

Polimeryzacja żeli poliakrylamidowych

Akrylamid jest trucizną, należy unikać kontaktu ze skórą oraz wdychania pyłu akrylamidowego!

Ogólne właściwości poliakrylamidu

Żele poliakrylamidowe są jednymi z najbardziej popularnych matryc rozdzielających stosowanych w biologii molekularnej do rozdzielania kwasów nukleinowych oraz białek. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych polega na polimeryzacji monomerów akrylamidu w obecności wolnych rodników. Wolne rodniki są dostarczane przez nadsiarczan amonu i stabilizowane przez Temed (N',N',N',N'-tetramethyletylene-diamine). Łańcuchy poliakrylamidu są wiązane (cross-linkowane) przez methylenebisacrylamide (bis-akrylamid) i tworzą żel którego parametry fizyczne (wielkość porów) jest determinowana przez stężenie akrylamidów i ilość cross-linkerów. Zwykle stosuje się żele o stężeniu akrylamidów 3,5-20%, co pozwala na rozdzielanie elektroforetyczny kwasów nukleinowych w zakresie 5-1000 bp, oraz na uzyskanie rozdzielczości rozdzielania rzędu 1 zasady.

Parametrami charakteryzującymi mieszkankę akrylamidów są:

Stężenie akrylamidu oznaczane jako T – jest to oznaczona % (w/v) ilość akrylamidu i bisakrylamidu w objętości roztworu.

Stężenie cross-linker'ów oznaczane jako C - jest to % (w/w) wyrażony stosunek ilości cross-linkerów do ilości akrylamidu i cross-linkerów.

Np. oznaczenie 20% T, 5 % C oznacza że roztwór zawiera 20% (w/v) akrylamidów w stosunku akrylamidu do bisakrylamidu jak 19:1.

Polimeryzacja żeli poliakrylamidowych:

Polimeryzacja zachodzi przy udziale katalizatorów bez dostępu tlenu, który jest inhibitorem tej reakcji. Najczęściej stosowane to nadsiarczan amonu (ammonium persulfate-APS) oraz Temed. Możliwa jest także fotopolimeryzacja, czynnikiem katalizującym reakcję polimeryzacji jest wówczas UV.

Czas polimeryzacji:

Czas polimeryzacji zależy od temperatury polimeryzacji oraz stężenia katalizatorów. W temperaturze pokojowej akrylamid polimeryzuje zazwyczaj już po ok. 20-30 min. Pełna usieciowanie akrylamidów zachodzi jednak dopiero po ok. 12 godzinach. Jednym z kluczowych parametrów niezbędnych dla uzyskania wysokiej powtarzalności rozdzielania elektroforetycznych jest otrzymanie powtarzalnej wielkości porów w żelach o tym samym

składzie. Możliwe jest to dopiero po pełnej polimeryzacji akrylamidów, a więc dopiero po ok. 12 godz. od momentu dodania katalizatorów. Aby uzyskać serię identycznych żeli poliakrylamidowych polecamy przygotowywanie ich w zestawie MULTIPOL, które umożliwiają jednoczesną polimeryzację od kilku do kilkunastu żeli.

Powtarzalność przygotowania żeli poliakrylamidowych

Do przygotowywania żeli poliakrylamidowych polecamy zestawy **MULTIPOL**. Umożliwiają one przygotowanie serii (do 5) identycznych żeli. Żele w są przygotowywane co najmniej na dzień przed użyciem, co umożliwia pełną polimeryzację akrylamidów. Dodatkowo zestaw MULTIPOL umożliwia przechowywanie żeli w czasie do 1 miesiąca. Żele należy zabezpieczyć przed wyschnięciem (nanieść na górną krawędź żelu niewielką ilość buforu elektroforetycznego, i zabezpieczyć folią nieprzepuszczającą powietrze), oraz przechowywać w temperaturze 4°C.

Zalety zestawu MULTIPOL to krótki czas przygotowywania partii żeli – 15-20 minut, jednorodność przygotowanych żeli, oraz zwiększone bezpieczeństwo poprzez zmniejszenie możliwości kontaktu z akrylamidem. Przygotowywanie żeli w zestawie MULTIPOL redukuje możliwość wycieku akrylamidów podczas przygotowywania żeli. Zwiększa to także wygodę przygotowywania żeli.

Systemy buforowe:

W elektroforezie możliwe jest stosowanie ciągłych i nieciągłych systemów buforowych. W systemach ciągłych stosuje się pojedynczy żel separujący i używa się tej samej siły jonowej i pH w żelu i buforze elektroforetycznym. Systemy te stosuje się zwykle w elektroforezie kwasów nukleinowych. Najczęściej stosowane są bufony 1xTAE i 0,5-1xTBE.

W systemach nieciągłych stosuje się dwa żele: pierwszy zagęszczający - o niższym stężeniu akrylamidów i żel rozdzielający o wyższym stężeniu akrylamidów. Oba żele posiadają różne bufony, bufor w żelu zagęszczającym posiada niższą siłę jonową niż bufor w żelu rozdzielającym. Dodatkowo bufor elektrodowy jest różny od każdego z buforów w żelach. Systemy te pozwalają na uzyskanie dużo wyższej rozdzielczości rozdziału elektroforetycznego niż systemy ciągłe. Zwykle stosuje się je podczas elektroforezy białek w warunkach denaturujących (PAGE-SDS) oraz w warunkach natywnych.

Rozdziały białek i kwasów nukleinowych

Białka w warunkach natywnych są molekułami amfoterycznymi. W zależności od pH w którym się znajdują ich ładunek elektryczny netto jest ujemny (w pH powyżej punktu izoelektrycznego) lub dodatni (w pH poniżej pI). Ładunek netto białek jest dodatkowo niezależny od ich wielkości. Podczas elektroforezy w warunkach natywnych w danym pH rozdział białek zależy od ich wielkości i ładunku elektrycznego netto.

Kwasy nukleinowe posiadają ładunek elektryczny ujemny w całym zakresie pH stosowanym w elektroforezie. Dodatkowo posiadają stałą gęstość ładunku na jednostkę długości (poprzez grupy fosforanowe). Elektroforeza kwasów nukleinowych odbywa się zawsze ze względu na ich długość (wielkość).

Elektroforeza kwasów nukleinowych

Żele niedenaturujące i denaturujące

Żele niedenaturujące – migracja kwasów nukleinowych w tych żelach zachodzi w przybliżeniu z szybkością odwrotną do wartości Log_{10} z wielkości fragmentu. Dla jednoniciowych kwasów nukleinowych zmiany konformacyjne – ssDNA i RNA wynikające z różnicy sekwencji wpływają na szybkość migracji i wykorzystywane są w niektórych technikach (MSSCP, SSCP, TTGE).

Żele denaturujące:

Żele te polimeryzowane są w obecności substancji denaturujących (mocznik, rzadziej formamid), które uniemożliwiają na parowanie zasad w kwasach nukleinowych. Szybkość migracji w żelach denaturujących jest niezależna od sekwencji kwasów nukleinowych. Żele te wykorzystywane są w sekwencjonowaniu DNA/RNA oraz oznaczaniu polimorfizmów długości (STR).

Elektroforeza Białek

Elektroforeza natywna:

Pozwala na rozdział elektroforetyczny białek ze względu na ich gęstość ładunku. Bufory użyte podczas elektroforezy natywnej pozwalają na utrzymanie białek w stanie niezdenaturowanym enzymy po elektroforezie zachowują swoją aktywność. Elektroforeza natywna jest używana głównie do określenia czystości białek – np. oznaczenia czystości preparatyki enzymów.

W Elektroforezie natywnej białek używa się nieciąętego systemu buforowego. Stosowane są dwa żele – zagęszczający o niższym stężeniu akrylamidów i niższym pH, oraz rozdzielający o mniejszych porach (wyższe stężenie akrylamidów) i wyższe pH. Rozwiązanie to, stosowane także w żelach denaturujących, umożliwia uzyskanie zagęszczenia preparatu na styku żeli i migracji białek w żelu rozdzielającym w postaci ostrych prążków. Dodatkowym zabiegiem pozwalającym na poprawienie jakości rozdziałów – uzyskanie ostrych prążków jest naniesienie na górną krawędź żelu rozdzielającego wody nasączonej n-butanolem.

Na górną krawędź żelu rozdzielającego, przed wylaniem żelu zagęszczającego, należy ostrożnie pipetą (tak aby nie spowodować zmieszania niespolimeryzowanego akrylamidu) nakropić niewielką 0,1-0,5 ml ilość wody nasączonej n-butanolem. Odetnie to dostęp powietrza do górnej krawędzi żelu rozdzielającego, umożliwi jego pełną polimeryzację i zapewni ostry gradient pH. Ten prosty zabieg wpływa w znacznym stopniu na poprawienie rozdzielczości rozdziałów elektroforetycznych białek.

Polecamy przygotowywanie żeli w aparacie **MULTIPOL**. Umożliwi to uzyskanie serii identycznych żeli, oraz ułatwi proces ich przygotowywania. Po naniesieniu wody z n-butanolem na górne krawędzie żeli rozdzielających pozostawiamy je do polimeryzacji na noc po uprzednim zabezpieczeniu folią przed wyschnięciem. Żele zagęszczające przygotowujemy bezpośrednio przed rozdziałem, zlewając uprzednio wodę z n-butanolem i przepłukując dH_2O .

Elektroforeza denaturująca:

SDS-PAGE

SDS (sodium dodecyl sulphate) jest niejonowym detergentem, który denaturuje białka poprzez równomierne opłaszczanie szkieletu polipeptydowego. SDS łączy się z białkami specyficznym w stosunku masowym 4,1:1. Zapewnia to przejście przez białko ujemnego ładunku elektrycznego netto o stałej gęstości bez względu na jego długość. Dla całkowitego rozwinięcia polipeptydu, zapewnienia mu pierwszorzędowej struktury, niezbędne jest dodatkowo zniszczenie mostków dwusiarczkowych (2-merkaptetanol lub ditiotretiol).

Opłaszczanie białka przez SDS oraz redukcja mostków dwusiarczkowych pozwala na separację białek w żelu poliakrylamidowym ze względu na ich wielkość. Szybkość migracji w SDS-PAGE nie jest determinowana przez ładunek elektryczny białka zależny od pH i jego konformację ale przez masę białka.

Przygotowanie żeli do SDS-PAGE

Polecamy przygotowywanie żeli rozdzielających w aparatach do polimeryzacji żeli **MULTIPOL**. Umożliwi to pełną polimeryzację żelu rozdzielającego, oraz przygotowanie serii identycznych żeli.

Proces przygotowania jest podobny jak dla żeli natywnych. Przygotowujemy żel rozdzielający i dla uzyskania większego gradientu pH наносimy na górną krawędź wodę nasączoną n-butanolem. Pozostawiamy do polimeryzacji przez minimum 12 godz. Żel rozdzielający przygotowujemy przed rozdziałem zlewając wodę z n-butanolem i przepłukując krawędź żelu rozdzielającego wodą.