

1. Elektroforeza natywna białek w żelach agarozowych.

Odczynniki:

Agaroza.

Bufor TG.

Roztwór Coomassie Brilliant Blue R-250.

Błękit bromofenolowy.

Zestaw do elektroforezy agarozowej.

Falcony 50, 14 mL.

Eppendorfy 1.5, 2.0 mL.

Pipety automatyczne regulowane.

Przygotowanie żelu agarozowego:

Do szklanej kolby odważyć 1.0 g agarozy.

Dodać do kolbki 100.0 mL buforu TG.

Rozpuścić agarozę przez zagotowanie.

Schłodzić żel w temperaturze pokojowej do ok. 60°C, wylać go na przygotowaną tackę i natychmiast umieścić grzebień w żelu.

Pozostawić do spolimeryzowania.

Przygotowanie próbek do analizy:

100.0 uL ekstraktu umieścić w czystym eppendorfie.

Dodać 5 kropli glicerolu.

Zabarwić na niebiesko błękitem bromofenolowym.

Elektroforeza:

Przygotowany żel umieścić w aparacie i zalać buforem TG.

W pierwszą i ostatnią studzienkę nanieść marker masy.

Do pozostałych studzienek nanieść przygotowaną próbkę w objętościach 10.0-30.0 uL.

Elektroforezę prowadzić w następujących warunkach:

80.0 V, 120 min z blokiem chłodzącym.

Po zakończeniu zlać bufor i płukać żel przez 10 min w wodzie destylowanej.

Następnie zalać roztworem utrwalającym i wytrząsać przez 30 min.

Po zakończeniu zlać roztwór utrwalający i przepłukać żel w wodzie destylowanej.

Po zakończeniu zlać wodę i zalać żel barwnikiem Coomasie i wytrząsać przez min. 30 min.

Po zakończeniu płukać żel przez w wodzie destylowanej aż do uzyskania wyraźnego obrazu.

2. Elektroforeza białek w żelach poliakryloamidowych (PAGE).

Odczynniki:

30% roztworu akryloamidów

1,5 M Tris-HCl pH 8,9

0.5 M Tris-HCl pH 6,8

10% SDS

10% APS

TEMED

Buforem obciążającym (denaturujący, niedenaturujący).

Roztwór Coomassie Brilliant Blue R-250.

Płyn Lugola.

Triton X-100.

Bufor do analizy aktywności proteolitycznej (61 mg L-cysteina, 50 uL triton X-100, 0,5 M bufor sodowo-fosforanowy pH 6.8; żel ze skrobią: 0,1 M bufor octanowy 5,5).

Skrobia.

Żelatyna.

Zestaw do elektroforezy PAGE.

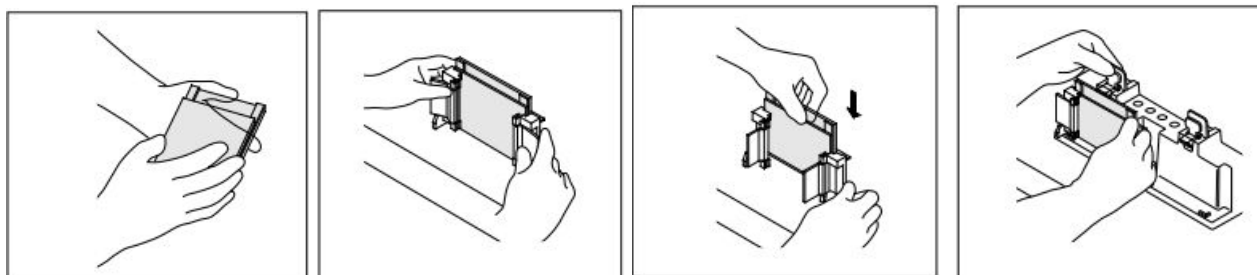
Falcony 50, 14 mL.

Eppendorfy 1.5, 2.0 mL.

Pipety automatyczne regulowane.

Przygotowanie 10% żelu poliakrylamidowego rozdzielającego:

Złożyć szybki do żeli grubości 0.75 mm lub 1.00 mm i umieścić w aparacie do wylewania postępując zgodnie z instrukcją na rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat składania szybki do elektroforezy.

Szybka grubsza z przekładkami ma oznaczoną górną krawędź. Cienką szybkę kładziemy przodem do nas.

Instrukcja

Techniki elektroforetyczne

Między szybki włożyć suchy grzebień i zaznaczyć markerem na szybie kreskę 1 cm pod grzebieniem. Usunąć grzebień.

Zmieszać:

1.65 ml 30% roztworu akryloamidów

1.25 ml buforu 1,5 M Tris-HCl pH 8,9

2 ml wody

UWAGA 1: W przypadku żelu do analizy aktywności amylaz wodę zastąpić 0.20 mg/mL roztworem skrobi.

UWAGA 2: W przypadku żelu do analizy proteaz amylaz wodę zastąpić 0.01 mg/mL roztworem żelatyny.

50 µl SDS

25 µl APS

2,5 µl TEMED

Wypełnić roztworem żelu przestrzeń pomiędzy szybkami do kreski narysowanej wcześniej na szybie. Delikatnie nawarstwić wodą destylowaną nalewając ją bardzo powoli po przekładce aparatu. Pozostawić do spolimeryzowania.

Przygotowanie 5% żelu zagęszczającego

Po spolimeryzowaniu żelu rozdzielającego należy osuszyć jego górną część przy pomocy bibuły, a następnie nanieść żel zagęszczający.

Zmieszać:

850.00 µl roztworu akryloamidów z

1.25 ml buforu 0.5 M Tris-HCl pH 6,8

2.85 ml wody

50 µl SDS

25 µl APS

5 µl TEMED

Wylać żel między szybki i umieścić w nim grzebień tak, aby w studzienkach nie było pęcherzyków powietrza. Pozostawić do spolimeryzowania.

Przygotowanie próbek do elektroforezy:

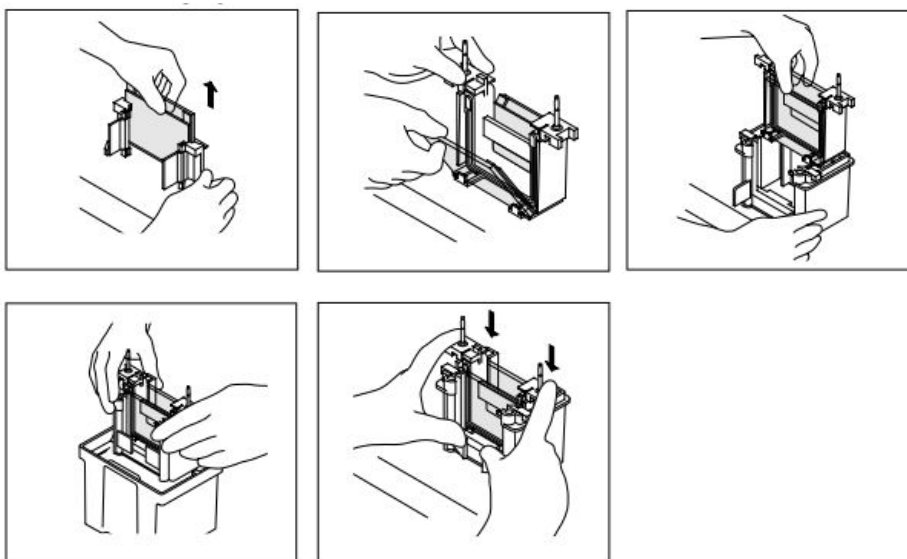
Roztwór białek do analizy z poprzedniego ćwiczenia rozcieńczyć buforem w stosunku 1:1 buforem obciążającym.

UWAGA 3: Dla próbki analitycznej wybrać bufor denaturujący, dla próbek do badania aktywności bufor niedenaturujący.

Instrukcja

Techniki elektroforetyczne

Wyciągnąć żel wraz z zabezpieczeniem ze statywu, otworzyć statyw składając skrzydełka tak, żeby były ustawione prostopadłe do nas i wyciągnąć do góry szybki, między którymi znajduje się żel. Włożyć żel krótką szybką do środka statywu, z drugiej strony analogicznie umieścić blanka (stroną z napisami w stronę uszczeltek) zgodnie z rysunkiem 2. Docisnąć szybki i blanka do dołu i całość włożyć do koszyczka (jest to możliwe tylko kiedy ma otwarte „drzwiczki”). Docisnąć wszystkie elementy do dołu i do uszczeltek a następnie jednostajnym ruchem zamknąć drzwiczki.



Rysunek 2. Schemat składania aparatu do elektroforezy.

Rozcieńczyć bufor elektroforetyczny 10 razy. Do utworzonej komory górnej, w której zanurzona będzie górna powierzchnia żelu nalać bufor elektroforetyczny, odczekać chwilę i sprawdzić czy nie przecieka.

Do komory dolnej włożyć koszyk z żelem i wlać do niej bufor na wysokość 3 cm.

Usunąć grzebień. Zalać kieszonki do pełna buforem i przepłukać każdą z kieszonek tipsem kapilarnym. Standardy białek o znanej masie cząsteczkowej nanieść do pierwszej kieszonki w objętości 10 μ l. Próby nanieść do studzienek po 15 μ l każda. Zapisać kolejność nakładania.

Aparat do elektroforezy zamknąć od góry pokrywą i podłączyć do zasilacza. Przeprowadzić elektroforezę najpierw przy 80V do wejścia białek w żel rozdzielający, a następnie przy 160 V do ukończenia elektroforezy. Po zakończeniu elektroforezy należy rozmontować aparat i delikatnie rozdzielić szyby. Żel z rozdzielonymi białkami wykorzystać do barwienia.

Instrukcja

Techniki elektroforetyczne

Inkubacja i barwienie żeli:

Przygotować 500 ml 1% roztwór tritonu X-100.

Wyplukać dwukrotnie żele w zależności od wykorzystania:

Wodą żel denaturujący do barwienia coomassie.

Barwieni coomassie:

Wyplukać żel w wodzie destylowanej 3 krotnie.

Inkubować przez 30 min żel w barwniku (25 mL metanol, 10 mL kwas octowy, 0.02 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 65 mL woda)

Odbarwienie do momentu uzyskania widocznych prążków wodą destylowaną.

Barwienie żeli do badania aktywności:

Wyplukać żel w wodzie destylowanej 3 krotnie.

Roztwór macierzysty płynu Lugola rozcieńczyć w stosunku 1:10.

Inkubować żel w roztworze aż do momentu równomiernego wybarwienia.

Wyplukać żele 1% roztworem tritonu X-100.

Wyplukać żel w wodzie destylowanej 3 krotnie.

Wyplukane żele inkubować w cieplarni w buforze:

żel z żelatyną: 61 mg L-cysteina, 50 uL triton X-100, 0,5 M bufor sodowo-fosforanowy pH 6.8;

żel ze skrobią: 0,1 M bufor octanowy 5,5.

Pozostawić w cieplarni (50 deg C) do następnych zajęć.

Sprawozdanie

Wykonane żele sfotografować i opisać.

W oparciu o marker masy wskazać główne komponenty ekstraktu.

Przeprowadzić identyfikację komponentów w oparciu o posiadane informacje o enzymach trawiennych.