



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 bakalaurų rengimui**

BIO 414. EVOLIUCIJA IR POPULIACIJŲ GENETIKA

Laboratorinis darbas

2. Polimorfizmo analizė baltymų gel-elektroforezės būdu.

Jau šio amžiaus trečiame dešimtmetyje Tisel (1937) nustatė, kad panaudojus elektroforezę laisvame tirpale kraujo serumo globulinas galima išskaidyti į keletą frakcijų - *elektromorfų*. Vėliau buvo įvesta krakmolo ir poliakrilamidinių, agaro ir acetilceliuliozės gelių (PAAG) elektroforezės kurios naudojamos didelės molekulinės masės junginių (baltymai, fermentai, DNR ir pan.) analizei (1 lentelė.).

Elektroforezės metodika ir tiesioginis išskirtų baltymų išryškinimas gelyje taikant specifinį histocheminį dažymą pirmą kartą aprašytas tiriant esterazių heterogeniškumą (Market, Hunter, 1957). Elektroforezės ir histocheminio dažymo metodų įsivavinimas paskatino gamtinių populiacijų genetinius tyrimus molekuliniam lygmenyje.

Elektroforezė gali būti atliekama ir skystoje terpėje. Šis metodas pagrįstas skiriamųjų ribų tarp baltymų tirpalų ir buferio tirpalo pastebėjimu ir fiksavimu. Taip nustatoma, ar baltymų tirpalas yra nevienalytis. Šiuo metodu nustatyta sudėtinga kraujo baltymų tirpalo struktūra ir daugelio fermentų elektroforezinis grynumas.

Gel-elektroforezė būna horizontali ir vertikali, plokštelinė ir cilindrinė. Plokštelinė naudojama, kai norima palyginti daug pavyzdžių, frakcionuotų vienodomis sąlygomis. Elektroforezė būna vienos dimensijos, kai srovė visą laiką teka viena kryptimi, ir dviejų dimensijų, kai kryptis keičiama statmenai prieš taiėjusiai. Atliekant dvidimensinę (dviejų matavimų) analizę išskiriami baltymai, kurie vienos dimensijos tyrime uždengia vienas kitą, nes turi panašų elektroforezinį paslankumą. Junėja (1984) arklių serumo baltymų atskyrimui naudojo kombinuotą dvidimensinę elektroforezę: pirmiausia baltymus frakcionavo poliakrilamidiniame gelyje, po to - krakmoliniame. Taip išsiskiria net minoriniai fermentai. Krakmolo gelis yra geras, kai reikia išskirti baltymus, nes duoda aiškias frakcijas, yra labilus, galima išskirti minorinius fermentus. Šiuo metu dažniau naudojamas poliakrilamidinis gelis. Elektroforezės būdu išfrakcionuotus mišinius galima specifiskai dažyti histocheminiais metodais, tokiu būdu išvengiant papildomo tiriamos medžiagos gryninimo, kas labai palengvina tiriamąjį darbą.

1 lentelė. Baltymų gel-elektroforezės* pagrindinių metodų privalumai ir trūkumai.

Savybės	SG	PAAG	CAG	AG
Išskyrimas pagal krūvį	taip	taip	taip	taip
Išskyrimas pagal dydį (M.r., forma ir pan.)	taip	taip	ne	ne
Toksiškumas	ne	taip	ne	ne

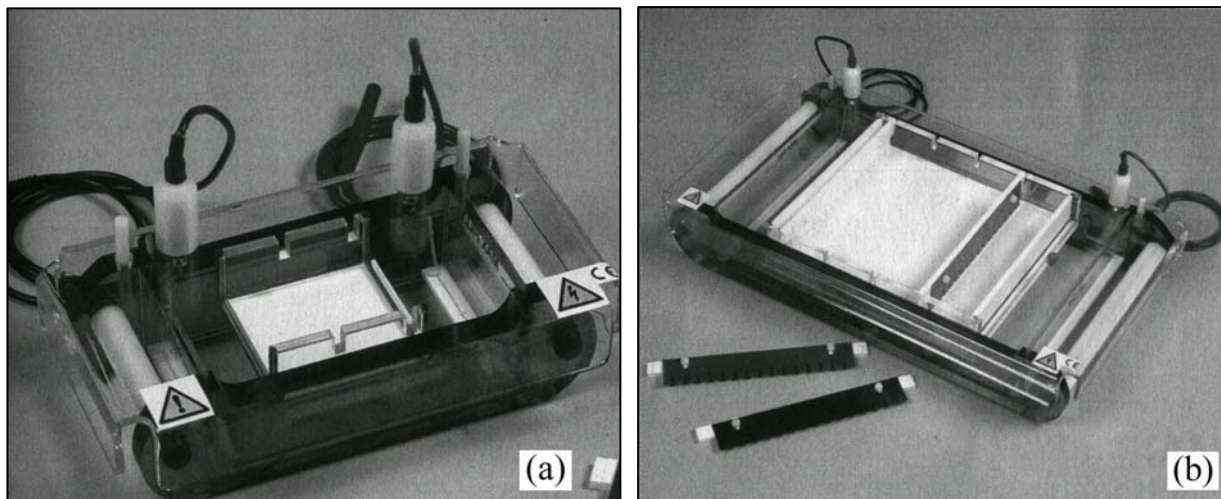
Elektroforezės laikas	4-24h	4-6h	0.3-3h	3-4h
Minimalus reikalingas pavyzdžio kiekis	2μl	2μl	0.5μl	1μl
Maksimalus reikalingas pavyzdžio kiekis	>50μl	>50μl	5μl	>50μl
Reikiamas dažų kiekis	5-50ml	10-50ml	1-3ml	10-50ml
Elektroendoosmozė	taip	ne	taip	taip
Būtina įtampa (V/cm)	1-10	5-10	<3	20
Būtinas šaldymas	taip	kartais	ne	taip
Gelis lengvai nusiima	dažniausiai	ne	taip	taip
Vienu metu išskiriami katijoniniai ir anijoniniai baltymai	taip	ne	taip	taip

*SG = krakmolo gel-elektroforezė; PAAG = poliakrilamido gel-elektroforezė; CAG = celiulozės acetato gel-elektroforezė; AG = agarozės gel-elektroforezė.

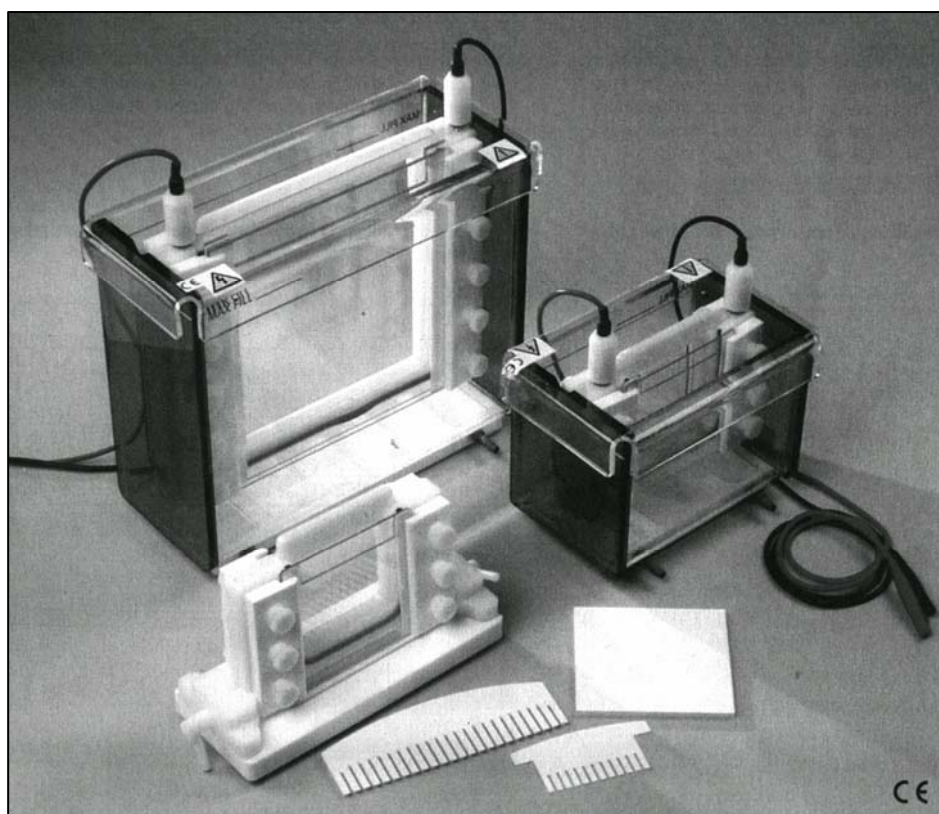
Elektroforezės principas

Baltymai (ir fermentai), dėl juos sudarančių aminorūgščių yra amfoteriniai elektrolitai, tai yra priklausomai nuo tirpalo pH gali būti anijonai arba katijonai. Elektros lauke baltymo dalelės juda, todėl elektroforezės būdu baltymų mišinį galima frakcionuoti. Per tirpalą leidžiant nuolatinę elektros srovę, įelektrintos molekulės bei jonai juda elektrodo, turinčio priešingą elektros krūvį, link. Judėjimo greitis priklauso nuo judančios dalelės krūvio dydžio (didėja augant sumariniam krūviui, kuris priklauso nuo pH), jos formos ir molekulinės masės (stambesnės juda lėčiau, nes didėja trinties jėga ir elektrostatinė sąveika su terpe), tirpiklio savybių, temperatūros ir kitų veiksnių. Polipeptidines grandines sudarančios aminorūgštys suteikia baltymams ir fermentams specifinį krūvį, kuris gali pakisti tik tokiu atveju, kai struktūriniame gene įvyksta taškinė mutacija. Pirminės fermento struktūros pasikeitimas, dėl paveldimoje medžiagoje įvykusios mutacijos, dažnai, nors ir ne visada, įtakoja ir sumarinį makromolekulės krūvį. Todėl fermento molekulės, koduojamos skirtingų to paties geno alelių, dažniausiai elektriniame lauke judės skirtingu greičiu ir užims skirtingas pozicijas po elektroforezės.

Poliakrilamidinis gelis (PAAG) pradėtas naudoti kaip nešėjas baltymų elektroforezėje Davis ir Ornstein (1959), Raymond ir Weintraub (1959) darbuose. Tolimesnis metodo tobulinimas vyko Davis (1964), Raymond (1964), Ornstein (1964) ir kt. tyrimuose. Dėka palankių eksperimentatorių savybių, PAAG šiuo metu yra plačiai naudojamas įvairiuose biocheminiuose ir molekulinės biologijos eksperimentuose makromolekulių (baltymų, nukleino rūgščių ir pan.) frakcionavimui.



3 pav. Dviejų tipų (a) ir (b) horizontalios gel-elektroforezės aparatai.



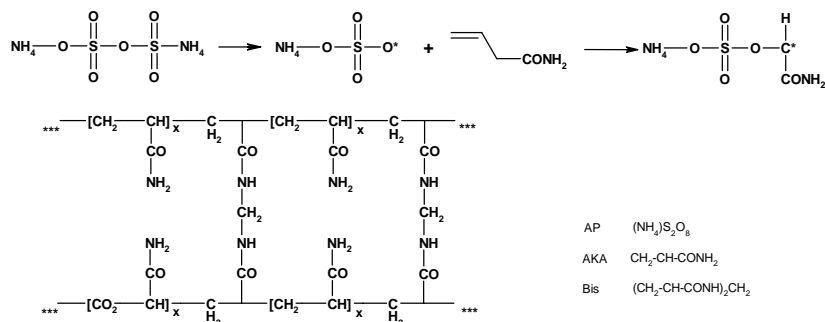
4 pav. Vertikalios gel-elektroforezės aparatai.

Pradiniai komponentai naudojami PAAG paruošti:

1. **Monomerų tirpalas** (sudaro AKA (akrilamidas) ir Bis (N,N'-metilenbisakrilamidas)) naudojamas akrilamido linijinių polimerų susiuvimui. Nuo jų santykio priklauso gelio elastingumas ir poringumas.
2. **Gelinis buferis.** Baltymų (ir fermentinių sistemų) frakcionavimui labai didelę įtaką turi buferinės sistemos pasirinkimas. Naudojami – formiatiniai, acetatiniai, citratiniai, veronaliniai, fosfatiniai, Tris, EDTA, piridininiai buferiai (Priedas D). Buferis palaiko ir stabilizuoja nešėjo pH, taip įtakodamas medžiagos migracijos greitį. Be to jis taip pat yra naudojamas kaip tiriamo pavyzdžio tirpiklis. Naudojant didelės joninės jėgos buferius, pavyzdžių migracijos greitis mažėja, suminė srovė didėja, išsiskiria šilumos kiekis. Mažinant buferio joninę jėgą migracijos greitis didėja, suminė srovė ir išsiskiriantis šilumos kiekis mažėja, didėja difuzija ir mažėja skiriamoji geba. Dažniausiai naudojami 0.05-0.1M joninės jėgos buferiai. Daugumai rūgštinėmis savybėmis pasižyminčių baltymų optimalus buferio pH yra neutralus arba silpnai šarminis.
3. **TEMED** (N,N,N,N'-tetrametiletildiaminas) - polimerazinės reakcijos katalizatorius.
4. **AP** (amonio persulfatas) - polimerizacijos iniciatorius.

PAAG polimerizacija – egzoterminis procesas ir jo greitis priklauso nuo aplinkos temperatūros, kurią sumažinus 1°C procesas pailgėja 2min. Kokybiškiems geliams palankiausias polimerizacijos laikas 30-40min. Dirbant nestandartinėje aplinkoje (esant žymiesiems svyravimams nuo KT), polimerizacijos laiko optimumas pasiekiamas empiriškai parenkant didesnes ar mažesnes AP koncentracijas. Bet kuriuo atveju, išlaikomas 1:1 santykis tarp AP ir TEMED koncentracijų.

PAAG polimerizacijos procesas. Esterinės jungties nutraukimas AP molekulėje veda prie dviejų radikalų susidarymo su nesusporuotais elektronais prie deguonies, kurie stimuliuoja dvigubų jungčių nutraukimą AKA molekulėje ir prisikabina prie jos tokiu būdu, kad AKA molekulėje susidaro radikalas su nesusporuotu elektronu prie anglies atomo. Šis stimuliuoja dvigubų jungčių nutraukimą ir naujų AKA molekulių prijungimą su naujo R susidarymu ir t.t. Grandininė polimerizacija vyksta tol, kol susitikę du radikalai tarpusavyje sudarys įprastą kovalentinę jungtį. Bis-akrilamidas į augančią polimerų grandinę gali įsimontuoti per vieną vinilo grupę. Kita grupė gali būti įmontuojama į kitą grandinę ir tokiu būdu vyksta grandinių susiuvimas tarpusavyje.

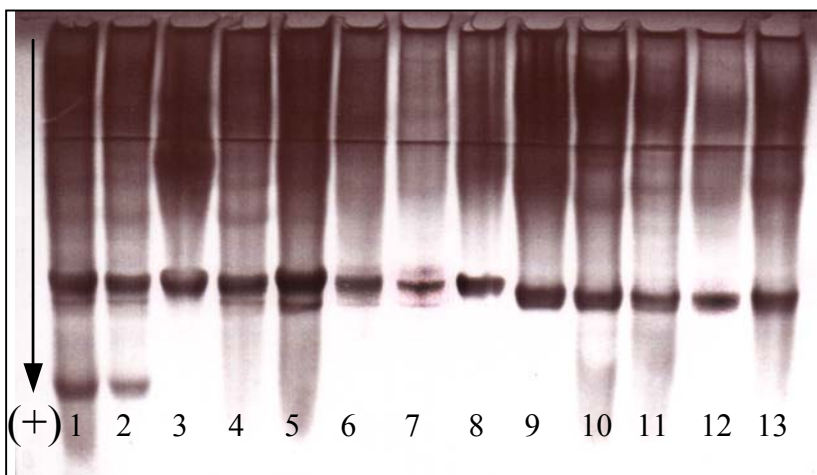


Pagrindinės savybės suteikiančios PAAG privalumą prieš kitus nešėjus:

- Pagal porų dydį galima varijuoti plačiose ribose. Gelio procentingumas pasirenkamas empiriškai, atsižvelgiant į frakcionuojamo objekto molekulinę masę.
- Naudojamo buferio pH neturi ryškios įtakos gelio polimerizacijos procesui, kas suteikia galimybę eksperimento metu pasirinkti pačias palankiausias sąlygas.
- PAAG būdinga žemo laipsnio adsorbicija ir elektroendoosmozė, dėl ko makromolekulių migracijos metu dažniausiai išvengiama šalutinių efektų.
- Makromolekulių frakcionavimo laikas PAAG yra sąlyginai trumpas lyginant su kitais nešėjais.

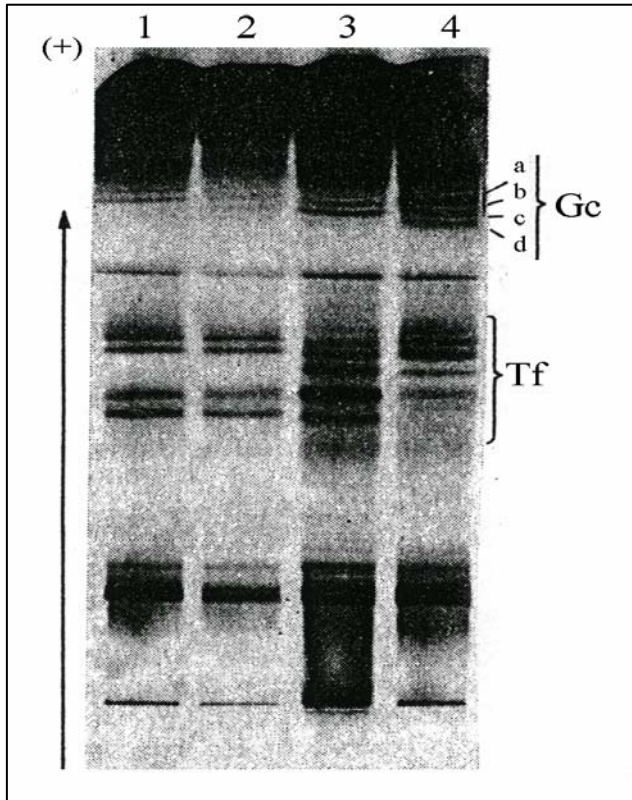
2.1. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Izobaltymai. Daugybinės formos būdingos ir daugeliui nekatalitinių baltymų. Hemoglobinas, mioglobinas, feritinas, aktinas ir miozinas – visi šie baltymai egzistuoja keliose izoformose, kurias apsprendžia dviejų ir daugiau subvienetų tipų buvimas. Nefermentinių baltymų daugybinės formos iširtos mažiau nei fermentų ir tai sietina su tuo, kad dėka specifinio dažymo fermentus žymiai lengviau aptikti neišgrynintuose audinių ekstraktuose. Heterogeniškumo atveju, izobaltymams būdingos tos pačios genetinės ir negenetinės priežastys kaip ir izofermentams, jų spektras ontogenezės metu gali kisti ir taip pat būdingas specifiskumas audiniui. **Nefermentiniai kraujo serumo baltymai.** Kadangi baltymų polimorfinėms sistemoms būdingas nesudėtingas išskyrimas, stabilumas, informatyvumas ir paprasta genetinė kontrolė, jos yra plačiai naudojamos populiaciniuose tyrimuose. Žmogaus ir gyvūnų kraujo plazmoje elektroforezės būdu geriausiai išsiskiria albuminai, α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - ir γ - globulinai ir transferinai.

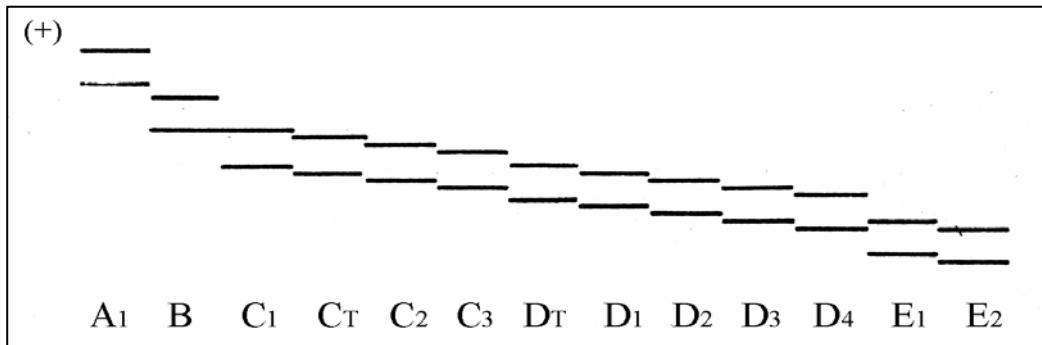


5 pav. *Nefermentinių baltymų spektras (1-5 – ondatra (O.zibethicus), 7-8 – vandeninis pelėnas (A. terrestris), 9-13 – bebras (C.fiber)).*

Albuminai sudaro 54-58% visų plazmos baltymų. Baltymą formuoja viena polipeptidinė grandinė. Postalbuminų frakcija priklauso specifinių baltymų grupei (Gc) ir yra polimorfinė. Transferinai išskirti iš daugelio organizmų kraujo plazmos yra labai polimorfiniai, kontroliuojami autosominio lokuso polialelinės sistemos.



6 pav. Šiaurės elnio *kraujo serumo baltymų* elektroforetinis spektras.



7 pav. Šiaurės elnio *transferinų* lokuso galimi homozigotiniai variantai.

Darbo tikslas. Išfrakcionuoti baltymus panaudojant gel-elektroforezės metodą poliakrilamidiniame gelyje.

Pagrindinė įranga.

1. Maitinimo šaltinis (**УИИЛ-1** ir **2301 Macrodrive 1 Power Supply**) kuris generuoja pastovią srovę elektroforezės metu.
2. Vertikalios elektroforezės aparatas (**“HIMFILL”**, Tallin), kurį sudaro:
 - Nerūdijančio plieno ir platininis elektrodai.
 - Kameros buferiui. Suformuojamos įstačius rėmelius nešėjui.
 - Rėmeliai nešėjui, kurių kiekvieną sudaro korpusas ir du stiklai (115X120X1.5 mm).
 - Standartinės “šukutės” pavyzdžių užnešimo vietoms (“šulinėliams”) formuoti gelyje. “Šukutes” sudaro 13 “šulinėlius” formuojančių plokštelių.
 - Tekančio vandens principu veikianti šaldymo sistema (elektroforezės metu palaikoma pastovi temperatūra (+4°C)).

Papildoma įranga. 1. Įvairių ilgių ir storių gumelės. 2. Pincetas. 3. Žirkutės. 4. Skalpelis. 5. Cheminės stiklinės (50, 250, 500ml). 6. Matavimo cilindrai (25, 1000ml). 7. Stiklinės kolbos (500, 1000, 2000ml). 8. Mikropipetės (20, 100, 1000µl). 9. Svarstyklės.

Medžiagos.

1. **20% AKA tirpalas**¹:

Akrilamidas	96g	
Bis		4g
dist.H ₂ O	iki 500ml	

Paruoštas tirpalas nufiltruojamas ir laikomas tamsoje prie 3–4°C, 1 mėnesį.

2. **Tris-glicininis buferis, pH~8.3 (pagrindinis):**

0.0495M Tris	6g
0.383M Glicinas	28.8g
dist.H ₂ O	iki 1l

Paruoštas buferis nufiltruojamas ir laikomas KT.

3. **1.6% AP tirpalas**²:

AP	1.6g
dist.H ₂ O	100ml

4. TEMED (N,N,N,N'-Tetrametilendiaminas)

5. Bromfenolio mėlis

6. **40% Sacharozės tirpalas:**

Sacharozė	40g
dist.H ₂ O	100ml

Paruoštas tirpalas nufiltruojamas ir laikomas tamsoje prie 3–4°C, 1 mėnesį.

Darbo eiga.

1. Paruošti rėmelius nešėjui: erdvė geliui suformuojama tarp stiklų dedant tarpines (2mm storio), stiklai gerai įtvirtinami korpuse užsandarinant visus nereikalingus plyšius.
2. 20% AKA tirpalą atšildyti iki KT.
3. Paruošti 2.5%³ (koncentruojantis) ir 7.5% (skiriantis) poliakrilamidinio gelio tirpalus (2 lentelė) (dvisluoksniame gelyje, koncentruojantysis sudaro 1/3-1/4 dalį viso gelinio tirpalo; skiriantysis gelis sudaro 2/3-3/4, atitinkamai).

2 lentelė. PAAG su skirtingomis AKA koncentracijomis paruošimas.

Pastaba: akrilamidas – neurotoksiškas! Ruošiant tirpalus mūvėkite pirštines ir apsauginius kvėpavimo takų raiščius!

Pastaba: prieš kiekvieną elektroforezę, stiklai turi būti labai švarūs, kad išvengti gelio prilipimo!

Pastaba: AP įmaišyti į tirpalą tik prieš pat užpilant rėmelius!

¹ Hemoglobino tyrimams rekomenduojami kiekiai: akrilamidas - 97.5g, bis-akrilamidas - 2.5g.

² Vandeningas AP tirpalas gali būti laikomas esant 5°C temperatūrai ne ilgiau kaip vieną savaitę.

Praktiškiau naudoti sausų miltelių pavidalu, juos suberiant į mišinį prieš pat PAAG polimerizaciją.

³ Priklausomai nuo reagentų, 2.5% gelis gali nesipolimerizuoti ir tokiu atveju jį galima pakeisti 5%-iu.

Gelis Komponentai	2.5%	5%	7.5%
20% AKA	10ml	20ml	30ml
Pagrindinis buferis			8ml
TEMED			0.08ml
dist. H ₂ O			iki 75ml
AP	5ml 1.6% tirpalo arba	0.08g sausos medžiagos	
Galutinė išeiga			80ml

4. Paruoštus rėmelius atsargiai užpildyti skiriančiuoju geliniu tirpalu ir palikti polimerizuotis (30min) dienos šviesoje.
5. Susipolimerizavus skiriančiajam geliui, rėmelius iki viršaus užpildyti koncentruojančiu geliu, įstatyti “šukutes” (1.5mm storio) ir palikti polimerizuotis (20-40min) dienos šviesoje. *Vykstant polimerizacijai prie “šukučių” gali atsirasti oro burbulų, kuriuos reikia užpildyti geliu.*
6. Paruoštus rėmelius su nešėju įstatyti į elektroforezės aparatą ir kameras užpildyti darbinio buferiu (taip kad apsemtų suformuotus “šulinėlius”), kuris ruošiamas skiedžiant pagrindinį tris – glicininį buferį dešimt kartų. *Darbinis buferis gali būti naudojamas kelių elektroforezių metu.*
7. Atsargiai išimti “šukutes”, pajungti elektrodus (migracija vyksta nuo katodo link anodo), šaldymo sistema ir paleisti preelektroforezę (160V, 30min.), kurios metu iš geliukų išvaromas AP⁴, kameroje esantis buferis atvėsinamas iki +4°C.
8. Preelektroforezės metu pasirošti pavyzdžius:
 - a) Kraujo mėginius ir homogenatus atšildyti, mikropipete paimti reikiamą kiekį. *Pavyzdžių kiekis pasirenkamas empiriškai, pvz. kepenims nuo 5 iki 8μl, širdies audiniui – 8-10μl, serumui –10-20μl.*
 - b) Pridėti 40% sacharozės tirpalo (santykiu 1:1). *Sacharozė padidina pavyzdžių klampumą ir tuo išvengiama nepageidaujamo išplaukimo efekto pavyzdžių užnešimo į “šulinėlius” metu. Jei pavyzdžiai labai klampūs galima atskiesti buferiu iki reikiamos baltymo koncentracijos.*
 - c) Įlašinti bromfenolio mėlio. *Tai vadinamas lyderinis dažas (angl. “tracker dye”) kurio migracijos greitis yra didesnis nei frakcionuojamų sistemų, todėl pagal jį stebima elektroforezės eiga.*
9. Atlikus preelektroforezę, prieš pavyzdžių užnešimą, “šulinėlius” prapūsti mikropipete, kadangi juose būna susikaupęs vanduo, kuris duoda nepageidaujamą “nešvaraus pavyzdžių užnešimo” efektą.
10. Kiekvienas pavyzdys užnešamas individualiai į jam skirtą “šulinėlį”.
11. Paleisti elektroforezę:

Pastaba: nepamirškite susirašyti kur ir kokius pavyzdžius užnešate!

I etapas: Pavyzdžių išėjimas iš “kišenių” (40mA, 20-30min). *Šio etapo metu baltymai koncentruojasi buferio/gelio riboje ir glaustesnėje formoje patenka į gelį.*

II etapas (pagrindinis): Darbinis režimas. Srovė, įtampa ir trukmė parenkami empiriškai. Frakcionavimas atliekamas 110-130mA ir 260-380V intervaluose, 1-2h.

2.2. Baltymų dažymas

Baltymo ir kai kurių fermentų (pvz., esterazių) dažymo metu spalvota substancija susidaro vykstant druskų kondensacijai su aromatiniu diazotiniu komponentu (FBRR, CBB).

Darbo tikslas. Nudažyti nespecifinių kraujo serumo baltymų elektroforegramas⁵.

⁴ AP yra vienintelis kenksmingas komponentas, kuris veikia fermentus, todėl prieš pradėdant frakcionavimą pašalinamas iš gelio preelektroforezės būdu.

⁵ Nefermentinių baltymų ir papildomų izofermentinių sistemų dažymo tirpalai bei metodikos pateiktos priede E.

Medžiagos ir įranga. 1. Dažymo indas. 2. Stiklinė kolba dažams (500ml). 3. Graduota pipetė (20ml). 4. Svarstyklės. 5. CBB (angl. *Coomassie Brilliant Blue G-250*). 6. Perchloro r. (HClO_4) vandeninis tirpalas. 7. 7% Acto r. tirpalas.

Darbo eiga.

1. Atsverti 200mg CBB ir tirpinti 17.5ml perchloro r. vandeniniame tirpale.
2. Mišinį skiesti dist. H_2O iki 500ml ir gerai išmaišyti.
3. Paruoštais dažais užpilti geliuką ir laikyti tamsoje, 12 val.
4. Gelį nuo dažų atplauti 7% acto r. tirpalu ir įdėti į uždaromą maišelį. *Dažus galima naudoti daug kartų todėl po dažymo jie supilami atgal į indą ir laikomi tamsoje, KT.*