

### [Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)  
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)  
[.net](#)  
[Innowacje](#)  
[Nauka](#)  
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



[Strona główna](#) > [Start](#)

## Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Elektroforeza jest zjawiskiem elektrokinetycznym, w wyniku którego pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego dochodzi do przemieszczania się makrocząsteczek obdarzonych niezrównoważonym ładunkiem elektrycznym. Prędkość przemieszczania się naładowanej elektrycznie makrocząsteczki zależy od kilku czynników tj.: od jej ładunku, rozmiaru, kształtu oraz oporów ruchu środowiska. Wykorzystując elektroforezę możliwe jest szybkie separowanie makrocząsteczek takich jak: kwasy nukleinowe (DNA, RNA) czy białka [4]. Wyróżnia się kilka rodzajów elektroforezy, które różnią się między sobą składem żeli elektroforetycznych, warunkami rozdziału, a także zastosowaniem: inny rodzaj elektroforezy stosuje się do rozdziału kwasów nukleinowych, a inny do rozdziału białek.

### Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Żele poliakrylamidowe są polimerami akrylamidu i bisakrylamidu, a od ich proporcji zależy gęstość żelu oraz wymiary porów. Gęstość żelu dobiera się w zależności od wielkości analizowanych

cząsteczek (tj. w zależności od ich masy cząsteczkowej). W przypadku wysoko-cząsteczkowych białek do rozdziału używa się żeli o niższej gęstości, zaś białka nisko-cząsteczkowe rozdziela się w żelach bardziej gęstych. W żelach 8% możliwe jest rozdzielanie cząsteczek o wielkości od 24 kDa do 205kDa, żele 10% stosuje się do rozdzielania cząsteczek o masie od 14kDa - 205 kDa, a żele 12% do rozdziału 14-66 kDa cząsteczek [9].

### **Elektroforeza w obecności SDS**

Do rozdziału białek najczęściej stosuje się elektroforezę w obecności SDS tj. siarczanu dodecyłu sodu (tzw. SDS-PAGE). SDS jest substancją powierzchniowo czynną, która przyczynia się do poprawy rozdzielczości danej techniki elektroforetycznej. Zastosowanie siarczanu dodecyłu sodu podczas rozdziału przynosi wiele korzyści, ponieważ większość białek jest rozpuszczalna w elektrolitach zawierających SDS (a szczególnie takie po redukcji mostków disiarczkowych), a ponadto separacja (rozdział) białek odbywa się zgodnie z ich masami cząsteczkowymi. Należy również dodać, że barwienia kompleksów tworzonych przez białko i SDS jest znacznie wydajniejsze niż barwienie samego białka, a dodatkowo obecność SDS skutecznie eliminuje enzymatyczną degradację białek w trakcie ich separacji [4], [1]. SDS nadaje polipeptydom ładunek ujemny, dzięki czemu mogą one migrować w polu elektrycznym. Ilość związanego SDS przez białko jest prawie zawsze liniowo zależna od masy danego polipeptydu, co z wykorzystaniem markera masy umożliwia wyznaczenie masy rozdzielanych białek [1]. SDS powoduje zrywanie prawie wszystkich wiązań niekowalencyjnych w białku, co w konsekwencji prowadzi do rozfałdowania się łańcucha polipeptydowego [6].

### **Elektroforeza natywna**

Ten rodzaj elektroforezy prowadzi się w poliakrylamidzie, w warunkach, w których makrocząsteczki pozostają niezdenaturowane, dzięki czemu możliwe jest odzyskanie cząsteczek białkowych w stanie pełnej aktywności biologicznej. Próbka nałożona na żel rozpuszcza się w buforze, który nie powoduje denaturacji zawartych w niej białek. Elektroforeza natywna jest przeciwieństwem elektroforezy przeprowadzanej w obecności czynników denaturujących (np. SDS). Wadą metody jest słaba rozdzielczość [7], [9].

W celu rozdziału białek w zależności od ich masy cząsteczkowej, próbkę przed nałożeniem na żel należy zredukować w odpowiednim buforze (tzw. buforze redukującym) oraz odpowiedniej temperaturze. Związkami redukującymi (w buforach redukujących) najczęściej są:

- merkaptoetanol oraz
- DTT (ditiotreitol), związki te przecinają (redukują) mostki disiarczkowe (S-S) pomiędzy białkami.

Elektroforeza zachodzi najefektywniej, gdy objętość próbki nakładanej na żel nie przekracza 10% objętości ścieżki, a ilość białek nakładanych na studzienkę znajduje się w przedziale od 1 do 50 µg. Ważne jest również, by próbka nie zawierała zbyt dużych ilości soli występujących w postaci zjonizowanej, ponieważ powodują one powstawanie smug na żelu podczas rozdziału oraz niejednorodność prążków[9].

### **Przygotowanie próbek do elektroforezy:**

Bufor do próbek (2 x stężony) - przepis wg mercka(hefera):

- 0,5 M TRIS-HCl o pH 6,8 (stężenie końcowe 0,125 M)
- 4% SDS (siarczan dodecyłu sodu)
- 20 %glicerol
- bromofenol blue (dodawac kroplami do uzyskania odpowiedniego granatowego koloru)



wypłukać izobutanol z góry żelu, po czym delikatnie osuszyć go bibułą, nie dopuszczając tym samym do przesuszenia górnej warstwy żelu. Następnie, wylewa się żel górny (4%), który jest tzw. żelem zagęszczającym (w tym żelu umieszcza się grzebień w celu powstania tzw. studzienek) [2], [3], [5], [9].

Przygotowanie żelu rozdzielającego i zagęszczającego [9].

W skład buforu do elektroforezy wchodzi Tris-glicyna o pH=8.3, żel rozdzielający zawiera Tris-HCl (o pH=8.8), zaś żel zatężający Tris-HCl o niższym pH=6.8. Wyższe pH w żelu rozdzielającym powoduje jonizację glicyny, w związku z czym podczas rozdziału migruje ona tuż za jonami chlorkowymi [1].

Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym (zawierającym SDS) [1].

Przygotowanie żelu:

### **Odczynniki:**

- mieszanina monomerów: akrylamid - bisakryloamid (37,5 / 1) 30%
- 10% SDS
- 10% nadsiarczan amonu (APS)
- TEMED
- 1.5 M Tris o pH= 8.0
- 1M tris o pH= 6.8
- 5x stężony bufor do elektroforezy

Na początku należy przygotować odpowiednią ilość roztworu żelu rozdzielającego (o odpowiedniej procentowości). Przygotowany roztwór należy wlać pomiędzy dwie szklane płytki przedzielone przekładkami i połączone klamkami, pozostawiając odpowiednią ilość miejsca, w celu późniejszego wylania żelu zatężającego, oraz włożenia grzebienia (studzienki w żelu) [1].

Po wylaniu, roztwór żelu trzeba bardzo ostrożnie zalać wodą lub alkoholem izoamylovym, i tak przygotowany żel pozostawić do polimeryzacji (na ok. 30 minut). Po upływie czasu polimeryzacji, zlać roztwór z nad żelu, po czym żel przepłukać wodą (w celu usunięcia resztek nie spolimeryzowanego akryloamidu). Kolejnym krokiem jest przygotowanie roztworu żelu zatężającego. Roztwór ten należy bezpośrednio wylać na żel rozdzielający, a następnie (delikatnie) wsunąć grzebień- uważając by nie powstały pęcherzyki powietrza, które przeszkadzają podczas rozdziału elektroforetycznego [1].

Ponownie pozostawić żel do polimeryzacji (ok. 30 minut). Gdy żel spolimeryzuje delikatnie usunąć grzebień i przepłukać kieszonki wodą dejonizowaną, żeby usunąć resztki niespolimeryzowanego akryloamidu (jak wyżej).

Tak przygotowany żel poliakryloamidowy umieścić w aparacie do elektroforezy i zalać 5x stężonym buforem do elektroforezy (tj.: 125mM Tris, 1.25M glicyna (pH 8.3), 0.5% SDS) [1].

### **Przygotowanie próbek do rozdziału elektroforetycznego:**

Badane próbki należy zawiesić w buforze Laemmliego (tj.: 0.065M Tris-HCl, 2% SDS, 5% b-merkaptotanol (pH 6.8), 0.01 % błękit bromofenolowy, 5% glicerol). Następnie, inkubować je przez 3 minuty w 100°C w celu denaturacji białek. Po denaturacji próbki można nakładać na żel [1].

### **Warunki rozdziału elektroforetycznego:**

Elektroforezę najlepiej prowadzić przy napięciu ok. 15 V na centymetr długości żelu (do momentu, kiedy barwnik dojdzie do dolnej krawędzi żelu) [1].

*Autor: Lidia Koperwas*

### **Literatura:**

[1]. Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego, Genetyka molekularna- materiały do zajęć laboratoryjnych, Warszawa 2003. Skrypt przygotowany przez pracowników Zakładu Genetyki UW.s. 41-42]

[2]. Słomski R, 2008. Analiza DNA, teoria I praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008. s. 72-73]

[3]. Rickwood D., Hames B.D., 1982. Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach. IRL Press Limited, Oxford.

[4]. Walkowiak B., Kochmańska V. Elektroforeza- przykłady zastosowań. Opracowanie zbiorowe. [www.p.lodz.pl/biofizyka/elektroforeza.pdf](http://www.p.lodz.pl/biofizyka/elektroforeza.pdf)

[5]. Westermeier R., 1993. Electrophoresis in practice. A guide to theory and practice. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

[6]. Hames D.B., Hooper N.M., 2009. Biochemia-krótkie wykłady. Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 68-71

[7]. [http://microbio.gumed.edu.pl/materialy/biol\\_mol/Elektroforeza.pdf](http://microbio.gumed.edu.pl/materialy/biol_mol/Elektroforeza.pdf)

[8]. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3423265>

[9]. [http://metlab.pl/Elektroforetyczny\\_rozdzial\\_bialek\\_p34.html](http://metlab.pl/Elektroforetyczny_rozdzial_bialek_p34.html)

<https://laboratoria.net/home/15600.html>

**Informacje dnia:** [Stu najzdolniejszych naukowców dostanie ponad 3 mln zł](#) [Trwa nabór na studia dla popularyzatorów nauki](#) [Znamy najlepszych młodych popularyzatorów nauki](#) [Aż połowę studentów](#)

[cehuje negatywna emocjonalność Kofeina wpływa na jakość nocnego wypoczynku](#) [Myślenie spiskowe towarzyszy człowiekowi od wieków](#) [Stu najzdolniejszych naukowców dostanie ponad 3 mln zł](#) [Trwa nabór na studia dla popularyzatorów nauki](#) [Znamy najlepszych młodych popularyzatorów nauki](#) [Aż połowę studentów cehuje negatywna emocjonalność Kofeina wpływa na jakość nocnego wypoczynku](#) [Myślenie spiskowe towarzyszy człowiekowi od wieków](#) [Stu najzdolniejszych naukowców dostanie ponad 3 mln zł](#) [Trwa nabór na studia dla popularyzatorów nauki](#) [Znamy najlepszych młodych popularyzatorów nauki](#) [Aż połowę studentów cehuje negatywna emocjonalność Kofeina wpływa na jakość nocnego wypoczynku](#) [Myślenie spiskowe towarzyszy człowiekowi od wieków](#)

## **Partnerzy**