

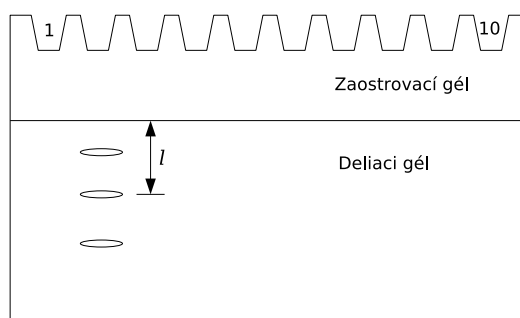
Úvod

Na delenie proteínov podľa molekulovej hmotnosti je jednou z vhodných metód elektroforéza v polyakrylamidovom géle za prídavku dodecylsulfátu sodného (SDS - sodium dodecylsulphate). Táto látka spôsobuje rozvinutie - denaturáciu - bielkovinového reťazca a svojim naviazaním mu udeľuje náboj priamo úmerný hmotnosti molekuly proteínu. Priložené elektrické pole potom spôsobí rozdelenie proteínov podľa molekulovej hmotnosti podľa vzorca

$$M = a \cdot e^{-b \cdot l}$$

kde a a b sú nejaké kladné konštanty, l je dráha škvry (obr. 1). Pri každom experimente pridáva aj lysozym ako štandard, ktorého reťazce majú známe molekulové hmotnosti - 14500, 29000, 43500, 58000.

Samotný gél sa pripravuje tesne pred experimentom, pričom na strane štartu sa použije vrstva veľkopórového (zaostrovacieho) gélu, v ktorom sa zaostří východzia škvryna so zmesou bielkovín. Malopórový (deliaci) gél potom už slúži na samotné rozdelenie bielkovín. Ako katalyzátor polymerizácie sa používa peroxodisíran amónny.



Obr. 1: Štruktúra gélu

Aparatúra

Zariadenie na elektroforézu so zdrojom + sklička, 50 ml kadička, pipeta 10 ml, nastaviteľné automatické pipety 1000 a 100 μ l, automatická pipeta 5 μ l, špičky, Hamiltonova striekačka; akrylamid, 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8, 0,5 M Tris-HCl pufr pH 6,8, 10% roztok dodecylsulfátu sodného (SDS), tetrametyléndiamín (TEMED), 10% roztok peroxodisíranu amónneho, elektródový pufr, vzorky s bielkovinami a štandardom (lysozym) zafarbené brómfenolovou modrou.

Postup

V kadičke som pripravil nasledovnú zmes na deliaci polymér:

1,35 ml	destilovanej vody
3,0 ml	akrylamidu
1,5 ml	Tris-HCl pH 8,8
0,06 ml	10% SDS
0,005 ml	TEMED
0,06 ml	10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

Nalial som ju medzi sklička do výšky 7 cm a prevrstvil 0,5 ml vody a nechal tuhnúť 20 minút. Potom som pripravil zmes na zaostrovací polymér:

1,22 ml	destilovanej vody
0,26 ml	akrylamidu
0,5 ml	Tris-HCl pH 6,8
0,02 ml	10% SDS
0,005 ml	TEMED
0,02 ml	10% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$

Odsal som vodu z malopórového gélu filtračným papierom a pridal pripravenú zmes. Následne som zasunul matricu na vytvorenie jamiek.

Vzorky s bielkovinami som rozmrazil počas 3 minút vo vriacej vode. Po 20 minútach tuhnutia gélu som umiestnil sklíčka s gelom do zariadenia na elektroforézu a nalial do neho pufor. Pomocou Hamiltonovej striekačky som do jamiek v géle pridal po 10 μl vzoriek v nasledovnom poradí: štandard, B, B, O, O, L, L

Na zariadenie na elektroforézu som umiestnil kryt a nastavil napätie 60 V. Keď škvŕny dosiahli rozhranie gélov (asi po hodine), zvýšil som napätie na 150 V.

Výsledky

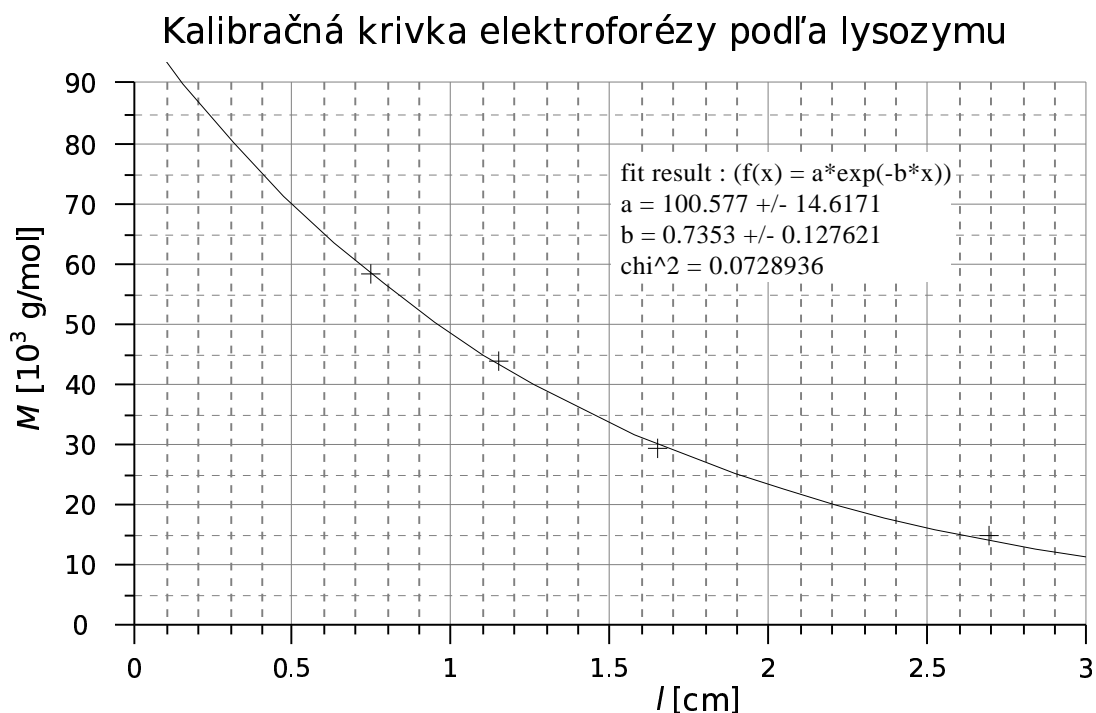
Namerané vzdialenosti škvŕn štandardu od rozhrania gélov so známymi molekulovými hmotnosťami sú uvedené v tabuľke 1. Odpovedajúce vzdialenosti škvŕn vzoriek sú v tabuľke 2.

l [cm]	M [g/mol]
0,75	58000
1,15	43500
1,65	29000
2,70	14500

Tabuľka 1: Lysozym

vzorka	B	B	O	O	L	L
l_1 [cm]	0,6	0,7	0,3	0,4	1,3	1,4
l_2 [cm]			0,9	0,9	2,6	2,7

Tabuľka 2: Vzorky



Molekulové hmotnosti určím podľa kalibračného vzorca

$$M = 1,006 \cdot 10^5 \cdot e^{-0,735 \cdot l}$$

- Vzorka B

$$l = 0,65 \text{ cm} \quad \rightarrow \quad M \approx 62000 \text{ g/mol}$$

- Vzorka O

$$l_1 = 0,35 \text{ cm} \quad \rightarrow \quad M_1 \approx 78000 \text{ g/mol}$$

$$l_2 = 0,9 \text{ cm} \quad \rightarrow \quad M_2 \approx 52000 \text{ g/mol}$$

- Vzorka L

$$l_1 = 1,35 \text{ cm} \quad \rightarrow \quad M_1 \approx 37000 \text{ g/mol}$$

$$l_2 = 2,65 \text{ cm} \quad \rightarrow \quad M_2 \approx 14300 \text{ g/mol}$$

Záver

SDS elektroforéza je pomerne nenáročná metóda na orientačné určenie molekulovej hmotnosti neznámeho proteínu. Pre presnejšie určenie by bolo vhodné umiestniť štandard aj pomedzi vzorky prípadne použiť dlhší gél.