



2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

BIO 411. Ląstelės biologija

Laboratorinis darbas

Eritrocito membranos citoskeleto baltymai ir jų elektroforetinis skirstymas

Teorija

I. Eritrocito membranos citoskeleto baltymai

Subrendę žinduolių eritrocitai neturi branduolio ir kitų organelių, bei turi labai mažą fermentinį aktyvumą. Taip yra dėl specifinės jų funkcijos: eritrocitai, dėl didelio kiekio juose enčio deguonį prisijungiančio baltymo hemoglobino užtikrina efektyvią dujų apykaitą audiniuose. Eritrocitai yra iš abiejų pusių įdubusio disko pavidalo, tačiau yra gana elastingi ir gali lengvai deformuotis. Sudėtingas baltymų tinklas, kuris sąveikauja su eritrocito membrana, ir yra vadinamas citoskeletu, užtikrina ne tik ląstelės formos palaikymą bet ir jos elastingumą. Eritrocito membranos citoskeleto sandara yra gana gerai iširta (Pav. 1).

Ankstyvieji eritrocito membranos citoskeleto tyrimai buvo atlikti naudojant denatūruotų membranos baltymų elektroforezę. Kadangi tuo metu nebuvo žinoma kas tai per baltymai, jie buvo pavadinti gelio juostos numeriu ir kai kurie iš jų taip vadinami ir iki šiol.

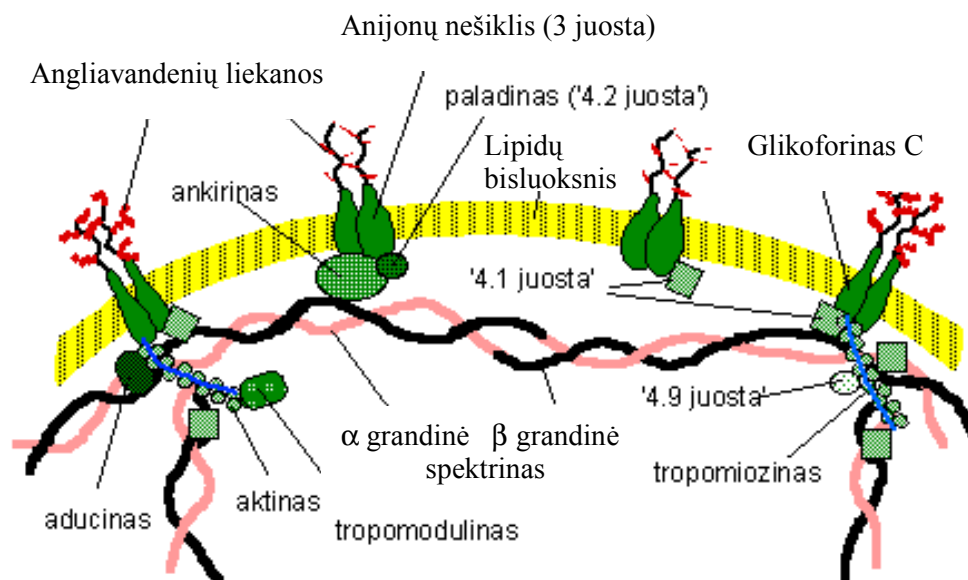
Jei lygintume molekulinės masės, fibrilinis baltymas spektrinas yra didžiausias citoskeleto komponentas. Dvi spektrino izoformos α (260 kDa) ir β (225 kDa) sudaro laisvai susisukusią spiralę. Dvi α - β spiralinės sudaro tetramerą, prie kurio gali jungtis kiti baltymai,

taip pat ir kitos spektrino molekulės. Spektrino tetramerai sudaro tinklą, kuris yra pritvirtintas prie membranos baltymu ankirinu (215 kDa).

Tuo tarpu pats ankirinas yra prisijungęs prie membraninio baltymo vadinamo '3 juosta' (band 3) arba anijonų nešiklio (anion exchanger protein, 90-100 kDa). Manoma, kad 4.2 juosta (paladinas, 72 kDa) stabilizuoja jungtį tarp ankirino ir anijonų nešiklio. Per baltymą vadinamą '4.1 juosta' spektrinas taip pat jungiasi prie transmembraninio baltymo glikoforino C (25 kDa). Tokiu būdu spektrino tinklas yra pritvirtinamas prie membranos keliose vietose.

'4.1 juosta' (78 kDa) bei baltymas aducinas (100 ir 105 kDa izoformos) stabilizuoja spektrino jungtį su aktinu (subvienetų masė 43 kDa). Aktino subvienetai ir tropomiozinas (27 ir 29 kDa izoformos) formuoja trumpus mikrofilamentus. Prie filamentinio aktino taip pat jungiasi baltymas tropomodulinas. 4.9 juostos baltymas, taip pat vadinamas dematinu (48 kDa) gali sujungti kai kuriuos aktino mikrofilamentus sudarydamas f (filamentinio) aktino pluoštus.

Membranos citoskeleto baltymų aktyvumas gali būti reguliuojamas keliais būdais: keičiant membranos fosfolipidų sudėtį (t.y. membranos takumą) arba fosforilinant/defosforilinant baltymus (pvz. ankirino, 4.1 ir 4.9 juostos baltymo fosforilinimas sumažina citoskeleto kietumą, nes sumažėja šių baltymų gebėjimas jungtis prie kitų citoskeleto komponentų).



Pav. 1 Eritrocito membranos citoskeleto sandara.

II. Elektroforetinis baltymų skirstymas

A. Skirstymas pagal krūvį

Makromolekulių skirstymas elektriniame lauke vadinama *elektroforeze*. Visos polipeptidinės grandinės turi mažiausiai dvi jonizuojamas grupes, t.y. galines amino ($-\text{NH}_2$) ir karboksilines grupes ($-\text{COOH}$). Be to, daugumos amino rūgščių R (radikalinės) grupės taip pat būna jonizuotos. Šie krūviai yra atsakingi už baltymų migravimą elektriniame lauke. Esant aukštam pH karboksilinės grupės būna įkrautos neigiamai ($-\text{COO}^-$), tuo tarpu amino grupės būna neutralios. Esant žemam pH karboksilinės grupės būna neutralios, o amino grupės būna įkrautos teigiamai ($-\text{NH}_3^+$). pH reikšmė, esant kuriai bendras baltymo krūvis yra neutralus (t.y. pusė grupių įkrautos neigiamai, o kita pusė teigiamai) ir baltymas nejuda elektriniame lauke, vadinama izoelektriniu tašku. Kai pH yra aukštesnis nei baltymo izoelektrinis taškas, bendras baltymo krūvis yra neigiamas ir jei toks baltymas yra užnešamas ant gelio prie neigiamo elektrodo, baltymas judės link teigiamo elektrodo. Baltymų judėjimo greitis elektriniame lauke priklauso nuo krūvio tankio (krūvio/masės santykio); kuo didesnis krūvio tankis, tuo greičiau baltymas judės. Pavyzdžiui, serumo albuminas, kurio izoelektrinis taškas yra 4.7, turės daug didesnę neigiamą krūvį nei γ -globulinas, kurio izoelektrinis taškas yra 7.2, jei abu baltymus ištirpinsime buferyje kurio pH 8.6. Todėl prie pH 8.6 albuminas migruos link teigiamo elektrodo daug greičiau nei γ -globulinas. Skirstant baltymus pagal krūvį dažniausiai naudojami agarozės geliai, kadangi esant mažai procentinei koncentracijai agarozės suformuoja kempinės pavidalo struktūras, kurių porų dydis yra pakankamai didelis, kad pro jas lengvai praeitų net labai didelės molekulinės masės baltymai.

B. Skirstymas pagal dydį

Vienas iš dažnai naudojamų baltymų skirstymo metodų yra elektroforezė netolydžiuose (angl. discontinuous) poliakrilamido geliuose kai baltymai yra denatūruoti natrio dodecil sulfatu. Norint elektroforetiškai išskirstyti baltymus pagal jų molekulinę masę, aukščiau aprašyta procedūra turi būti šiek tiek modifikuota. Pirmiausiai baltymai turi būti paveikti anijoniniu detergentu natrio dodecil sulfatu (angl. Sodium dodecyl sulfate (SDS)), kuris suteikia baltymui bendrą neigiamą krūvį. Natrio dodecil sulfatas (taip pat vadinamas lauril sulfatu) yra anijoninis detergentas, kurio molekulės tirpale turi neigiamą krūvį plačiam pH diapazone. Polipeptidinės grandinės prisijungia SDS kiekį proporcingą jų molekulinei

masei. Baltymai, kuriuose yra disulfidinių jungčių turi būti paveikiami redukuojančiom medžiagom, kad jungtys būtų suardytos ir baltymas išsivyniotų ir atsiskirtų atskiros polipetidinės grandinės. Baltymai paveikti SDS ir redukuojančiom medžiagom paranda natyvią formą ir krūvį, t.y. denatūruja. Poliakrilamido geliuose dėl mažo porų dydžio didelės molekulės juda lėčiau nei mažos. Kadangi skirtingų SDS denatūruotų baltymų krūvio/masės santykis yra beveik vienodas, todėl galutinis baltymų išskirstymas priklauso išimtinai nuo jų santykinės masės. Vienodo tankio geliuose baltymo santykinis migravimo nuotolis R_f yra atvirkščiai proporcingas baltymo masės dešimtainiam logaritmui. Jeigu tame pačiame gelyje, kuriame skirstomas nežinomų polipetidų mišinys, paleisime baltymus kurių molekulinė yra žinoma ir vėliau atidėsime žinomų baltymų R_f priklausomybę nuo jų molekulinės masės iš šios priklausomybės galėsime nustatyti ir nežinomų baltymų masę. SDS denatūruotų baltymų elektroforetinis skirstymas poliakrilamido geliuose gali būti naudojamas:

- a) nustatyti baltymų santykinę molekulinę masę,
- b) nustatyti pagrindinių tiriamo pavyzdžio baltymų santykinį kiekį (abundance),
- c) nustatyti baltymų lokalizaciją ląstelėje (citoplazminis, membraninis, branduolio),
- d) baltymų mėginių grynumo nustatymui bei frakcionavimo ar gryninimo procedūros pažangos sekimui,
- e) kombinacijoje su įvairiais dažymo metodais retų baltymų aptikimui bei kai kurių jų biocheminių savybių nustatymui,
- f) kombinacijose su tokiais metodais kaip baltymų perkėlimas ant nitroceliuliozinių arba polivinilideno fluorida (PVDF) membranų bei atpažinimas naudojant specifinius antikūnius (angl. immunoblotting arba western blotting), dvimatė elektroforezė, baltymų kartografavimas gali būti naudojamas ypač retų genų produktų ir skirtumų tarp jų detekcijai, bei izofermentų detekcijai ir atskyrimui.

Praktinė dalis I. Kraujo ir eritrocitų frakcionavimas

[ranga ir priemonės:

Centrifūga, rotoriai, centrifūginiai mėgintuvėliai, spektrofotometrinės kiuvetės, spektrofotometras.

Reagentai

3 ml kraujo (su antikoagulantu)

Praplovimo terpė:

0.9% NaCl

5 mM Na₂HPO₄

pH 8

Lizavimo lerpė:

5 mM Na₂HPO₄

pH 8

Biureto reagentas

10 mg/ml jaučio serumo albumino tirpalas

Darbo eiga:

1. Į centrifuginį mėgintuvėlį įpilkite 3 ml kraujo ir 12 ml praplovimo terpės. Centrifuguokite prie 1700 aps/min (600 × g), 10 min, 4 °C.
2. Supernatantą (tai yra atskieta kraujo plazma) nupilkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu tolesniam baltymo koncentracijos nustatymui. And nuosėdų (eritrocitų) užpilkite 15 ml praplovimo terpės ir švelniai suspenduokite. Centrifuguokite prie 1700 aps/min (600 × g), 10 min, 4 °C. Šis žingsnis reikalingas eritrocitų praplovimui.
3. Pakartokite antrą žingsnį.
4. Supernatantą nupilkite. And nuosėdų (eritrocitų) užpilkite 10 ml hipotoninės lizavimo terpės (5 mM Na₂HPO₄, pH 8). Hipotoniniame tirpale eritrocitų membranos pasižeidžia ir ląstelės turinys pasklinda terpėje. Susidaro vadinami eritrocitų ‘vaiduokliai’ – tušti membranų maišeliai. Kad eritrocitai buvo lizuoti galima spręsti iš to, kad tirplas iš drumsto ir nepermatomo pakito į skaidrų, nors ir tamsiai raudonos spalvos. 1 ml lizato perkelkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu tolesniam baltymo koncentracijos nustatymui, o likusią lizato dalį centrifuguokite prie 7100 aps/min (12000 × g), 10 min, 4 °C.
5. Supernatantą (eritrocito citoplazmos frakcija) nupilkite į švarų mėgintuvėlį ir padėkite ant ledu tolesniam baltymo koncentracijos nustatymui. Nuosėdas (eritrocito membranų

frakcija ir nesuardyti eritrocitai) resuspenduokite 10 ml hipotoninės lizavimo terpės (5 mM Na₂HPO₄, pH 8) ir centrifuguokite prie 7100 aps/min (12000 × g), 10 min, 4 °C.

6. Supernatantą nupilkite. Nuosėdas (eritrocito membranas) resuspenduokite 10 ml hipotoninės lizavimo terpės (5 mM Na₂HPO₄, pH 8) ir centrifuguokite prie 7100 aps/min (12000 × g), 10 min, 4 °C. Praplovimo žingsnius kartokite kol išnyksta raudona hemoglobino spalva ir lieka gryna membranų frakcija, kuri yra balkšvos spalvos.

7. Po paskutinio centrifugavimo supernatantą išpilkite, o nuosėdas (membranų frakciją) perkeltkite į švarų ependorfinį mėgintuvėlį. Nenaudokite stiklinių pipečių ar mėgintuvėlių, nes membranos limpa prie stiklo.

8. Toliau naudodamiesi Biureto reakcija kiekvienoje frakcijoje nustatykite baltymo koncentraciją. Pirmiausiai pasiruoškite po 1.5 ml 10 kartų skiestos:

- a) kraujo plazmos,
- b) eritrocitų lizato,
- c) citoplazmos frakcijos,
- d) membranų frakcijos.

9. Toliau pagal žemiau pateiktą lentelę paruoškite 9 spektrofotometrines kiuvetes:

Kiuvetės Nr.	Standartinis albumino tirpalas, μl	Kiti priedai, μl	Biureto reagentas, ml	Absorbpcija prie 550 nm
1	-	-	1	
2	25	-	0.975	
3	50	-	0.950	
4	75	-	0.925	
5	100	-	0.900	
6	-	Kraujo plazma, 50	0.950	
7	-	eritrocitų lizatas, 50	0.950	
8	--	citoplazmos frakcija, 50	0.950	
9	-	membranų frakcija, 50	0.950	

10. Pamatuokite absorbpciją prie 550 nm. Nusibraizykite standartinę kreivę (1-5 kiuvetės, Y ašyje – absorbpcija, X ašyje – albumino koncentracija mg/ml) ir naudodamiesi ja apskaičiuokite batymo koncentraciją kiekvienoje frakcijoje. Tipiškos koncentracijų

reikšmės: kraujo plazmos 4-10 mg/ml, eritrocitų lizato 20-50 mg/ml, citoplazmos frakcija 20-50 mg/ml, membranų frakcija 1-8 mg/ml

Praktinė dalis II: SDS denatūruotų baltymų elektroforetinis skirstymas naudojant poliakrilamido gelius (SDS-PAGE)

Teorija I. Poliakrilamido gelių ruošimas denatūruotų baltymų elektroforezei

Paprastai denatūruotų baltymų elektroforezė yra atliekama poliakrilamido gelyje sudarytame iš dviejų sluoksnių. Apatinis gelio sluoksnis (skiriamasis) yra atsakingas už baltymų išskirstymą pagal jų dydį. Viršutinis gelio sluoksnis (koncentruojantis) reikalingas tam, kad baltymo molekulės susipaustų į mikrometro storio juosteles prieš pasiekdamos skiriamąjį gelį.

Baltymų išskirstymas poliakrilamido gelyje priklauso nuo akrilamido koncentracijos. Pvz. gelis kuriame yra 7 % akrilamido tinka baltymų, kurių molekulinės masė yra tarp 45 ir 200 kDa išskirstymui. Tačiau tokiam gelyje mažesni nei 45 kDa baltymai beveik neatsiskirs. Tam, kad išskirstytume mažesnius nei 45 kDa baltymus reikia naudoti gelį su didesne akrilamido koncentracija (pvz. 14 %). Taigi, jeigu tiriamame pavyzdyje yra visas spektras molekulinė masių, geram baltymų atskyrimui pavyzdį reikėtų paleisti dviejų koncentracijų geliuose.

Praktinė dalis I. Poliakrilamido gelio ruošimas

[ranga ir priemonės:

[ranga vertikaliai elektroforezei

Reagentai

29.2 % akrilamido + 0.8 % N, N'-metilenebisakrilamido tirpalas

4 × koncentruotas skiriamąjo gelio buferis:

0.4 % natrio dodecilsulfato (SDS)

1.5 M Tris-HCl

pH 8.8

4 × koncentruotas koncentruojančiojo gelio buferis:

0.4 % natrio dodecilsulfato (SDS)

0.5 M Tris-HCl

pH 6.8

Elektroforezės buferis (~1.1 L):

25 mM Tris (bazės)

250 mM glicino

pH 8.3

0.1 % natrio dodecilsulfato (SDS)

Darbo eiga:

Skiriamąjį gelio ruošimas (ruošiant gelius vengti tiesioginių saulės spindulių)

1. Sumaišykite:

2.5 ml skiriamąjo gelio buferio

jei ruošiamas 7 % gelis – 2.333 ml 29.2 % akrilamido + 0.8 % N, N'-metilenebisakrilamido tirpalo

jei ruošiamas 15 % gelis – 5 ml 29.2 % akrilamido + 0.8 % N, N'-metilenebisakrilamido tirpalo

dapilkite H₂O, kad galutinis tūris būtų 10 ml

Jei yra galimybė, prieš pradėdant polimerizaciją iš tirpalo pašalinamas O₂.

2. Polimerizacijai inicijuoti pridėkite:

100 μl 10 % amonio persulfato (šviežiai paruošto)

10 μl N, N, N', N'-tetrametiletilediamino (TEMED)

3. Tirpalą gerai išmaišykite ir supilkite į paruoštą elektroforezės kamerą taip, kad iki viršaus liktų apie 2 cm. Patikrinkite ar gelyje neliko oro burbulų. Į pipetės antgalį pritraukite šiek tiek gelio, kad galėtumėte sekti polimerizaciją. Polimerizacija paprastai užtrunka 5-10 minučių.

4. Virš gelio užpilkite šiek tiek H_2O prisotinto butanolio arba izopropanolio, kad susidarytų ~0.5 cm sluoksnis. Butanolis ir izopropanolis idealiai išlygina gelio paviršių ir juostos gaunasi tiesios ir vienodos.

Koncentruojančiojo gelio ruošimas

1. Sumaišykite:

2.5 ml skiriamąjo gelio buferio

4 % geliui paruošti pridėkite 1.333 ml 29.2 % akrilamido + 0.8 % N, N'-metilenebisakrilamido tirpalo

dapilkite H_2O , kad galutinis tūris būtų 10 ml

2. Prieš pradėdami polimerizacijos procesą nuo skiriamąjo gelio nupilkite butanolį (ar izopropanolį), likučius nusauskite servetėle. Tada praplaukite destiliuotu H_2O ir nusauskite.
3. Polimerizacijai inicijuoti pridėkite (kadangi akrilamido koncentracija maža polimerizacijai pagreitinti galima pridėti šiek tiek daugiau vieno arba abiejų komponentų):

100 μ l 10 % amonio persulfato (šviežiai paruošto)

10 μ l N, N, N', N'-tetrametiletilediamino (TEMED)

4. Greitai sumaišykite mišinį, užpilkite virš skiriamąjo gelio ir atsargiai įdėkite šukas. Stenkites, kad dedant šukas nesusidarytų oro burbulai ir kad jos būtų įdėtos lygiai. Vėliau pašalinkite koncentruojančiojo gelio perteklių.

Teorija II. Tiriama pavyzdžio paruošimas elektroforezei

Baltymai yra sudaryti iš nešakotų amino rūgščių grandinių, kuriose kiekviena amino rūgštis yra sujungta su kita amino rūgštimi polipeptidine jungtimi. Amino rūgščių seka polipeptidinėje grandinėje vadinama pirmine baltymo struktūra. Vandenilinių jungčių susidarymas vandeniniuose tirpaluose iš dalies nulemia antrinę baltymo struktūrą (α -spiralės, β -lakštai, kilpos). Dėl vandenilinių jungčių, sąveikos tarp hidrofobinių amino rūgščių, van der Valso jėgų ir disulfidinių jungčių, baltymas turi trimatę struktūrą, vadinamą tretine struktūra. Ketvirtinė struktūra vadinama funkcionalių baltymų sudarytų iš keleto polipeptidinių grandinių (sujungtų kovalentinėmis ir/arba nekovalentinėmis jungtimis) ar

baltymų į kurių sudėtį įeina funkcinės grupės (pvz. hemo grupė hemoglobine) erdvinė struktūra.

Baltymų juostų išsidėstymas ant gelio labai priklauso nuo eksperimento sąlygų (temperatūros, buferio, pH, tiriamo pavyzdžio paruošimo kokybės). Šio darbo tikslas yra išskirstyti baltymus pagal jų molekulinę masę, ir todėl prieš elektroforetinį skirstymą baltymai turi būti denatūruojami (suardyta antrinė, tretinė ir ketvirtinė baltymo struktūra).

Denatūravimo terpės komponentų poveikio paaiškinimai:

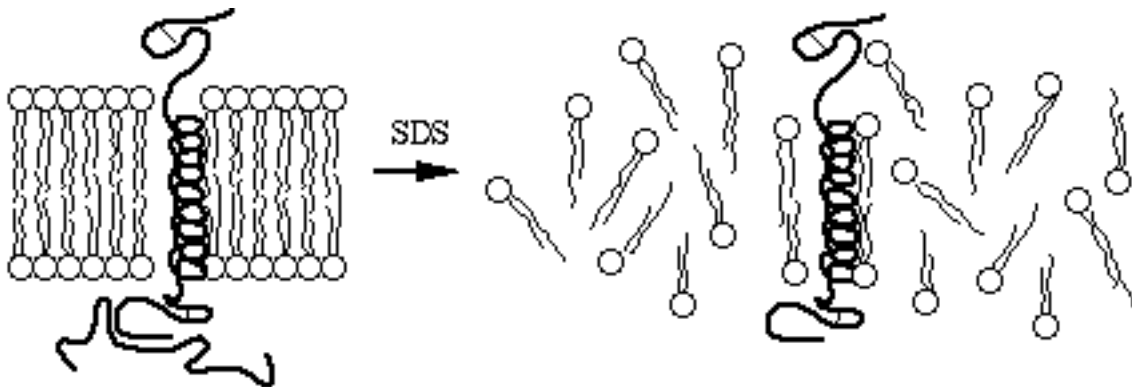
EDTA cheluoja (prisijungia) divalenčius katijonus, ir tokiu būdu sumažina proteazių, kurių kofaktoriai yra magnis ir kalcis, aktyvumą.

Tris yra buferis reikalingas tam tikro fiksuoto pH palaikymui.

Glicerolis reikalingas tam, kad tiriamas pavyzdys būtų sunkesnis nei buferis ir liktų gelio šulinėlio dugne, o ne iškiltų į paviršių.

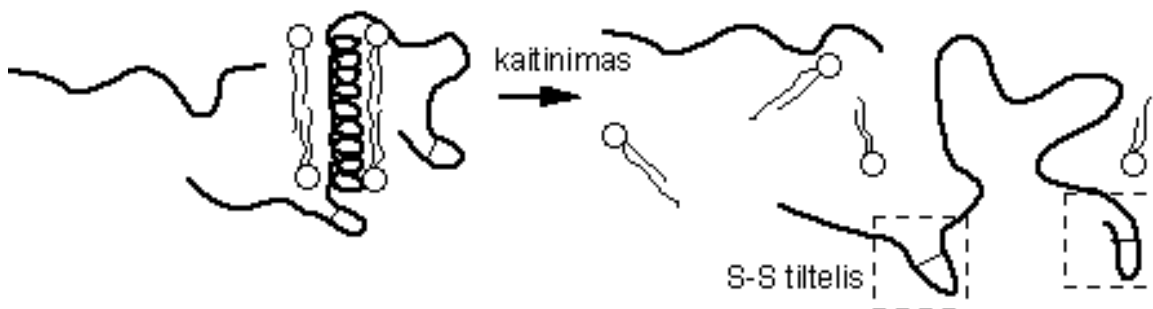
Bromfenolio mėlis yra dažas, kurio pagalba mes galime stebėti elektroforezės progresą.

SDS, *DTT* ir *kaitinimas* denatūruoja tiriamame pavyzdyje esančius baltymus. *SDS* suardo tretinę ir antrinę nes neigiamai įkrauna baltymo amino rūgštis. Kadangi vienodi krūviai stumia, baltymas yra ištiesinamas, taigi tampa funkciškai neaktyvus. Dalinai ketvirtinė

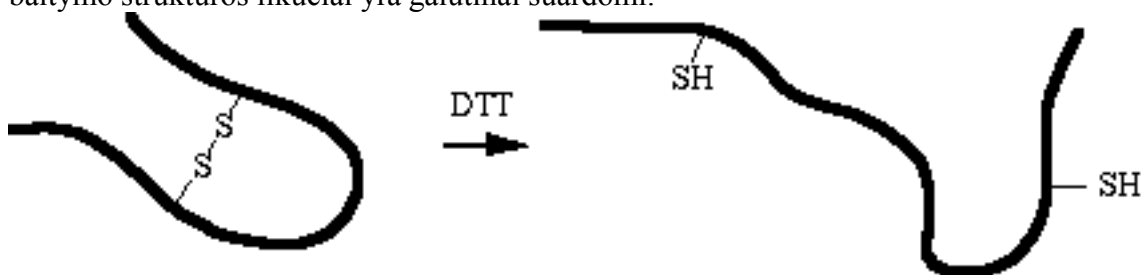


struktūra gali išlikti dėl disulfidinių tiltelių ir kitų kovalentinių ir nekovalentinių jungčių su kito tipo molekulėmis (pvz. angliavandeniais, lipidais) kurioms *SDS* poveikio neturi.

Daugelis baltymų dėl hidrofobinių savybių gali būti gana stipriai prisijungę prie kitų molekulių, pvz. lipidų. Pakaitinus tiriamą pavyzdį bent jau iki 60 °C molekulės pradeda judėti greičiau, todėl *SDS* lengviau pasiekia hidrofobines baltymo sritis ir įvyksta galutinė baltymo denatūracija.



Amino rūgštis cisteinas turi sulfhidrilinę (-SH) grupę, kuri įprastoje ląstelės aplinkoje spontaniškai formuoja disulfidinę jungtį (S-S) su kita sulfhidriline grupe. Kadangi tai kovalentinė jungtis, SDS jos nesuardo. Ditiotreitolis (DTT) yra stiprus reduktorius, todėl pridėjus jo į tiriamą pavyzdį disulfidinės jungtys yra reduluojamos ir tretinės ir ketvirtinės baltymo struktūros likučiai yra galutinai suardomi.



Daugelis denatūravimo terpių nepašalina kovalentiškai prie baltymo prijungtų angliavandenių ar fosforo grupių.

Praktinė dalis II. Tiriamo pavyzdžio paruošimas elektroforezei

Įranga ir priemonės:

Mėgintuvėliai, pipetės, termostatas.

Reagentai

Iš pirmos darbo dalies:

- a) kraujo plazmos frakcija,
- b) eritrocitų lizatas,
- c) citoplazmos frakcija,
- d) membranų frakcija.

2× koncentruota denatūravimo terpė:
 2 % natrio dodecilsulfato (SDS)
 20 % glicerolio
 20 mM Tris-HCl
 2 mM etilene diamine tetraacetinė rūgštis (EDTA)
 160 mM ditionitritolio (DTT)
 0.1 mg/ml bromfenolio mėlio
 pH 8

Darbo eiga:

1. Ankstesnėje darbo dalyje jūs nustėte baltymo koncentraciją kiekvienoje frakcijoje, ir kiekvienoje frakcijoje ji buvo vis kitokia. Elektroforetiškai skirstant baltymus kiekviename gelio šulinėlyje turi būti ta pati baltymo koncentracija. Rekomenduojama galutinė baltymo koncentracija šulinėlyje yra 2 mg/ml, taigi prieš maišant tiriamą pavyzdį su denatūravimo terpe paruoškite tiriamą pavydį kurio baltymo koncentracija yra 4 mg/ml.
2. Paruoštas tiriamas pavyzdys yra sumaišomas su denatūravimo terpe santykiu 1:1 (pvz. 0.2 ml + 0.2 ml), todėl galutinė visų terpės komponentų koncentracija bus du kartus mažesnė.
3. Tada tiriamas pavyzdys perkeliamas į vandens vonią ir inkuduojamas mažiausiai 10 min prie ~60 °C.
4. Ta pati procedūra yra atliekama su baltymais žymenimis. Mes naudosime tokį baltymų mišinį (4 mg/ml):

<i>Baltymas</i>	<i>Molekulinė masė, kDa</i>
Citochromas c	12
Pepsinas	35
Jaučio serumo albuminas, V frakcija	69
γ-globulinas (tetrameras, 2x23 ir 2x53 kDa)	156

5. Kai poliakrilamido gelis galutinai polimerizavosi, išimamos šukos ir į susidariusius šulinėlius įdėkite tiriamus tirpalus pagal schemą:

<i>Šulinėlio Nr.</i>	
1	Baltymais žymenys, 10 µl
2	Kraujo plazma, 10 µl
3	Eritrocitų lizatas, 10 µl
4	Citoplazmos frakcija, 10 µl
5	Membranų frakcija, 10 µl
6	Kraujo plazma, 5 µl
7	Eritrocitų lizatas, 5 µl
8	Citoplazmos frakcija, 5 µl
9	Membranų frakcija, 5 µl
10	Baltymais žymenys, 5 µl

6. Elektroforezės aparatas pripildomas buferio (1 L į elektroforezės kamerą ir 0.1 L į tarpą tarp dviejų gelių), uždengiamas dangtis, prijungiami elektroda ir paleidžiama elektros srovė (25 – 45 mA vienam geliui, 50 – 85 mA dviem geliams). Elektroforezė vykdoma kol bromfenolio mėlio juosta pasiekia gelio apačią.
7. Elektroforezei pasibaigus elektros srovė išjungiama ir atjungiami elektrodai. Geliai išimami iš elektroforezės kameros, nupilamas buferis, atsukami sraigtai, viršutinis stiklelis nuimamas ir gelis perkeliamas dažymo indą. Greitai praskalavus H₂O nupilamas ir užpilamas dažas. Dažymo procedūra paprastai užtrunka per naktį nuolat maišant.

Teorija III. Gelių dažymas

Baltymų detekcijai poliakrilamido geliuose paprastai naudojamas kumasi mėlynojo (angl. Coomassie Blue) tirpalas metanolyje su ledine acto rūgštimi (parūgštintas metanolis precipituoja baltymus). Dažymas paprastai atliekamas per naktį tirpalą nuolat maišant. Maišymas užtikrina tirpalo cirkuliaciją, o tai palengvina tirpalo patekimą į gelį ir užtikrina vienodą gelio nudažymą.

Dažas prasikverbia į visą gelį, tačiau tvirtai prisijungia tik prie baltymų. Dažo perteklius turi būti išplautas naudojant metanolio/acto rūgšties tirpalą taip pat nuolat maišant. Paprastai tai atliekama dviem etapais: pirmiausiai naudojamas 50 % metanolio + 10 % acto rūgšties tirpalas, 1-2 valandas, o tada 7 % metanolio + 10 % acto rūgšties tirpalas. Pirmasis tirpalas pašalina didžiąją dalį gelyje esančio skysčio (todėl gelis susitraukia), o antrojo tirpalo poveikyje gelis vėl išbrinksta ir nuskaidrėja. Gerai nudažytame ir išplautame gelyje

turėtų matytis mėlynos baltymų juostos skaidriame fone. Po dažymo geliai yra išdžiovinami ir nufotografuojami tolesnei analizei.

Pradinis gelio frontas sudarytas iš bromfenolio mėlio dažymo metu išnyksta (pirmiausiai rūgštinėje aplinkoje jo spalva pakinta į gelsvą, o vėliau jis visai išplaunamas). Mažo procentiškumo poliakrilamido geliuose paprastai nemažai mažos molekulinės masės baltymų juda kartu su fronto linija, todėl po dažymo kumasi mėlynuoju matoma aiški fronto linija gelio apačioje. Didelio procentiškumo poliakrilamido geliuose fronto linijos paprastai nesimato.

Kumasi mėlynasis nudažo ne visus baltymus. Paprastai nenudažomi baltymai savo sudėtyje turintys daug angliavandenių grupių. Kiti dažai naudojami baltymų dažymui poliakrilamido geliuose yra: periodinis rūgšties-šifo (angl. periodic acid-Schiff, PAS), fast green, Kodak 'Stain's all', dažymas sidabro nitratu ir k.t..

Praktinė dalis III. Gelių dažymas

Įranga ir priemonės:

Indas dažymui, kratyklė.

Reagentai

Tirpalas dažymui: 0.1 % kumasi mėlynasis + 50 % metanolio + 10 % ledinės acto rūgšties

Tirpalas praplovimui po dažymo:

50 % metanolio + 10 % ledinės acto rūgšties

7 % metanolio + 10 % ledinės acto rūgšties

Darbo eiga:

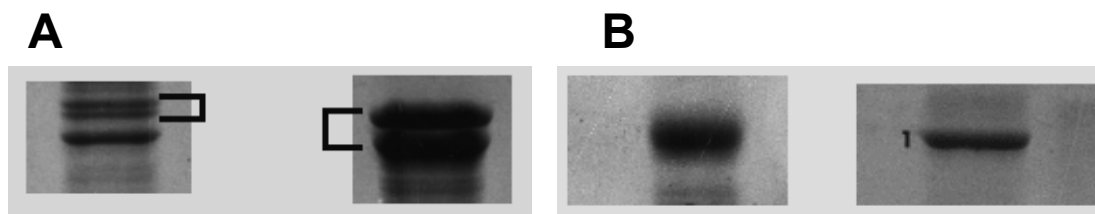
1. Ant gelio užpilkite dažymo tirpalo su 0.1 % kumasi mėlynuoju, kad gelis būtų padengtas.
2. Indelį su geliu padėkite ant purtyklės ir palikite per naktį.
3. Dažą nupilkite ir užpilkite 50 % metanolio + 10 % ledinės acto rūgšties tirpalo. Palikite 1-2 valandoms ant purtyklės.
4. Tirpalą nupilkite ir užpilkite 7 % metanolio + 10 % ledinės acto rūgšties tirpalo. Palikite 1-2 valandoms ant purtyklės.

5. Tirpalą nupilkite ir gelį išdžiovinkite. Jei yra galimybė gelį nufotografuokite, kad vėliau galėtumėte išanalizuoti.

Teorija IV. Gelio analizė

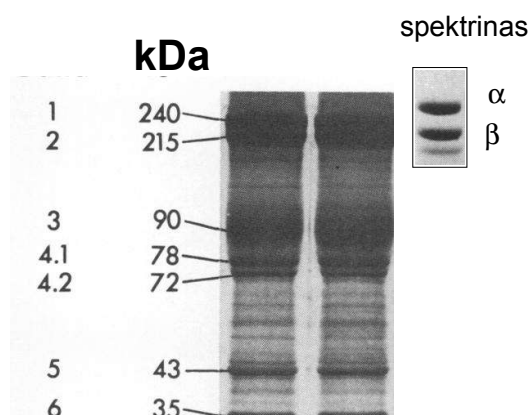
Paprastai elektroforetiškai skirstant išgrynintų ląstelės komponentų (pvz. plazminė membranos, ribosomų, endoplazminio tinklo ir t.t) baltymus denatūruojančiame poliakrilamido gelyje gaunamos tik viena arba kelios dominuojančios baltymų juostos. Pavyzdžiui, skirstant eritrocito membranos baltymus 7-8 % poliakrilamido galyje dominuoja spektrino (> 200 kDa) juostos, kurios formuoja dupletą gelio viršuje (dupletu vadinamos dvi šalia migruojančios ir vienodu intensyvumu nusidažančios baltymų juostos, kurios paprastai būna sudarytos iš dviejų skirtingų baltymų, tačiau struktūriškai panašių baltymų (dažnai dvi to paties baltymo izoformos) (Pav. 1A)), plačios anijonų nešiklio (3 juostos, ~100 kDa) ir aktino juostos (~43 kDa). Didesnės koncentracijos poliakrilamido geliuose (pvz. 15 %) geriau atsiskiria mažesnės molekulinės masės baltymai (Pav. 1C).

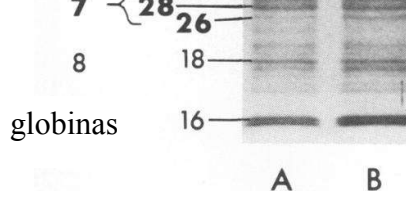
Citoplazminiai (tirpūs) baltymai ir su membrana susiję (periferiniai, bet ne transmembraniniai) baltymai paprastai gelyje formuoja siauras, ryškias, ryškiais kraštais juostas (Pav. 1B, dešinėje). Transmembraniniai baltymai, kurių didžioji sekos dalis sudaryta iš amino r. su hidrofobinėm liekanom, paprastai pilnai nedenatūrojami ir gelyje suformuoja platesnes ir su ne tokiais ryškiais kraštais juostas (Pav. 1B, kairėje). Jeigu gelyje stebimos labai plačios juostos, tai taip pat gali reikšti, kad užnešta per daug tiriamo pavyzdžio arba, kad pavyzdys yra sudarytas iš vieno dominuojančio baltymo.



C

α -spektrinas = 260 kDa (1, 240)
 β -spektrinas = 225 kDa (1, 240)
 Ankirinas = 215 kDa (2)
 3 juosta = 90-100 kDa (3)
 4.1 juosta = 78 kDa (4.1)
 4.2 juosta = 72 kDa (4.2)
 Aktinas = 43 kDa (5)
 Glikoforinas C = 25 kDa (7)
 Globinas = 16 kDa





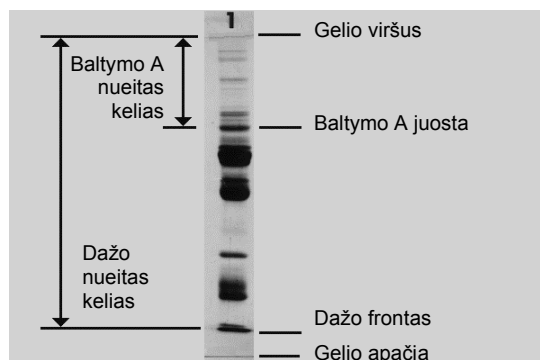
Pav. 1 A Baltymo dupletas. B Membraninio (kairėje) ir citoplazminio (dešinėje) baltymo pavyzdys. C Eritrocito membranos baltymų skirstymas denatūruojančiame poliakrilamido gelyje (15 %).

Gelių analizė pradedama nuo paviršutiniškos gelio apžiūros ir įvertinimo. Pirmiausiai patikrinama ar gaunami atsikartojantys rezultatai (paprastai eksperimentas atliekamas kelis kartus).

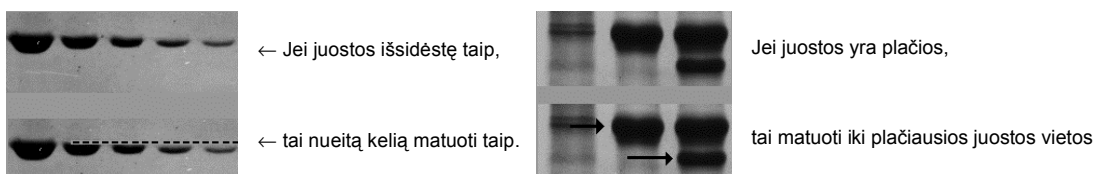
Tam tikro baltymo judėjimas gelyje kitų baltymų atžvilgiu yra įvertinamas dydžiu vadinamu **santykiniu baltymo judrumu**. Santykinis judrumas (R_f) paskaičiuojamas padalinus baltymo nueitą kelią iš kelio kurį nuėjo dažas (pvz. kumasi mėlynasis) (Pav. 2, 3). Absolūtus judrumas yra baltymo nueitas kelias per tam tikrą laiko tarpą. Praktikoje naudojamas santykinis judrumas kadangi jis igalina lyginti baltymo judėjimą skirtinguose geliuose, nepriklausomai nuo gelių dydžio ir elektroforezės trukmės.

Santykinis baltymo judrumas priklauso nuo to baltymo molekulinės masės. Jeigu eksperimente panaudojamas standartinių baltymų mišinys kurių molekulinė masė yra žinoma gelyje, gaunamos standartų 'kopėčios' (Pav. 4). Paskaičiavus standartinių baltymų R_f (reikšmė visada bus tarp 0 ir 1) ir atidėjus R_f priklausomybę nuo baltymo molekulinės masės dešimtainio logaritmo iš gautos kalibracinės kreivės (Pav. 5) galima nustatyti tame pačiame gelyje išskirstytų nežinomų baltymų santykinę molekulinę masę.

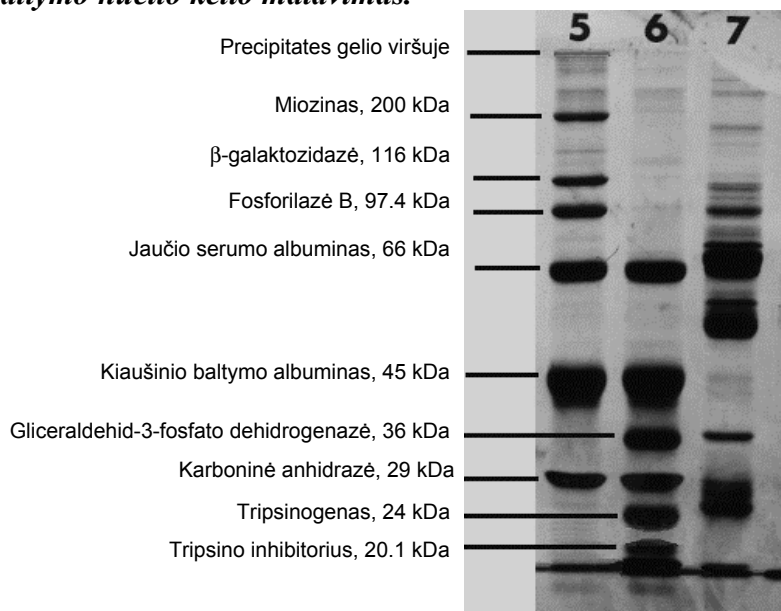
Tam tikro procentiškumo poliakrilamido gelis gerai išskirsto baltymus tik tam tikrame molekulinų masių diapazone. Taip yra dėl dviejų priežasčių. 1) Akrlamido koncentracija nulemia žemutinę ribą, t.y. visi baltymai kurių molekulinė masė yra mažesnė už žemutinę ribą juda tuo pačiu greičiu kaip ir dažas. 2) Sąryšis tarp molekulinės masės ir santykinio judrumo R_f yra logaritminis, todėl baltymų išskirstymas į individualias juostas yra blogesnis gelio viršuje. Dėl šios priežasties naudojant didesnio procentiškumo gelius keletas juostų gali susilieti į vieną juostą. Paprastai 10 % (ar netgi daugiau) gelio višutinės dalies yra nenaudingi. Taigi, norint charakterizuoti visus tiriamame pavyzdyje esančius baltymus reikia panaudoti kelis skirtingo procentiškumo gelius (mažesnio procentiškumo gelyje bus išskirstyti didesnės molekulinės masės baltymai, tuo tarpu didesnio – mažesnės).



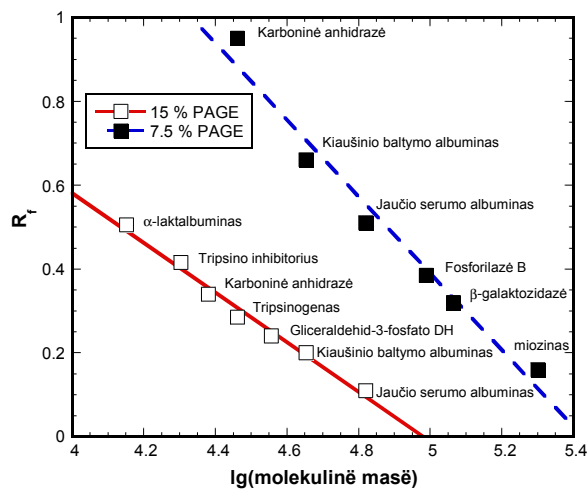
Pav. 2 Santykinio judrumo nustatymas.



Pav. 3 Baltymo nueito kelio matavimas.



Pav. 4 Tiriama pavyzdžio baltymų lyginimas su standartiniais baltymais. Šiame pavyzdyje elektroforezė buvo atlikta 10 % poliakrilamido gelyje. 5 ir 6 eilutėje buvo panaudoti standartinių baltymų mišiniai (5 eilutė – standartų molekulinė masė 30-200 kDa, 6 eilutė – standartų molekulinė masė 14-70 kDa), o 7 eilutėje tiriamas pavyzdys.



Pav. 5 Kalibracinės kreivė baltymų santykinės molekulinės masės nustatymui. Baltymai žymenys (Pav. 4) buvo išskirstyti dviejų koncentracijų (7.5 ir 15 %) poliakrilamido geliuose ir aidėta jų santykinio judrumo (R_f) priklausomybė nuo jų molekulinės masės dešimtainio logaritmo.

Praktinė dalis IV. Gelio analizė

Darbo eiga:

1. Nustatykite, kur yra gelio viršus/apacia ir kairė/dešinė.
2. Nustatykite, kuri juosta atitinka kurį tiriamąjį pavyzdį.
3. Įvertinkite, kaip pavyko frakcionavimo procedūra, t.y. ar frakcijos persidengia (skirtingose frakcijose stebima to paties baltymo juosta)?
1. Paskaičiuokite baltymų-žymenų santykinį judrumą R_f ir sudarykite kalibracinę kreivę (Y ašyje R_f , X ašyje $\log_{10}(\text{molekulinė masė})$).
2. Paskaičiuokite visų gelyje matomų baltymų juostų atstumus (R_f) ir iš kalibracinės kreivės nustatykite santykinę jų masę.
3. Naudodamiesi aukščiau pateiktu eritrocito baltymų aprašymu pabandykite nustatyti kokius baltymus jums pavyko išskirti ir kaip jie pasiskirstė tarp citozolinės ir membranų frakcijos.