední zónu tvoří glycin. Hodnota intenzity proudu je nastavena na určitou konstantní velikost. Seřazené zóny se pohybují stejnou rychlostí, dochází ke vzniku ostře ohraničených za sebou těsně následujících zón iontů (uvedený princip je základem elektromigrační metody - izotachoforézy). Vzhledem k tomu, že rychlost pohybujících se zón je konstantní, vytváří se stupňovitý gradient potenciálu. Projevuje se tzv. „samozaostřující efekt“. Zpozdí-li se některý ion za „svou“ zónou, tj. zónou odpovídající příslušné pohyblivosti, octne se v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho okamžitě urychlí tak, aby „dohnal“ svou zónu (a naopak). Po vstupu seřazených iontů do dělicího gelu, který má vyšší hodnotu pH, se glycin stává druhým nejpohyblivějším iontem po chloridových iontech a současně v důsledku různé pohyblivosti v gelové matici dochází k rozdělení zón od sebe (dělení podle náboje a velikosti molekul). Pohyb čela se indukuje přidáním nízkomolekulárního barviva (bromfenolové modři) ke vzorku, které vytváří ostrý pruh putující s čelem.

Častou variantou PAGE je elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS na gram bílkoviny a udílí jim uniformní náboj. Přesná povaha vzniklých asociátů není známá, předpokládá se micelární struktura, uvnitř které dochází k nekovalentním interakcím mezi uhlovodíkovými řetězci dodecylsulfátu a hydrofobními oblastmi bílkoviny. Nabité skupiny na povrchu micely jsou pak v kontaktu s pufrům. Celkový náboj částice je přitom záporný. Aby tyto komplexy mohly vzniknout, je nutné rozštěpit disulfidové můstky mezi řetězci bílkovin, nebo uvnitř těchto řetězců pomocí látek redukujících tyto můstky (př. merkaptoethanol, dithiothreitol). Některé bílkoviny je nutné ještě zahřát na 60 či 100 °C po několik minut, proto se tento krok provádí ve všech případech. Vzniklé asociáty mají uniformní náboj a tvar tyčinky o konstantním průměru a délce úměrné relativní molekulové hmotnosti (SDS musí být přítomen ve vzorku i v gelu). Z kalibračního grafu (závislost relativní vzdálenosti R_f na logaritmu relativní molekulové hmotnosti ($\log M_r$) standardů) lze stanovit molekulovou hmotnost neznámého vzorku. Nevýhodou této metody je skutečnost, že nepodává informace o nativním stavu bílkoviny.

Elektroforetická separace probíhající v nedenaturujícím prostředí pro proteiny, kdy si proteiny zachovávají své přirozené vlastnosti (např. enzymatickou aktivitu, sérologické vlastnosti) a jsou děleny podle svého tvaru/velikosti a náboje se využívá při:

1. detekci enzymové aktivity,
2. stanovení isoenzymových spekter,
3. separaci biologicky aktivních molekul.

1.2. Peroxidasy

Peroxidasy (POX, EC 1.11.1.7) jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo i jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny. Mezi nejlepší substráty peroxidas lze řadit fenoly a aromatické aminy. Podle charakteru aktivního místa jsou POX děleny do tří skupin – nejpočetnější skupinou jsou hemové, dále vanadové a ostatní peroxidasy. Obsah sacharidů se u jednotlivých POX velmi liší. Relativní molekulová hmotnost je v rozmezí 42 000–158 000. O peroxidasách je známo, že se vyskytují ve velkém množství forem, např. křenová peroxidasa – 14 forem. Jsou-li tyto formy skutečnými isoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin nebo se jedná o posttranslační modifikace, není dosud známo. Peroxidasy byly nalezeny prakticky ve všech rostlinných pletivech. Mohou být přítomny buď volné (v cytoplazmě, vakuolách, mezibuněčném prostoru) nebo vázané (buněčná stěna, plazmatická membrána, organelové membrány). Vazba může být iontová, ale i kovalentní.

2. Praktická část

2.1. Cíle úlohy

- Stanovení isoenzymového zastoupení rostlinných peroxidas metodou diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek
- Naučit se: přípravit vzorky pro nativní elektroforézu
 sestavit aparaturu pro nalévání gelu
 připravovat gely
 nanášet vzorky na gel
 vizualizovat enzymy v gelu
- Pochopit princip elektroforetického dělení

2.2. Materiál

Jako výchozí materiál pro přípravu vzorků pro nativní elektroforézu lze použít semenáčky hrachu, listy rajčete, křen, apod.

2.3. Přístroje a vybavení

Chlazená centrifuga, elektromagnetická míchačka, digitální předvážky, vortex, třepačka, chladnička, aparatura pro přípravu gelu a pro elektroforézu, zdroj pro elektroforézu, skla pro elektroforézu, hřebínek, automatické pipety.

2.4. Chemikálie

Tris-HCl, *n*-butanol, kyselina chlorovodíková, glycin, methanol, glycerol, bromfenolová modř, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, akrylamid (AA), N,N'-metylenbisakrylamid (BIS), persíran amonný (APS), 4-chloro-1-naftol, peroxid vodíku, ethanol.

2.5. Roztoky

- **Extrakční pufr pro nativní elektroforézu - 0,1 M Tris-HCl, pH 7**
12,11 g Tris se rozpustí v 600 ml vody, upraví se pH na 7 pomocí HCl a doplní se vodou na 1 l. Uchovává se při 4 °C.
- **AA/BIS (30 % T, 2,67 % C)**
73 g akrylamidu a 2 g N,N'-metylenbisakrylamidu se postupně rozpustí ve 125 ml destilované vody; doplní se destilovanou vodou do 250 ml.
- **Pufr do zaostřovacího/stacking gelu**
3,03 g Tris se rozpustí ve 40 ml vody, upraví se pH na 6,8 pomocí HCl a doplní vodou na 50 ml. Uchovává se při 4 °C.
- **Pufr do dělicího/running gelu**
36,33 g Tris se rozpustí ve 150 ml vody, upraví se pH na 8,8 pomocí HCl a doplní vodou na 200 ml. Uchovává se při 4 °C.
- **10% persíran amonný**
0,1 g APS se rozpustí v 1 ml vody. Připravuje se vždy čerstvý roztok v potřebném množství.
- ***n*-Butanol nasycený vodou**
K 50 ml *n*-butanolu se přidá 5 ml destilované vody, pořádně se protřepe. Uchovává se při pokojové teplotě.
- **Elektrodotový pufr pro nativní elektroforézu**
6,055 g Tris a 28,823 g glycinu se rozpustí v 1 l vody, zkontroluje se pH (neupravovat) a doplní vodou na 2 l. Uchovává se při 4 °C.
- **60% glycerol**
6 ml glycerolu se smíchá se 4 ml vody. Uchovává se při pokojové teplotě.
- **bromfenolová modř**
1 mg bromfenolové modře se rozpustí v 1 ml 60% glycerolu a přidá se kapka hydroxidu sodného.
- **Barvicí roztok s 4-Cl-1-naftolem - aktivita peroxidás**
Ke 4 mg 4-chloro-1-naftolu se přidá 2,5 ml vychlazeného methanolu, 12,5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7 a 20 µl 30% H₂O₂.

2.6. Postup

2.6.1. Příprava vzorků

Upozornění:

Z důvodů zachování enzymové aktivity je nutné při přípravě vzorku (extrakci) provádět všechny kroky při nízké teplotě a poměrně rychle.

- Na předvážkách odvažte 1 g rostlinného materiálu, který následně přeneste do třecí misky umístěné na ledové lázni. Přidejte špetku mořského písku a pufr 0,1 M Tris-HCl, pH 7 (1 ml pufru na 1 g váhy materiálu, pro křen 3 ml pufru na 1 g materiálu). Rostlinný materiál rozetřete na jemnou kaši (tzv. homogenát).

- Homogenát přeneste rovnoměrně do dvou plastových mikrozkušavek (1,5 ml ependorfka) a zcentrifugujte (15 min, 12000 rpm, 4 °C).
- Po ukončení centrifugace přeneste supernatant (rostlinný extrakt) do čisté ependorfky a uložte do ledové lázně.
- Vzorek pro nativní elektroforézu připravte smícháním rostlinného extraktu s 60% glycerolem v poměru 3:1 (v:v). Promíchejte na vortexu.

2.6.2. Příprava polyakrylamidového gelu

Upozornění:

Akrylamid a N,N'-metylenbisakrylamid jsou neurotoxické látky! Při nanášení vzorků na gel, manipulaci s aparaturou a gely, stejně tak při samotné přípravě gelů je nutné pracovat s největší opatrností a v gumových rukavicích.

- Nasadte si ochranné rukavice.
- Skla pro přípravu gelu důkladně umyjte jarem, vodou a následně opláchněte destilovanou vodou. Po vysušení ze skel odstraňte zbytky mastnoty ethanolom. Skla vždy držte pouze za hrany.
- Sklo s nalepeným spacerem (mezerník) přiložte ke kratšímu sklu, skla opatrně vložte a upevněte do stojánku pro skla. Stojánek se skly upevněte do nalévacího stojánku.
- Mezi skla vložte hřebínek a označte na kratším skle popisovačem vzdálenost 1 cm od konce zubů hřebínku. Poté hřebínek odstraňte.
- V kádinkách smíchejte dle rozpisu uvedeného v tabulce 1 roztoky pro přípravu zaostřovacího a dělicího gelu. Pozor, přidavkem APS se startuje polymerační proces. Z tohoto důvodu se APS přidává do roztoků těsně před naléváním roztoků pro daný gel mezi elektroforetická skla. Roztok promíchejte na elektromagnetické míchačce.
- Připravte si vždy čerstvý roztok APS v potřebném množství navážením 20 mg APS v 1,5 ml ependorfce. K APS přidejte 0,2 ml vody. Přidavkem APS do kádinky s roztokem pro dělicí gel zahájíte polymeraci gelu. Směs po promíchání rychle přeneste pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla až po značku na skle, znázorňující vzdálenost 1 cm pod hřebínkem.
- Zkontrolujte, zda nejsou v gelu vzduchové bubliny. Gel převrstvěte *n*-butanolem.
- Po 15 minutách zkontrolujte nakloněním skel, zda je gel ztuhlý. Pokud ano, odstraňte *n*-butanol z prostoru mezi skly. Povrch gelu opláchněte destilovanou vodou a vysušte pomocí filtračního papíru.
- Polymeraci zaostřovacího gelu nastartujte přidavkem APS do kádinky s daným roztokem. Směs rychle přeneste pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla nad dělicí gel.
- Opatrně vložte hřebínek do gelu mezi skla, pod zoubky hřebínku nesmí zůstat bubliny. Stane-li se tak, hřebínek rychle vyjměte a znovu vsuňte. Pozor, roztok se stává viskózní během několika minut.
- Za 20 minut je gel připraven pro další použití.

Tabulka 1 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	voda	TEMED	APS
8% dělicí	1,3	1,25	-	2,3	0,005	0,075
4% zaostřovací	0,325	-	0,625	1,475	0,005	0,05

2.6.3. Aplikace vzorků

- Po ztuhnutí zaostřovacího gelu vyndejte stojánek se skly z nalévacího stojánku. Skla s gely ze stojánku uvolněte a vyjměte je.
- Popisovačem vyznačte na straně delšího skla místo, kde končí zuby hřebínku.
- Skla s gely upevněte do elektroforetické komůrky (kratší sklo směřuje do středu komůrky). Pokud máte připravený pouze jeden gel, vložte na místo druhého gelu náhradní plastovou desku.
- Ze zaostřovacího gelu opatrně plynule vytáhněte hřebínek.
- Do elektrodové komůrky (mezi skla) nalijte elektrodový pufr. Pomocí Pasteurovy pipety opatrně promyjte jamky pufrům, zbavíte je tak zbytků gelu.
- Do jamek aplikujte 15 μ l vzorků dle instrukcí vedoucího cvičení. Do krajních jamek, ve kterých dochází k deformaci zón, naneste 10 μ l směsi bromfenolové modři s 60% glycerolem.
- Nezapomeňte si zapsat pořadí vzorků.
- Po nanesení vzorků, se ujistěte, že komůrka těsní (na stole není proteklý pufr). Poté komůrku vložte do elektroforetické vany.
- Vanu naplňte po značku na stěně dle počtu gelů elektrodovým pufrům. Ze spodní strany desek odstraňte vzduchové bubliny.
- Elektroforetickou komůrku uzavřete víkem, dávejte pozor na správnou orientaci elektrod.

2.6.4. Vlastní elektroforetické dělení

- Elektroforetickou aparaturu přeneste do chladničky a připojte ke zdroji. Opět zkontrolujte správnou orientaci elektrod.
- Na zdroji nastavte konstantní napětí 100 V. V okamžiku kdy zóna bromfenolové modři v krajních jamkách doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu (cca 10–15 min), nastavte zdroj na konstantní napětí 180 V.
- Po doputování zóny bromfenolové modři (čelo dělicích se látek) na úroveň dolního okraje skla (cca 50 min) vypněte zdroj, odpojte komůrku od elektroforetického zdroje, odstraňte víko a vylijte elektrodový pufr do odpadu.
- Skla uvolněte ze stojánku. Pomocí plastové špachtle (mírně páčit) oddělte skla od gelu. Zaostřovací gel oddělte (odřezte) od gelu dělicího. Orientaci gelu označte odkrojením jednoho ze spodních rohů. Poznamenejte si, který roh jste odkrojily. Toto

je velmi důležité pro vyhodnocování výsledků a identifikaci vzorků. Zaostřovací gel i odřezaný roh gelu vyhod'te do odpadu (speciální nádoba).

- Gel přeneste do nádoby s cca 15 ml 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 7 a umístěte na třepačku.

2.6.5. Barvení gelu – detekce enzymů s peroxidasovou aktivitou

- Připravte si barvicí roztok s 4-chlor-1-naftolem dle návodu uvedeného v kapitole 1.5. Roztoky. Barvicí roztok vystačí k nabarvení dvou gelů.
- Po 5 min na třepačce pufr odstraňte a přidejte barvicí roztok obsahující 4-chlor-1-naftol a peroxid vodíku.
- Po 5–20 min (podle intenzity vybarvení) odstraňte barvicí roztok a gel několikrát propláchněte destilovanou vodou.

2.6.6. Dokumentace gelu

- Gel přeneste na čistou skleněnou podložku.
- Zdokumentujte vyfocení.

2.7. Vyhodnocení

- Isoenzymové zastoupení peroxidas ve vzorcích dokumentujte obrázkem opatřeným popisem vzorků získaným vyfotografováním, případně naskenováním gelu.
- Do tabulky přehledně uveďte počet pozorovaných isoenzymů u studovaných rostlin a jejich mobilitu (vzdálenost jednotlivých bandů od počátku gelu v cm).
- Při zpracování obrázku proveďte úpravy tak, aby nedošlo ke ztrátě potřebných dat (lze upravit kontrast, zaostření, otočení, pozadí).

2.8. Možné problémy

- Pro získání ostrých bandů na gelu lze modifikovat vlastnosti polyakrylamidového gelu.
- Kvalitu získaných výsledků ovlivňuje rovněž zdroj detekovaného enzymu a způsob přípravy vzorků.
- Enzym může být degradován současně vyextrahovanými proteasami. Je vhodné doplnit extrakční pufr o směs inhibitorů proteas.
- Je nutné důsledně dbát na přesnost při přípravě gelů (možnost záměny použitých roztoků).
- Pokud po složení kompletní elektrodové komůrky dochází k úniku elektrodového pufru je nutné komůrku znovu a důkladně složit. Pokud ani to nepomůže a máme již nanesené vzácné vzorky, je nutné po dobu průběhu elektroforézy kontrolovat hladinu elektrodového pufru a v případě nutnosti pufr doplňovat.
- Pokud jsou bandy na gelu příliš silné, je nutné při opakování elektroforézy korigovat množství aplikovaného vzorku do jamky.
- V případě velmi intenzivního zbarvení, lze zkrátit dobu barvení, případně opět provést

korekci v množství nanášeného vzorku do jamky.

2.9. Literatura

- Kolektiv: Laboratorní cvičení z biochemie, ed. Kodíček M., Valentová O., Nakladatelství Olomouc, 2000.
- Pingoud A., Urbanke C., Hogget J., Jeltsch A.: Biochemical Methods, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.
- Ferencík M. a kolektiv: Biochemické laboratorne metódy, Alfa – VTEL, Bratislava 1981.
- Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí, Chem. Listy 95, 212-222, 2001.