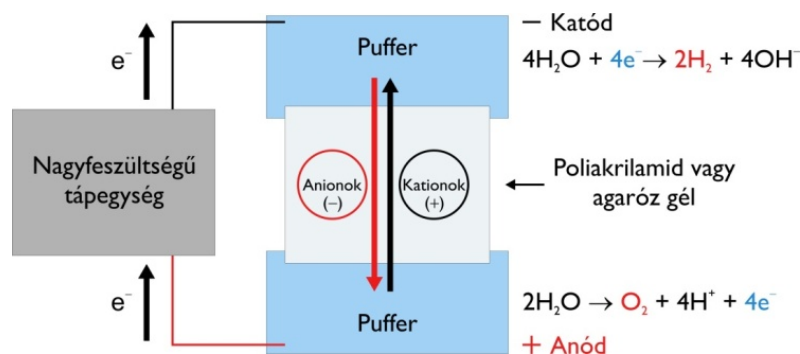


Fehérjék kimutatása litium-dodecil-szulfát poliakrilamid-gélelektroforézissel (LDS-PAGE)

Elektroforézis vizsgálatok során anyagkeveréket folyadékba vagy gél egyik oldalára helyezünk, az edény két végére elektródot téve feszültséget kapcsolunk a rendszerre, az elektromos térerősség hatására a keverékben levő töltéssel rendelkező részecskék (fehérjék, nukleinsavak) a töltésük nagyságának és a részecskék méretének függvényében különböző sebességgel vándorolnak a pólusok felé, így egymástól szétválnak. Megkülönböztetünk szabadfolyású elektroforézist, gélelektroforézist, kapilláris-elektroforézist, izoelektromos fókuszálást.

Ezen a gyakorlaton gélelektroforézist végzünk. A gél mindkét vége pufferbe ér, ahová egy-egy fémelektrod merül. Tápegység biztosítja a feszültségkülönbséget. A gélben a minták ionjai és a puffer ionjai vezetik az áramot, a drótokban az anódtól áramlanak az elektronok a műszer felé, a műszertől a katódhoz, így záródik az áramkör. Az elektroforézis inkomplett elektrolízis, vagyis nem várjuk meg, amíg a minták részecskéi elérik az elektródokat, hanem az oldószer, a víz bomlása történik elektromos áram hatására. Az anódnál mindig oxidáció zajlik, a vízből oxigéngáz keletkezik, a -2 oxidációs számú elem oxidációs száma 0-ra nő. A katódnál mindig redukció történik, a víz +1 oxidációs számú H-je H₂ gázzá redukálódik elektron felvétellel.



A töltéssel rendelkező részecskékre az előre mozgó elektromos, pontosabban elektrosztatikus erő hat, melynek nagysága egyenesen arányos a részecske töltésével és az elektromos térerővel. Az elektromos térerő az egységnyi távolságban levő elektródok közötti feszültségkülönbséget jelenti.

$$F_e = q \times E$$

A hátráltató közegellenállási erő (F_k) a közegellenállási együtthatóval, más néven súrlódási faktorial (f), és a részecske egyenletes haladási sebességével (v) egyenesen arányos, miután stabilizálódtak az elektromos paraméterek.

$$F_k = f \times v$$

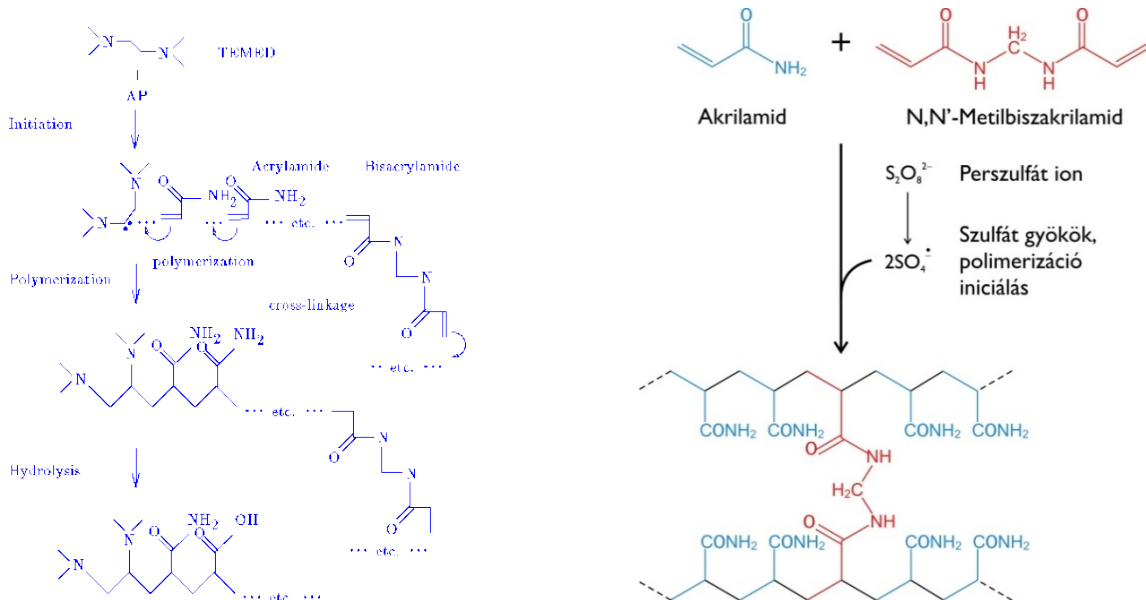
Az elektroforézis során a részecskék addig gyorsulnak fel, amíg a két erő egyenlővé válik, és innentől a részecskék egyenletes sebességgel haladnak:

$$F_e = F_k \quad \text{vagyis} \quad qE = fv$$

Átrendezve az egyenletet:

PAGE készítése

Akrilamid és N,N'-metilén-biszakrilamid vizes oldatának megfelelő arányú elegyét perszulfát iniciátor és TEMED katalizátor kis mennyiségének jelenlétében öntik két üveglap vagy plexilap közé, ha lapgél-t öntenek, ill. egy-egy üveghengerbe, ha diszk-gél-t (henger alakú gél-t) készítenek. A bomlékony peroxidiszulfátból keletkező szulfátgyök a TEMED molekulával reagálva TEMED-gyököt hoz létre, ami katalizálja a gyökös polimerizációt, térháló keletkezik, melynek pórusátmérője az összetevők arányától függ. Mivel az N,N'-metilén-biszakrilamid képezi a keresztkötéseket, mennyiségét növelve a pórusok nyilvánvalóan kisebbek lesznek. A gél rendszerint 4-20% akrilamidot tartalmaz, a keresztkötő biszakrilamid mennyisége mintegy 1-3%-a az akrilamid monomernek. A gélkészítéshez használt anyagok veszélyesek, a perszulfát táplálja az égést, a TEMED gyúlékony, az akrilamid egészségre veszélyes, vélhetőleg rákkeltő. A készítés veszélyei miatt laboratóriumokban népszerűbb a vásárolt gél.



Létezik homogén gél, melyben a pórusok átmérője mindenhol közel azonos, van gradiens gél, ahol a pórusátmérő folyamatosan változik, de általánosabban használt fehérjék elválasztására a kétféle gélből készített, ún. discontinuus gél. A felső gyűjtőgél, más néven koncentrálogél (stacking gel) nagy pórusátmérőjű, pH-ja 6,8 és nem jelent jelentős akadályt a minta részecskéi számára. A nagyobbik a futtatógél (elválasztógél = szeparológél = runnig gel = separating gel), melynek pórusmérete kisebb, a gél szűrőhatása fogja megszabni a vándorlás sebességét, benne a pH 8,8-9 közötti. A mintákat a gél öntésekor fésű behelyezésével létrehozott zsebekbe visszük fel (a fésűt eltávolítjuk a gélből). A szintelen mintákhoz brómfenolkék festéket adunk, amely kis molekula és erősen negatív töltésű, így gyorsabban vándorol minden elválasztandó részecskénél, a kialakuló színes frontvonal mutatja a vándorlás sebességét.

A puffer

A pH beállítása általában TRIS-klorid pufferrel történik, trisz-hidroximetil-aminometán és annak sósavas sója az alkotórészek. A kloridion mindig negatív töltésű, hiszen a sósav erős sav, oldatban minden pH-n és töménységben teljesen disszociál, az ionok közül mindig a leggyorsabban vándorol. A másik változó töltésű anyag a pufferben rendszerint a glicin aminosav. A karboxil-csoport pK értéke 2,34, az aminocsoporté 9,6. Amikor $pH = pK_1$, a teljesen protonált +1 töltésű és az ikerionos forma van 50-50 %-ban jelen. Amikor a $pH = pK_2$, a nettó semleges ikerionos forma és a -1 töltésű teljesen deprotonált anion van azonos mennyiségben. Az izoeletromos pont a két pK érték számtani közepe, vagyis 5,87, ezen a pH-n az ikerionos semleges forma dominál. A gyűjtőgél kémhatása a glicin izoeletromos pontjához közel van, kevés a glicinát- anion, megnő az elektromos térerősségnek a mintafehérjékre jutó vonzó hatása, hisz a rendszerre kapcsolt feszültség állandó, a pufferben levő anionok számának csökkenése helyileg ellenállás növekedést jelent. Ez gyors vándorlásra készíti a mintafehérjéket, egyszerre, egy csíkban lépnek be az elválasztógélbe. Itt az alkalikus kémhatás miatt a glicin disszociációja felgyorsul, a sok glicinát, mely 1 negatív töltéssel bír, gyorsan vándorol az anód felé, míg a mintafehérjék lemaradnak, töltésük és méretük szerint különböző sebességgel tudnak átjutni a pórusokon.

3. kevés glicinát anion v. MOPS anion

2. mintafehérjék

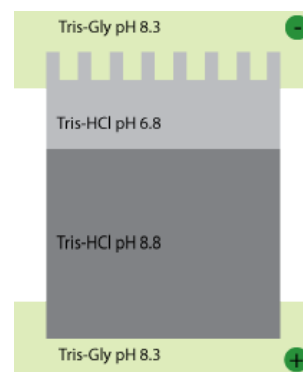
1. Cl^-

4. mintafehérjék

3. jelzőfesték (brómfenolkék)

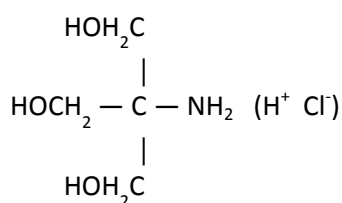
2. sok neg. glicinát vagy MOPS anion

1. Cl^-

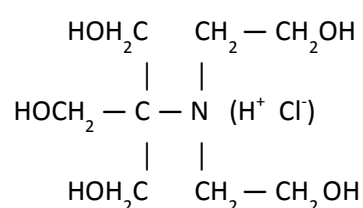


A mai kísérletben TRIS-t a futtatópufferben, helyette a gélben bis-tris puffert, a glicin helyett MOPS követő iont használnak a futtatópufferben, de az elv azonos a fentiekkel. A mindig negatív kloridion a vezető, leggyorsabban vándorló ion, a MOPS [3-(N-morpholino)propane-sulfonic acid] töltése a pH-tól függ, csak részben disszociál, pK-ja 7,2. A gélpuffer pH-ja 6,4 és a futtató pufferé 7,5 körüli, így az elektroforézis során a kétféle pH eredőjeként kb. semleges pH-n történik a fehérjék elválasztása. Ez enyhe körülményeket jelent, a módszer alkalmas érzékeny fehérjék elválasztására.

TRIS és kloridja



Bis-tris és ennek sósavas sója



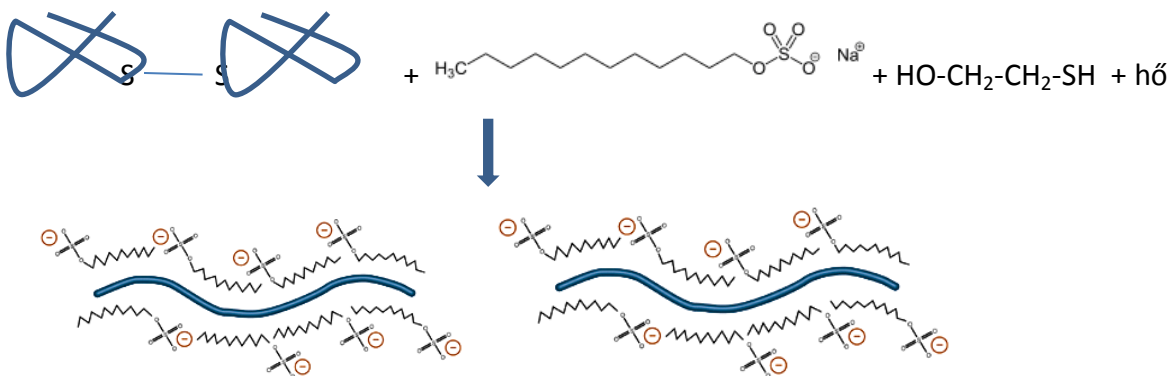
Natív PAGE

A fehérjék aminosav-oldalláncai között vannak protonálhatók-deprotonálhatók, melyek közül a Glu és Asp karboxilcsoportjai savas karakterűek, a His, Lys, Arg bázikusak, a Cys SH-csoportja és Tyr fenolcsoportja gyenge savak. A fehérjék össztöltése a közeg pH-jának függvénye. Enyhén alkalikus közegben a legtöbb fehérje nettó negatív, ezért a katód felé vándorol. Amikor enyhe körülmények között történik az elektroforézis, a nem túlságosan érzékeny fehérjék megtartják természetes térszerkezetüket. A dimerek, multimerek nem válnak szét, tehát a negyedleges térszerkezet is megmarad a nem denaturáló közegben, alacsony hőmérsékleten és megfelelő pufferben. Elválasztás után a gélben helyben (in situ) kimutathatók a fehérjék, enzim esetén katalizálhat egy színes terméket adó reakciót. Az egyik biokémia gyakorlat a II. félévben az LDH izoenzimek elválasztása, ahol a laktát oxidációja során keletkező NADH az elektronját fenazin-metaszulfát közvetítő segítségével tetrazólium-kék festéknek adja, a megjelenő kék csík jelzi a laktát-dehidrogenáz tetramer enzim elhelyezkedését a gélben.

Fehérjék tisztítása során PAGE módszerrel ellenőrizni lehet, hogy csak egy komponens van-e jelen, (bár a fehérjék aggregációja megtévesztő lehet), vagy több csík jelzi a szennyeződéseket, vagy esetleg az aegységek szétesését a nem megfelelő körülmények között. Jellemzően ezen elválasztás során az enzim együtt marad az inhibitorával, a receptor a ligandjával stb.

SDS-PAGE, LDS-PAGE

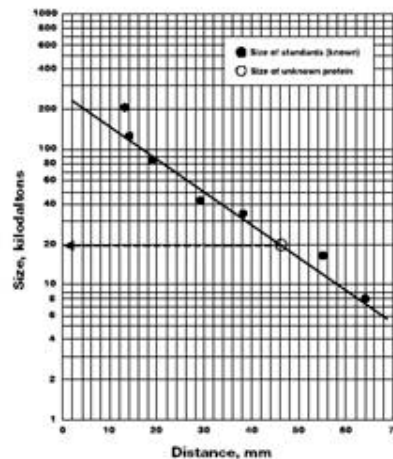
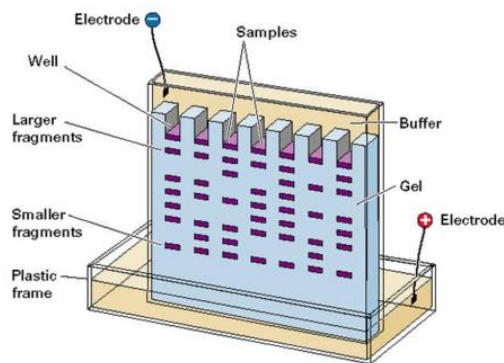
A másik fajta gélelektroforézis során SDS vagy LDS anionos detergens, merkaptóetanol SH-reagens és hő együttes alkalmazásával történik a fehérjék denaturációja. Az amfipatikus detergens molekulában térben elkülönülnek a hidofil és hidrofób részek.



A lauril-szulfát Na vagy Li sója a fehérje belsejében levő London-féle diszperziós kötéseket bontja, a másod-, harmad- és negyedleges szerkezet megbomlik, a detergens hosszú apoláros szénlánc kötődik a kitekeredett fehérjelánchoz, körülbelül egy SDS vagy LDS két aminosavhoz. Így a fehérje saját töltése elhanyagolhatóvá válik, egységesen erősen negatív töltésű komplex keletkezik, és oldatban is marad a denaturált fehérje a töltéstaszítás és

hidrátburok képződése miatt. A detergens a fehérjét a membránokból is képes kioldani. Minél hosszabb a fehérje, annál több detergens kötődik hozzá, annál több negatív töltése lesz, ami a pozitív elektródhoz vonzza, ugyanakkor a nagyobb méretű komplexre jobban hat a gél szűrő hatása. A visszatartó erő fogja meghatározni a vándorlás sebességét. A merkaptotanol a ciszteinek közötti diszulfidhidakat redukálja, az eredetileg háromdimenziós fehérjemolekula kiegyenesedik, a több alegységből álló fehérjék szétesnek. A magas hőmérséklet gyorsítja a denaturációt.

A mai kísérletben használt gél előnye, hogy mivel a pH futtatás során 7 körüli, a ciszteinek nem képeznek diszulfidhidakat (cisztein SH pK = 8-9), ezt csak a hagyományos gél enyhén alkalikus pH-ján tennék, és mert a gyorsan vándorló nátrium-biszulfit biztosítja a redukáló közeget a gélben, míg a merkaptotanol vándorlása lassabb a fehérjéknél. Semleges pH-n az akrilamid gél is stabilabb.



A mintákat a vertikális gél tetején levő gélzsebekbe visszük fel. A kisebb részecskék tudnak gyorsabban vándorolni a gél szűrő hatása miatt, a molekulák molekulatömegének logaritmus fordítottan arányos a megtett úttal, a futási távolsággal. Ismert molekulasúlyú anyagok keverékét egy gélen futtatva a mintákkal, az ismeretlen molekulatömegű fehérje (alegységeinek) molekulatömege leolvasható, meghatározható a standard „létrához” való hasonlítással. A módszer jól használható fehérjék tisztaságának vizsgálatakor is.

A minták láthatóvá tétele, festése

A fehérje és nukleinsav minták egyaránt színtelenek. Láthatóvá tételük különböző módszerekkel történhet. Aspecifikusan minden fehérjéhez kötődő festékeket gyakran alkalmaznak. Ilyenek a Coomassie Brilliant Blue (C. ragyogó kék), Acidic Fast Green (savanyú gyors zöld), Amido Black (amidofekete), ezüst-bromid. Ellenanyag köthető a fehérjéhez, mely egy másik ellenanyaggal reagálhat, amihez egy enzim van kötve (pl. torna-peroxidáz), annak szubsztrátját hozzáadva színes, fluoreszkáló, leggyakrabban luminescens termék alakul (különböző szubsztrátot használva). Ez utóbbi festésmód jellemzően a gélelektroforézis után

végzett blottolás eredményének kimutatására használatos, neve immunoblot. (A blottolás a gélről másik hordozóra, pl. nitrocellulóz membránra pufferben, elektromos térerő hatására történő anyagátvitelt jelenti. A módszer neve Southern-blot, ha DNS-t, Northern-blot, ha RNS-t, és Western-blot, ha fehérjét transzferálnak. A gélben kialakult mintázat megmarad a nitrocellulóz membránon.) Léteznek fluoreszcens festékek is. A nukleinsavak kimutatására használt etidium-bromid poliaromás vegyület, interkaláló festék (ezért mutagén, carcinogén, teratogen), UV-fénnyel megvilágítva a látható tartományban bocsájt ki fényt. Ha radioaktív elem van beépítve a fehérjébe vagy nukleinsavba (^{32}P), akkor fényérzékeny röntgenfilmen sötét csík keletkezik.

A kísérlet kivitelezése

Összeszereljük a készüléket az elektroforézishez, behelyezzük a gélt. Feltétlenül használjunk kesztyűt, mert a gél anyagai veszélyesek, a monomer akrilamid feltehetőleg rákkeltő, neurotoxikus és a fertilitást gátolja férfiakban. Az előre gyártott gélről le kell tépni a papírcsíkot, ezen keresztül fog érintkezni a pufferrel. Az alacsonyabb plexilap a belső tér felé nézzen, ide fogjuk felvinni a mintákat a fésű eltávolítása után.

A NuPAGE MOPS feliratú puffer összetétele: 50 mM MOPS [3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid], 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7 A futtatópuffert felhígítjuk 20-szorosra, vagyis 50 ml pufferhez 950 ml desztillált vizet öntünk mérőhengerben. A vizet óvatosan adagoljuk, hogy ne túlságosan habozzon. Az alsó futtatókádba kb. 600 ml, a felsőbe kb. 200 ml puffer elegendő. A gél tetején puffernek kell lennie, de a két puffer felül nem folyhat össze. Ez a gél (NuPAGE® Bis-Tris Gel) és puffer a kis és közepes, 14-200 kDa molekulásúlyú fehérjék elválasztásához megfelelő.

A minták előkészítése számozott Eppendorf-csövekbe a gyakorlatvezető által:

	1	2	3	4
marha szérumalbumin (BSA) μl	2			
szénsav-anhidráz (CA) μl		7		
citokróm c (cyt c) μl			10	
alkohol-dehidrogenáz (ADH) μl				4
LDS puffer, benne LiDS és festék μl	5	5	5	5
NuPAGE redukálószer (SH-reag.) μl	2	2	2	2
deszt. víz	11	6	3	9

Az Eppendorf-csöveket 10 percig 70 °C vízfürdőben inkubáljuk, a mintafehérjéket denaturáljuk.

A géلزsebekbe pipettázzuk a 20 µl-nyi mintákat, melyek kb. 20 µg fehérjét tartalmaznak, és 10 µl molekulásúly-standardot.

A készülék fedelét rátesszük, az elektródokat illesztjük. A futtatás 175 V állandó feszültségen és 30-40 mA áramerősséggel történik 1 órán át. Az áramerősség csökken a futás során.

A futtatási idő letelte után a készüléket kikapcsoljuk, a fedelet levesszük, az elektródokat eltávolítjuk, a gélt kivesszük, a gél műanyag burkát a két oldalánál a gélvágó késsel szétfeszítjük (egyszer használatos, eldobandó). A gélről a zsebeket levágjuk a késsel. Óvatosan fellazítva a gélt a hordozóanyagról átemeljük a festőtálcába.

A gél mosása, a nem polimerizálódott anyagmaradékok és a puffer anyagai egy részének eltávolítása 3-szori mosással történik a következőképpen (kesztyűt használva):

vízzel leöntjük a gélt, hogy eléggé ellepje a víz
mikrohullámú sütőben 1 percig 1000 W teljesítménnyel forraljuk, majd
1 percig libegtetjük lassan Mini Rocker készülékkel
leöntjük a vizet a mosogatóba, a gél maradjon a tálcában.

A fehérjék festése

SimplyBlueSafeStain oldat Coomassie Brilliant Blue G250 nevű festéket tartalmaz, 25 ml festékkel 25 másodpercig – nem tovább – 1000 W-on főzzük a mikrohullámú sütőben a gélt.

A festéket leöntjük.

Ezt desztillált vizes mosás követi 10 percig libegtetve, hogy a nem kötődött festéket kimossuk.

Molekulásúly leolvasása a standard létráról:

A mintafehérjék molekulásúlyai:

BSA: 66 kDa, szénsav-anhidráz: 29 kDa, citokróm c: 12,4 kDa, alkohol-dehidrogenáz: 150 kDa.

Figure 1—Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard.

