

Bílkoviny

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka



2020/21

Obsah

NATIVNÍ ELEKTROFORÉZA BÍLKOVIN SÉRA 3

1. PRINCIP ÚLOHY 3
2. PROVEDENÍ ÚLOHY 4
3. VYHODNOCENÍ 10

Nativní elektroforéza bílkovin séra

1. Princip úlohy

Nativní elektroforéza sérových bílkovin je stále jedním ze základních vyšetření v klinické biochemii. V tomto praktickém cvičení ji použijeme jako obecný příklad elektroforetického dělení proteinů.

V tomto uspořádání se dělí nativní, tedy nedenaturované bílkoviny séra v zásaditém prostředí. Téměř všechny sérové proteiny mají za těchto podmínek záporný náboj, takže v elektrickém poli putují od záporné ke kladné elektrodě. Elektroforézu je možné provádět na různých nosičích; v tomto praktiku použijeme relativně řídký polyakrylamidový gel. Je dostatečně pevný pro zpracování, současně jsou ale jeho póry natolik velké, že podstatnou měrou neomezují ani pohyb makromolekul. Rychlost, kterou bílkoviny v elektrickém poli putují, tak závisí především na hustotě náboje v jejich molekule.

Krevní sérum obsahuje několik set různých bílkovin. Hustota náboje v jejich molekulách je různá, takže je pomocí nativní elektroforézy můžeme rozdělit na řadu frakcí.

Aby byly jednotlivé frakce ostré, je třeba, aby se začaly všechny bílkoviny vzorku dělit současně. Proto vlastnímu elektroforetickému dělení na separačním polyakrylamidovém gelu předchází koncentrace vzorku na jeho začátku. Použijeme tedy tzv. diskontinuální systém: Vzorky nejprve projdou *koncentračním gelem*, který má odlišné vlastnosti (mírně kyselé pH, nižší koncentrace složek pufru) a pak teprve vstupují do separačního gelu. V elektrickém poli se v koncentračním gelu pohybují jak složky pufru, který tak postupně v různých částech gelu mění své vlastnosti, tak i bílkoviny, které zde mají relativně malý náboj. Kombinací těchto dějů a vzájemnou interakcí částic dojde k tomu, že se na rozhraní koncentračního a separačního gelu dostanou všechny bílkoviny do jedné úrovně a do separačního gelu díky tomu vstoupí současně.

Celý pokus se skládá z několika kroků:

1. Nejprve se připraví separační polyakrylamidový gel. Vzniká polymerací akrylamidu. Aby polymer nevytvářel jen nevětvená vlákna, přidává se k monomerům akrylamidu ještě bisakrylamid, který během polymerace vytvoří mezi vlákny příčné můstky, takže vznikne trojrozměrná síťovitá struktura. Akrylamid polymeruje mezi dvěma deskami (v našem případě mezi sklem a eloxovanou hliníkovou deskou) bez přístupu vzduchu. Pro účely praktického cvičení je tento krok již hotový.
2. Před „začátek“ separačního gelu se připraví koncentrační gel. Jde rovněž o polyakrylamidový gel, má však jinou hustotu a obsahuje jiný pufr. Do koncentračního gelu se pomocí tzv. hřebínku vytvoří jamky, do nichž se později nanesou vzorky.
3. Vzorky séra se ředí stejným pufrům, jaký byl použit pro koncentrační gel, a aby se usnadnilo jejich nanášení, přidává se k nim barvivo a glycerol. Glycerol má velkou hustotu, takže vzorky při nanášení na gel klesají ke dnu jamek.
4. Připravenými vzorky se naplní jamky v gelu a proběhne vlastní elektroforetické dělení.
5. Rozdělené bílkoviny se denaturují, díky čemuž se v gelu přestanou pohybovat a v následujících krocích je již není možné z gelu vymýt, a obarví se vhodným organickým barvivem.
6. Nakonec se získaný elektroforeogram hodnotí. Plocha a intenzita zbarvení jednotlivých frakcí je přibližně úměrná hmotnostní koncentraci bílkoviny. V tomto cvičení demonstrujeme především vizuální hodnocení; v praxi se gely fotografují nebo skenují, získaný obraz se měří a kvantitativně vyhodnocuje.


2. Provedení úlohy


V návodu je postup, podle nějž se elektroforéza běžně provádí (tj. jednotlivé kroky v pořadí, jak jsou uvedeny v předchozí kapitole). Z časových důvodů budou tato kroky při praktickém laboratorním cvičení seřazené odlišně:


1. K dispozici bude již hotový „sendvič“ se separačním i koncentračním gelem. Laboratorní praktická cvičení začnou nanášením vzorků (podkapitola Nanášení vzorků a spuštění elektroforézy).
2. Dále budou připravené sendviče se separačním gelem, ale bez koncentračního gelu. Zatímco bude probíhat elektroforéza, připravíme a nalijeme koncentrační gel (podkapitola Příprava koncentračního gelu). Necháme jej polymerovat. Tím budou připravené sendviče pro další skupinu studentů.
3. Mezitím proběhne elektroforetické dělení. Vrátime se ke gelům, na které jsme nanášeli vzorky, obarvíme (podkapitola Barvení gelu) a vyhodnotíme je.

Příprava separačního gelu


Chemikálie a pomůcky

Pufr pro separační gel (Tris-HCl 375 mmol·l⁻¹, pH 8,8) 

Směs akrylamid-bisakrylamid 30 % : 0,8 % v čisté vodě 

APS – peroxidisíran amonný 10% 

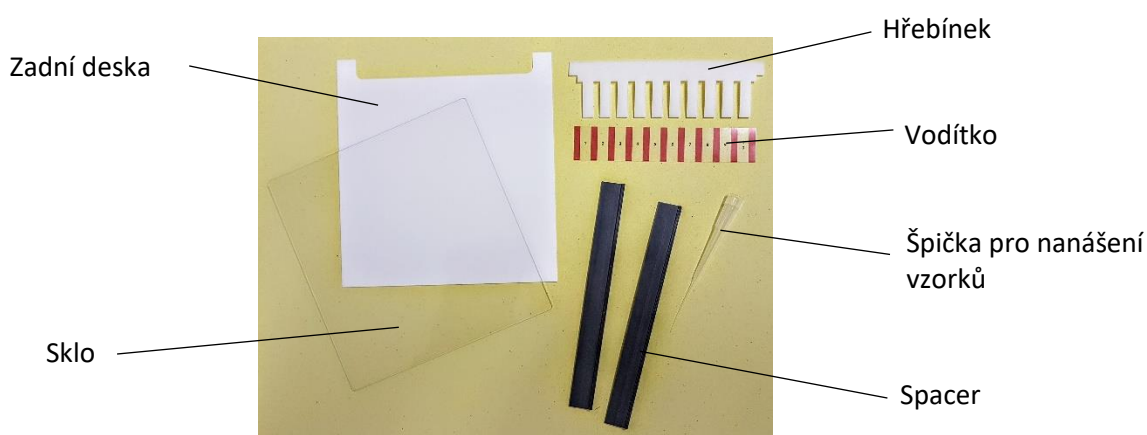
TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin 

1-butanol 

Sklo a zadní deska pro gel 10 × 10,5 cm

Spacer 0,75 mm

Držák a kolébka pro nalévání gelů







Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1452>

Sklo, zadní deska a spacers musejí být dokonale čisté, bez zaschlých kapek vody a otisků prstů. Pracujeme v rukavicích.

1. Na sklo nakreslete lihovým fixem čáru 3 cm od okraje. Tato čára označuje, do jaké výšky se bude nalévat separační gel.
2. Sestavte „sendvič“ pro nalití gelu – mezi sklo a zadní desku vložte spacers. Čára je na vnější straně skla nahoře, výřez v zadní desce je také nahoře.
3. Sendvič vložte do držáku na nalévání gelu. Dolní konec skla, zadní desky a spacerů zarovnejte o desku stolu tak, aby držák přesahovaly asi o 1 mm.
4. Postupně dotáhněte šrouby na držáku. Je třeba je utáhnout pevně, ale rovnoměrně tak, aby sklo neprasklo.
5. Do kolébky vložte těsnění – dospod šedé pěnové, na něj černé pryžové. Gumové těsnění musí být čisté, bez zaschlých kapek vody.
6. Držák se sendvičem vložte do kolébky (šrouby směřují ven) a zajistěte dotahovacími páčkami. Sendvič zatím nedotahujte proti těsnění v kolébce – delší část rukojeti páček směřuje dolů.
7. V odsávací baňce připravte gel:


Počet gelů	2	4	6
Pufr pro separační gel 1x	7,89 ml	15,8 ml	23,7 ml
Akrylamid – Bis 30 % : 0,8 % 	2,00 ml	4,0 ml	6,0 ml
Odsávací baňku uzavřít, připojit k vývěvě a roztok 2 minuty odvědušňovat			
APS 10%	100 µl	200 µl	300 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak opatrným kroužením baňkou – při pipetování i promíchávání zabránit vzniku bublin.			
TEMED	10 µl	20 µl	30 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak kroužením baňkou, zabránit vzniku bublin. Materiál okamžitě dále zpracovávat – gel začíná polymerovat.			


8. Dotáhněte držák se sendvičem proti těsnění v kolébce – otočte páčky delší částí rukojeti nahoru. Pak 5ml automatickou pipetou nalijte gel  mezi sklo a zadní desku tak, aby hladina dosahovala k čáře. Pracujte rychle, ale tak, aby v gelu neuvázly bubliny vzduchu.
9. Ihned poté opatrně převrsteďte gel přibližně 0,5 ml 1-butanolu .
10. Nechejte gel polymerovat alespoň 1 hodinu při pokojové teplotě. Zbytek gelu z odsávací baňky vylijte do plastové zkumavky – slouží pro kontrolu, že gel polymeruje. Odsávací baňku vypláchněte.
11. Po ztuhnutí gelu vyjměte držák z kolébky, povolte šrouby a vyjměte sendvič s nalitým gelem. Slijte butanol.
12. Připravený gel je možné skladovat ve vlhku při 4 °C, např. zabalený do papírového ručníku navlhčeného vodou.

Příprava koncentračního gelu

Chemikálie a pomůcky

Pufr pro koncentrační gel (Tris-HCl 150 mmol·l⁻¹, pH 6,8) 

Směs akrylamid-bisakrylamid 30 % : 0,8 % v čištěné vodě 

APS – peroxidisíran amonný 10% 

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin 

Sendvič s nalitým separačním gelem

Hřebínek 0,75 mm pro 10 jamek

Elektroforetická vana – spodní díl a katodový blok, svorky





Silnější filtrační papír nastříhaný na proužky asi 7 × 4 cm




Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1453>


1. Sendvič se separačním gelem zbavte zbytku butanolu – stříčkou pečlivě opláchněte horní hranu gelu čištěnou vodou. Zbytky vody odsajte pruhem filtračního papíru.
2. Do elektroforetické vany zasuňte katodový blok s vloženým pěnovým těsněním. K němu přiložte sendvič s gelem. Zadní deska je výřezem nahoře a dotýká se pěnového těsnění.
3. Sendvič upevněte ke katodovému bloku pomocí svorek. Horní okraj sendviče by měl být v úrovni horního okraje katodového bloku. Delší část svorky se dotýká skla, kratší katodového bloku.
4. Uvedeným způsobem upevněte do elektroforetické vany dva gely. Pokud se má pracovat jen s jedním gelem, upevněte místo druhého prázdnou skleněnou desku.
5. V odsávací baňce připravte koncentrační gel:


Pufr pro koncentrační gel 1x 	4,32 ml
Akrylamid – Bis 30 % : 0,8 % 	625 µl
Odsávací baňku uzavřít, připojit k vývěvě a roztok 2 minuty odvzdušňovat	
APS 10% 	50 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak opatrným kroužením baňkou – při pipetování i promíchávání zabránit vzniku bublin.	
TEMED 	5 µl
Promíchat opakovaným protažením špičkou a pak kroužením baňkou, zabránit vzniku bublin. Materiál okamžitě dále zpracovávat – gel začíná polymerovat.	

- 1 ml koncentračního gelu  převrstvěte na separační gel. Poté mezi sklo a zadní desku zasuňte hřebínek. Jeho zuby v koncentračním gelu vytvoří jamky pro nanášení vzorků.
7. Nechejte koncentrační gel polymerovat 30 minut při pokojové teplotě. Zbytek gelu z odsávací baňky vylijte do plastové zkumavky – slouží ke kontrole, že gel polymeruje. Odsávací baňku a pomůcky očistěte.

Nanášení vzorků a spuštění elektroforézy

Chemikálie a pomůcky

Vzorky séra ředěné 12× směsí pufru pro koncentrační gel, bromfenolové modři a glycerolu 

Tris-glycinový pufr (Tris 25 mmol·l⁻¹, glycin 192 mmol·l⁻¹, pH asi 8,3) 

Elektroforetická vana s upevněným gelem, víko, zdroj pro elektroforézu



Vodítko pro nanášení vzorků

Špičky pro nanášení vzorků do gelu („gel-load“)




Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1454>

1. Do katodového prostoru nalijte kádinkou vychlazený elektroforetický pufr  tak, aby sahal asi 2 mm nad zářez v zadní desce. Stejný pufr nalijte i do elektroforetické vany tak, aby byly dosahoval k kraji výlisku (pro naplnění vany je třeba 250 ml pufru).
2. Navlhčete vodítko pro nanášení vzorků a „přilepte“ jej na sklo tak, aby červené plochy byly přesně mezi zuby hřebíčku. Bezbarvé plochy s čísly označují jednotlivé jamky v gelu.
3. Opatrně vyjměte hřebínek.
4. Do jamek nanášejte pomocí tenkých špiček po 10 µl připravených (ředěných a obarvených) vzorků séra .
5. Připojte hadice chlazení a nechejte protékat chladicí vodu.
6. Elektroforetickou vanu uzavřete víkem. Dbejte na správnou polaritu – konektory jsou barevně označené.
7. Zapojte kabely do zdroje. Nastavte napětí 400 V. Elektroforéza probíhá přibližně 20 minut. Bromfenolová modř, kterou jsou vzorky obarvené, putuje přibližně s nejrychlejší frakcí (albuminem).

Barvení gelu

Chemikálie a pomůcky



Barvicí roztok – Coomassie brilliantní modř G250, kyselina trichloroctová, pomocné látky (kyselina sírová, hydroxid draselný) 

Plastová krabička s víkem
Špachtle pro sejmutí gelu
Vývěva se sběrnou lahví
Mikrovlnná trouba




Postup

Demonstrace postupu: <https://www.medicalmedia.eu/cs/Detail/1455>

1. Vypněte elektroforetický zdroj a odpojte kabely. Pak teprve otevřete víko elektroforézy.
2. Vypněte chlazení a odpojte hadice.
3. Vyjměte katodový blok i s gely a slijte katodový pufr  do elektroforetické vany. Dejte pozor, abyste do pufru nenalili chladicí vodu, která zůstala v bloku – trubičky pro připojení chladicího okruhu zacpěte prstem. Poté z bloku sundejte sendviče s gelem.
4. Ze sendviče opatrně vyjměte spacersy.
5. Opatrně „rozlepte“ sendvič tak, aby gel zůstal jen na zadní desce nebo jen na skle. Plastovou špachtlí odřízněte a odstraňte koncentrační gel.
6. Desku s gelem vložte do krabičky s 2-3 cm čišťené vody. Pomocí špachtle gel jemně sejměte z desky; dávejte pozor, aby se gel neroztrhnul. Desku vyjměte.
7. Vylijte destilovanou vodu (popřípadě její zbytky odsajte vývěvou) a gel převrstvěte asi 3 mm barvicího roztoku . Nakláněním krabičky gel rozbalte do plochy a zcela smočte barvicím roztokem.
8. Krabičku přikryjte víkem (ale víko neuzavírejte po celém obvodu) a barvicí roztok s gelem ohřejte k varu v mikrovlnné troubě (asi 40 s při 700 W). Gel nechejte v horkém barvicím roztoku asi 1 minutu, obsah krabičky opatrně promíchejte pomalým nakláněním. Bílkoviny se v tomto kroku barví světle hnědě nebo nazelenale.

Varování: Může dojít k utajenému varu. Vroucí barvicí roztok je silně žíravý.

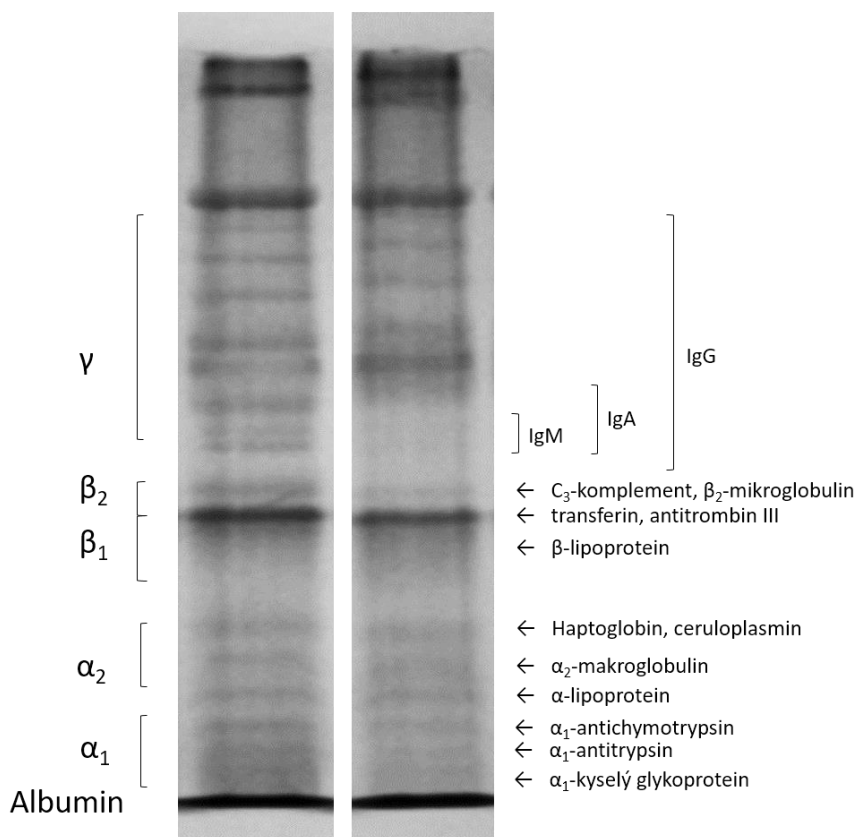
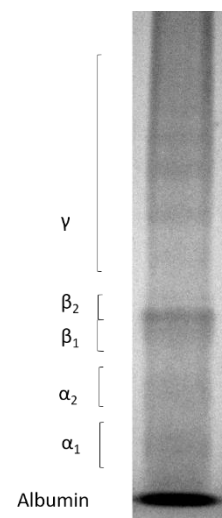
9. Opatrně odsajte barvicí roztok  pomocí vývěvy. Je třeba dávat pozor, aby se při odsávání nepoškodil gel.
10. Gel opakovaně opláchněte nadbytkem čišťené vody. Vodu je možné odsát nebo slít do dřezu. Po posledním opláchnutí nechejte gel v čišťené vodě. Bílkovinné frakce budou obarvené jasně modře.
11. Pro hodnocení je možné gel fotografovat nebo skenovat.
12. Pro uchování lze gel přenést na silnější filtrační papír, překrýt průhlednou fólií a usušit mezi vrstvami savého materiálu. Po úplném usušení je možné průhlednou fólii sejmut.

3. Vyhodnocení

Cílem tohoto praktického cvičení je především demonstrovat elektroforézu jako separační techniku; elektroforetickým frakcím lidského séra se budeme věnovat v letním semestru. Přesný popis výsledného elektroforeogramu tedy přesahuje záměr tohoto textu a na tomto místě uvádíme základní údaje spíše pro zajímavost.

Při nativní elektroforéze sérových bílkovin nejrychleji putuje albumin. Pomaleji migrují globuliny, které lze podle pohyblivosti uspořádat do několika skupin označovaných řeckými písmeny α , β a γ . V závislosti na přesném uspořádání experimentu se tyto frakce dále dělí – běžně se α -globuliny dělí na α_1 a α_2 a podobně β -globuliny se dělí na β_1 a β_2 .

Lidské sérum ovšem obsahuje velké množství bílkovin, takže každá z takto klasicky popisovaných frakcí obsahuje řadu specifických proteinů. Mnoho bílkovin, byť v nižších koncentracích, je i mezi intenzivněji zbarvenými poli, která jsou vidět na první pohled. Uspořádání experimentu, které jsme pro nativní elektroforézu použili v našem pokusu, je dosti citlivé a pokud bychom použili nižší napětí, našli bychom podstatně větší počet frakcí, než se obvykle popisuje.



Výsledek nativní elektroforézy dvou vzorků séra. Uspořádání bylo podobné, jako v prováděném experimentu, dělení ale probíhalo při nižším napětí (100 V). Každá z obvykle popisovaných frakcí (popis vlevo) se rozpadá do několika ostrých pruhů. Vpravo je vyznačena pozice vybraných bílkovin.