

Temat 1 Elektroforeza białek

Elektroforeza to zjawisko, w którym cząsteczki fazy rozproszonej obdarzone ładunkiem poruszają się w nieruchomej fazie rozpraszającej pod wpływem pola elektrycznego do anody lub katody. Wykorzystywane jest do rozdzielania makrocząsteczek zawierających ładunek, takich jak białko, DNA czy RNA.

Zastosowanie elektroforezy:

- biochemia białek i kwasów nukleinowych,
- biologia molekularna,
- farmakologia,
- medycyna sądowa,
- weterynaria,
- diagnostyka medyczna,
- kontrola jakości żywności

Czynniki wpływające na szybkość elektroforezy:

Siła jonowa. Najłatwiej zdefiniować ją można jako miarę oddziaływań pomiędzy jonami znajdującymi się w roztworze, która wpływać będzie zarówno na ich zachowanie jak i ich oddziaływanie z polem elektrycznym. Z tej definicji wynika, że należy utrzymać taki skład elektrolitu, który zapewni optymalne warunki przeprowadzania rozdziału. W przypadku wzrostu stężenia jonów, następuje bowiem ograniczenie ich ruchliwości podczas gdy spadek ich stężenia prowadzi do niedoboru nośników ładunku elektrycznego i związku z tym wzrostu oporności elektrycznej, co przyczynia się do zmniejszenia szybkości rozchodzenia się cząsteczek w polu elektrycznym.

pH. Miara stężenia jonów wodorowych w elektrolicie ma szczególnie istotne znaczenie w odniesieniu do białek i peptydów, których wypadkowy ładunek elektryczny będzie przyjmował wartość równą zero przy pewnym pH roztworu, a same białka będą traciły zdolność do poruszania się w polu elektrycznym (w swoim punkcie izoelektryczny). W związku z tym, by separacja białek była jak najbardziej skuteczna, konieczne jest utrzymywanie stałej wartości pH elektrolitu. Ze względu na zjawisko elektrolizy wody, przez które dochodzi do ciągłego generowania jonów H^+ na katodzie i OH^- na anodzie, układ musi podlegać buforowaniu. W przypadku kwasów nukleinowych, obdarzonych trwałym ładunkiem ujemnym, wynikającym z ich budowy (szkielet kwasu fosforanowego) elektroforeza jest znacznie prostsza, głównie ze względu na brak właściwości amfoterycznych. W przypadku białek, niezbędne jest nadanie im przed elektroforezą jednolitego ładunku ujemnego, by było możliwe posegregowanie ich pod względem masy cząsteczkowej.

Parametry elektryczne. Zjawisko elektroforezy zachodzi w obecności pola elektrycznego. Siła z jaką pole to oddziałuje na ładunek elektryczny jonu jest proporcjonalna do natężenia tego pola ($E [V/m]$), a wielkość ta jest proporcjonalna do napięcia $U [V]$ przyłożonego do elektrod. Istnieje duża zależność pomiędzy poszczególnymi parametrami oraz warunkami, w których zachodzi proces (jak temperatura czy wartość pH), dlatego w procesie elektroforezy stosuje się zasilacze umożliwiające utrzymanie stałej wartości dla jednego parametru, podczas gdy dla pozostałych określa się

górne limity wartości. I tak na przykład, elektroforezę białek przeprowadza się przy stałym natężeniu prądu, a kwasów nukleinowych przy stałym napięciu.

Temperatura. W celu uzyskania powtarzalnych i jak najbardziej dokładnych rezultatów elektroforetycznego rozdziału molekuł, konieczne jest utrzymywanie takiej temperatury, która będzie odpowiednia dla danego procesu. Pamiętać przy tym należy o tym, że sam proces dostarcza ciepła, które może doprowadzać do wzrostu tego parametru w trakcie trwania procesu. Wzrost temperatury ponad dopuszczaną granicę w przypadku białek może prowadzić do ich denaturacji, z kolei w przypadku kwasów nukleinowych, będzie powodowało topnienie żeli agarozowych, na których cały proces zachodzi. W obu przypadkach nie uzyskujemy spodziewanego rozdziału - zatem konieczne jest kontrolowanie temperatury roztworu, w którym prowadzona jest elektroforeza.

Inne czynniki:

- prędkość migracji cząsteczek jest wprost proporcjonalna do ruchliwości elektroforetycznej, jest więc wprost proporcjonalna do ładunku jonu,
- prędkość migracji cząsteczek jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości samej cząsteczki (większe cząsteczki poruszają się wolniej),
- w zależności od wielkości molekuł, poruszają się w żelach z różną szybkością; małe w porównaniu do wielkości porów -] łatwo, zbyt duże w porównaniu do wielkości porów - nie poruszają się. Cząsteczki o zbliżonym ładunku mogą być więc segregowane w zależności od swojej wielkości i masy.

Żele poliakrylamidowe

Przygotowywane są z roztworu monomerów akrylamidu i bis akrylamidu oraz substancji sieciujących. Akrylamid pozwala przygotować nośniki o bardzo gęstym usieciowieniu i niewielkich porach, umożliwia to rozdzielanie makrocząsteczek białkowych o masach rzędu 5 kDa - 300 kDa.

kDa (kilodalton) to jednostka masy używana do opisu wielkości cząsteczek biologicznych, takich jak białka. **1 kDa to 1000 Da, a 1 Da odpowiada mniej więcej masie jednego atomu wodoru.** Przykładowo, większość białek występujących w komórkach ma masę właśnie w tym zakresie (np. albumina, ok. 66 kDa). Zbliżoną masę umożliwiającą rozdzielanie elektroforetyczne, mają także niektóre peptydy (np. insulina, ok. 5 kDa).

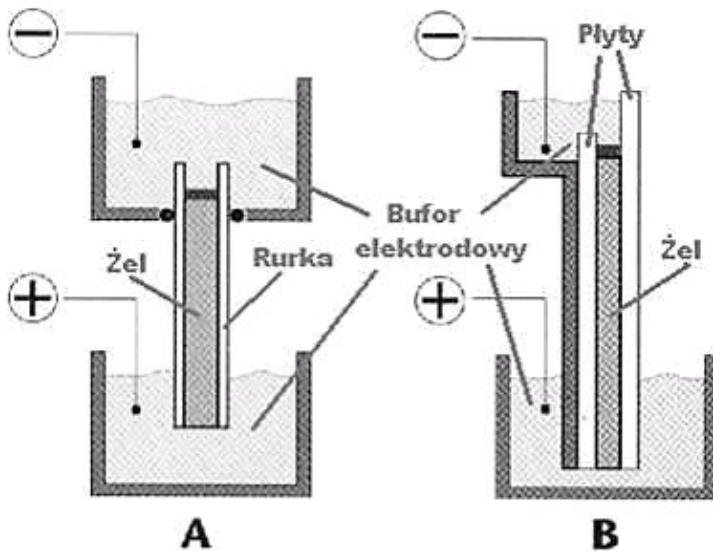
Akrylamid w postaci spolimeryzowanej jest chemicznie obojętny, zaś bis-akrylamid w postaci monomerycznej jest bardzo silną neurotoksyną.

Typy elektroforezy ze względu na rodzaj komory:

- elektroforeza pozioma,
- elektroforeza pionowa (rurkowa i płytkowa),
- elektroforeza kapilarna (swobodna oraz elektroforeza na nośniku).

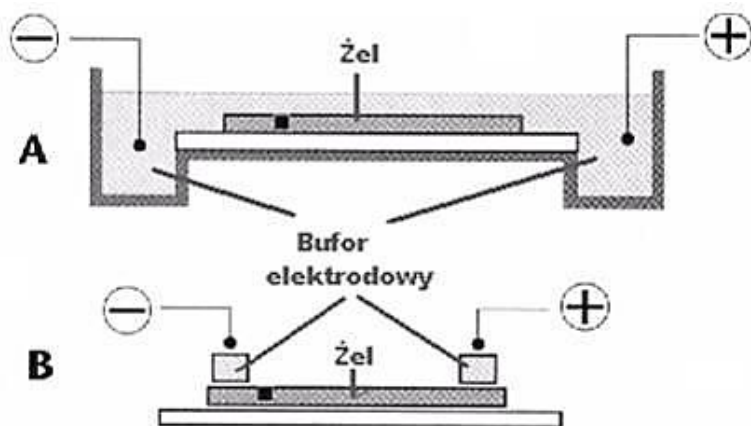
Pionowa. Najbardziej popularna metoda elektroforezy. Można wyróżnić dwa rodzaje takiej elektroforezy:

- elektroforeza rurkowa, kiedy to nośnik elektroforetyczny wypełnia szklane rurki,
- elektroforeza płytowa, kiedy nośnik znajduje się na dwóch płytkach, które oddzielone są od siebie przekładkami dystansowymi.



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie rodzajów elektroforezy pionowej. A. elektroforeza rurkowa, B. elektroforeza płytowa.

Pozioma. W tym typie elektroforezy nośnik umieszczony jest w płaszczyźnie poziomej. Żele nie są zamknięte pomiędzy płytkami i mogą nie być zanurzone w buforze. Zaletą tego rozwiązania jest brak wycieków elektrolitu oraz możliwość łatwego odprowadzenia ciepła generowanego w trakcie przepływu prądu. Elektroforeza półsucha, w której bufor elektrodowy zamknięte są w zestalonej agarozie lub w warstwach bibuły filtracyjnej, pozwala ponadto na znaczne ograniczenie zużycia chemikaliów niezbędnych do przygotowania buforów.

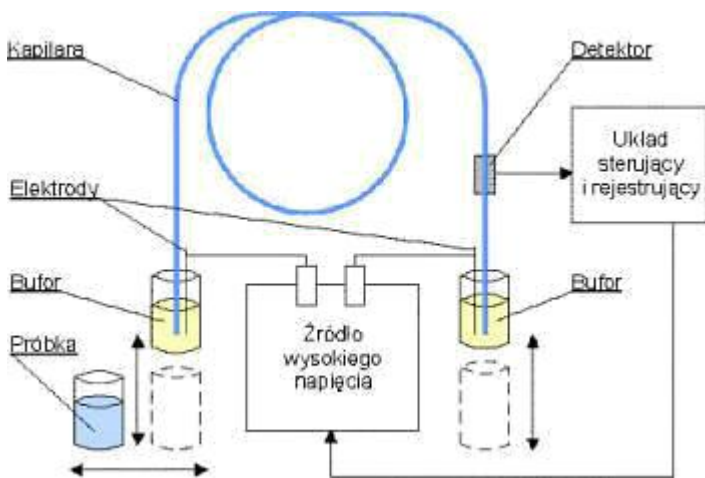


Rys. 2. Schematyczne przedstawienie elektroforezy poziomej. A. elektroforeza zanurzeniowa, B. elektroforeza półsucha.

Elektroforeza kapilarna. Kapilara o średnicy 50 - 100 μm i długości 20-30 cm wypełniona jest przez elektrolit. Oba końce dwóch kapilar zanurzone są w dwóch zasobnikach, które wypełnione są odpowiednimi elektrolitami. We wnętrzu kapilar mogą znajdować się dwa typy nośników i w zależności od nich wyróżnia się:

- elektroforezę swobodną, kiedy to kapilara wypełniona jest elektrolitem swobodnym,
- elektroforezę na nośniku, kiedy to kapilara wypełniona jest porowatym nośnikiem.

Do obu końców kapilar przykładane jest napięcie, przez co uzyskuje się we wnętrzu kapilary pole elektryczne. Przeznaczeniem elektroforezy kapilarnej są szybkie rozdziały analityczne i mikropreparatywne. Do detekcji cząsteczek używa się detektora, który umieszczony jest u ujścia kapilary.



Rys. 3. Schemat elektroforezy kapilarnej.

Elektroforeza natywna. Metoda, w której makrocząsteczki pozostają niezdenaturowane. Zaletą tego typu separacji elektroforetycznej jest możliwość odzyskania cząsteczek białkowych w stanie pełnej aktywności biologicznej. Wadą zaś jest stosunkowo słaba rozdzielczość metody.

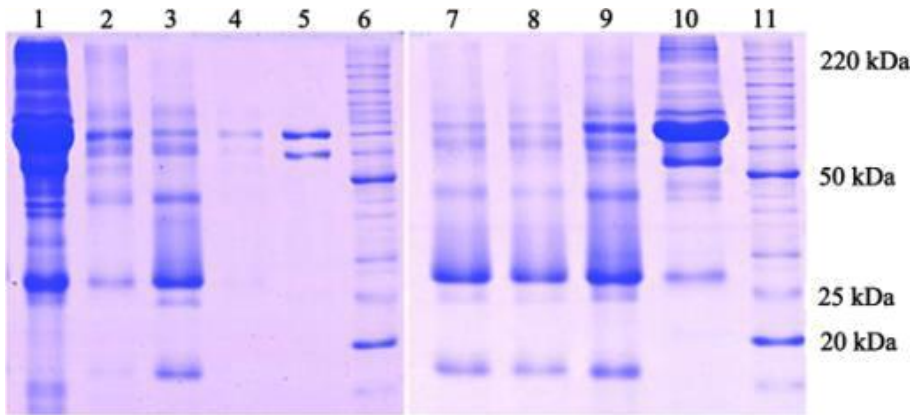
- prowadzona na żelu poliakrylamidowym
- rozdzielane cząsteczki nie zostają zdenaturowane
- rozdzielone cząsteczki zachowują swoje właściwości
- stosunkowo mała rozdzielczość

Elektroforeza w obecności SDS. Występuje najczęściej razem z elektroforezą żelową, z żelami poliakrylamidowymi. Poliamid tworzy zatem porowaty żel, a z kolei SDS wywołuje denaturację białek (niszczy wiązania niekowalencyjne).

Elektroforezę tę można przeprowadzać w obecności 2-merkaptoetanolu lub ditiotreitolu (DTT). Pod ich wpływem następuje zerwanie mostków disiarczkowych, co pozwala na rozpad białek oligometrycznych na składowe polipeptydy. Stosunek ładunku do masy w każdym z polipeptydów połączonych z SDS jest w przybliżeniu jednakowy, w taki sposób szybkość poruszania się jest zależna od tego, jaki opór spotyka dana frakcja polipeptydu podczas swojej wędrówki. Skoro większe kompleksy spotykają większy opór, więc można rozdzielić na podstawie różnic w ich masie

cząsteczkowej. Poszczególne polipeptydy zatrzymane na żelu poliakryloamidowym można uwidocznić za pomocą barwników, np.: błękit Coomassie.

SDS (siarczan dodecylu sodu) - jest to anionowy detergent denaturujący wykorzystywany do separacji białek. Rozdział białek w tej metodzie zachodzi przede wszystkim na podstawie różnic masy cząsteczkowej, ponieważ SDS nadaje wszystkim białkom silnie ujemny ładunek.



Rys. 4. Elektroforeza jednokierunkowa - barwienie CBB

Elektroforeza 2D. Jest to połączenie dwóch, a czasami wszystkich trzech podstawowych rodzajów elektroforezy. Procedura rozpoczyna się od separacji białek techniką ogniskowania izoelektrycznego. Ten rodzaj separacji wykonuje się przy pomocy elektroforezy rurkowej lub na paskach nośnika w elektroforezie poziomej i zwany jest pierwszym kierunkiem (wymiar) elektroforezy 1D. Po wykonaniu tego etapu procedury nośnik zawierający rozdzielone białka przenoszony jest na żel. Drugim kierunkiem (wymiar) jest elektroforeza płytowa, która segreguje białka według mas cząsteczkowych. Po zakończeniu procedury 2D i wybarwieniu żelu uzyskuje się dwuwymiarową mapę rozkładu białek, gdzie współrzędnymi są wartości pI (punkt izoelektryczny) oraz masy cząsteczkowe poszczególnych cząsteczek zawartych w odrębnych wybarwionych obszarach. W ten sposób można na jednym żelu rozdzielić kilka tysięcy białek znajdujących się w danym rodzaju komórek.

Metoda ta pozwala na stosunkowo łatwą analizę zmian ekspresji genu kodującego analizowane białko (białka) i jest wiodącą techniką zaadoptowaną na potrzeby programu proteomiki.

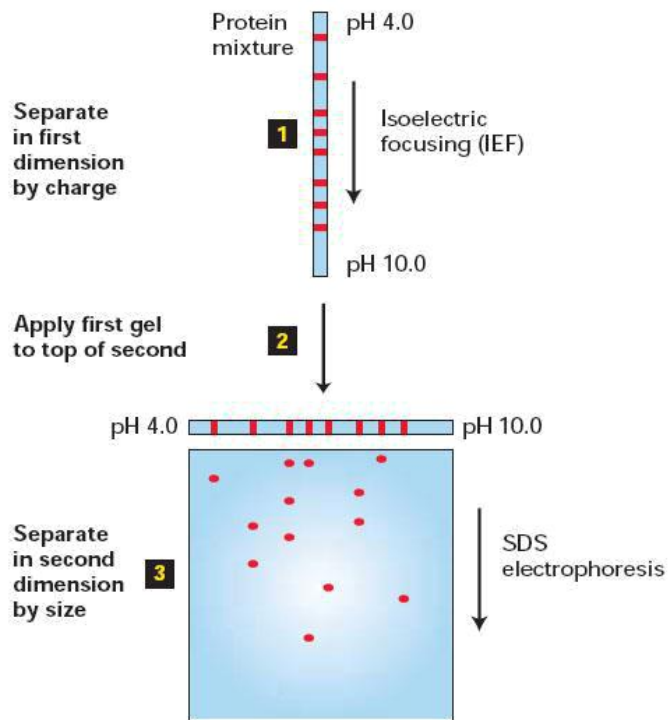
1. Pierwszy wymiar elektroforezy (1D - ogniskowanie izoelektryczne): elektroforeza pionowa/rurkowa.
2. Drugi wymiar elektroforezy (2D): elektroforeza płytowa.

Efekt: po wybarwieniu żelu uzyskuje się dwuwymiarową mapę rozkładu białek, gdzie współrzędnymi są wartości pI oraz masy cząsteczkowe poszczególnych cząsteczek zawartych w odrębnych wybarwionych obszarach

Ogniskowanie izoelektryczne:

- pH buforu zmienia się w sposób ciągły od wartości najwyższej przy katodzie do najniższej przy anodzie,
- cząsteczki wędrują w kierunku elektrod o ładunku przeciwnym do swojego,

- w elektrolicie zatrzymują się w punkcie z pH odpowiadającemu ich pI.



Rys. 5. Schemat elektroforezy dwukierunkowej

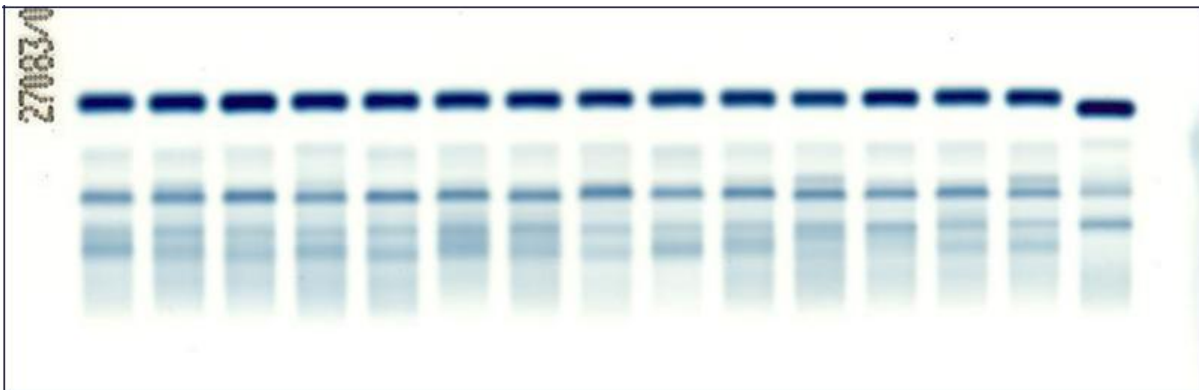


Rys. 8. Zestaw do elektroforezy.

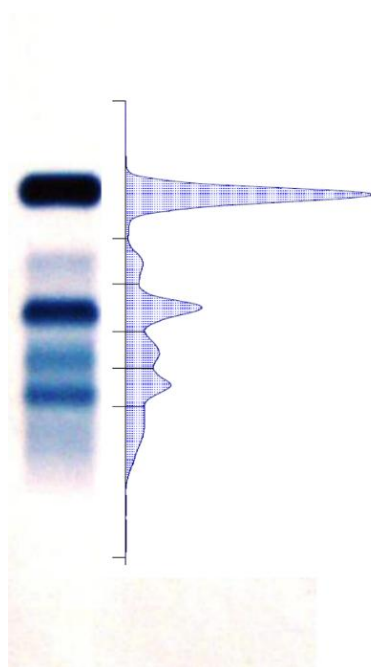
Wykorzystanie kliniczne:



Rys. 9. Aparat do elektroforezy na żelu agarozowym do szybkiej elektroforezy dla potrzeb klinicznych



Rys. 10. Elektroforeza na żelu agarozowym – 14 prób osocza psa oraz kontrola - osocze ludzkie (ostatnie po prawej)



Rysunek 11. Analiza densytometryczna rozdziału elektroforetycznego jednej próby wraz z wynikami udziału poszczególnych frakcji w %.

Frazioni	%
Albumina	51,1
Alfa 1	4,7
Alfa 2	16,1
Beta 1	9,0
Beta 2	10,5
Gamma	8,6