

## ELEKTROFOREZA

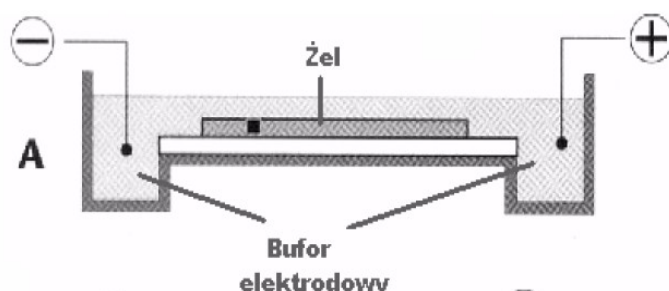
### ELEKTROFOREZA W ŻELU AGAROWYM

Agarozę to frakcja agaru oczyszczona z krasnorostów, w postaci handlowej jest białym lub lekko żółtym proszkiem. Jest to polisacharyd zbudowany z około 800 liniowo połączonych reszt heksozy (inaczej – 400 reszt agarobiozy). Agarobioza jest dwucukrem zbudowanym z D-galaktozy i 3,6-anhydro-L-galaktozy. Powstawanie żelu agarozowego jest reakcją odwracalną, w wyniku której pojedyncze, losowo zwinięte łańcuchy układają się w dwuniciową, helikalną strukturę III-rzędową, które rozgałęziają się tworząc sieć. Agarozę rozpuszcza się bardzo łatwo w gotującej się wodzie i pozostaje w stanie płynnym aż do temperatury około 40°C. Poniżej tej temperatury zestala się w postaci porowatego żelu. Po zestaleniu pozostaje w tej postaci nawet w podwyższonych temperaturach sięgających kilkudziesięciu °C. Rozmiary porowatości można regulować stosując agarozę w różnych stężeniach. Im wyższe jest stężenie agarozy, tym bogatsze jest usieciowanie i drobniejsze są pory. Zwykle przygotowuje się żele o stężeniach agarozy z przedziału 0,4-4,0%. Zaletą żeli agarozowych jest łatwość i szybkość ich przygotowania oraz możliwość separacji dużych makromolekuł np. DNA i RNA. Wadą zaś jest słaba wytrzymałość mechaniczna żeli oraz trudność ich utrwalania po rozdziale. Wyschnięte żele rozsypują się pod wpływem bardzo niewielkich sił.

Żel agarozowy stosuje się do rozdzielania DNA o szerokim zakresie mas cząsteczkowych. Wadą elektroforezy w żelu agarozowym jest słaba rozdzielczość frakcji DNA różniącego się poniżej 5% wielkości.

Stężenie agarozy [%]	Zakres długości rozdzielanego liniowego DNA [kp.z]
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Elektroforeza w żelu agarozowym prowadzona jest w aparatach ustawionych poziomo, a rozdział elektroforetyczny prowadzony jest w buforze TBE×1 (90 mM Tris-base, 90 mM kwas borowy, 2 mM EDTA, pH 8) lub TAE×1 (40 mM Tris-base, 40 mM lodowy kwas octowy, 1 mM EDTA, pH 8).



Cząsteczka DNA jest naładowana ujemnie w środowisku obojętnym i alkalicznym, a więc umieszczona w polu elektrycznym, przemieszcza się w kierunku anody. DNA o tych samych masach cząsteczkowych, ale różnych konformacjach charakteryzuje różną ruchliwość elektroforetyczną. Im dłuższa jest cząsteczka DNA lub RNA tym dłużej odnajduje ona drogę poprzez pory żelu. Jeżeli umieścimy DNA w żelu agarozowym i przyłożymy niskie napięcie to prędkość migracji DNA o różnych ciężarach cząsteczkowych jest proporcjonalna do napięcia. Aby otrzymać optymalny rozdział DNA o wielkości większej niż 2 kp.z, elektroforeza prowadzona jest w polu elektrycznym o natężeniu nie większym niż 5V/cm. Powyżej tego napięcia fragmenty DNA przemieszczają się z prędkością odwrotnie proporcjonalną do logarytmu ich ciężaru

cząsteczkowego. Elektroforetyczne zachowanie DNA w żelu agarozowym nie zależy od składu zasad azotowych i słabo zależy od temperatury. Jednak jeżeli stosuje się żele agarozowe o stężeniu mniejszym niż 0,5% należy elektroforezę prowadzić w temperaturze około 4°C.

Do uwidocznienia DNA po lub w trakcie elektroforezy stosowany jest rutynowo bromek etydyny (EtBr), który interkaluje pomiędzy sąsiednie pary dwuniciowego DNA (powinowactwo EtBr do jednoniciowego DNA jest znacznie słabsze) (skrypt str. 23). Należy pamiętać, że obecność związku interkalującego do DNA w żelu agarozowym zmniejsza ruchliwość elektroforetyczną DNA o około 15%. Innym barwnikiem DNA jest np. SYBR Green, którego czułość barwienia dwuniciowego DNA jest około 25 razy większa niż EtBr.

## ELEKTROFOREZA W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM (PAGE)

**Żele poliakrylamidowe** - przygotowywane są z roztworu monomerów akrylamidu i substancji sieciujących (ang. cross-linkers). Należy zawsze pamiętać, że akrylamid w postaci monomerycznej jest bardzo silną neurotoksyną i nawet po procesie polimeryzacji stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ze względu na pozostałości swobodnych monomerów w objętości żelu. Jako substancję sieciującą stosuje się najczęściej N,N'-metylenebisakrylamid (bis-akrylamid). Reakcję polimeryzacji, będącą w istocie wolnorodnikową reakcją polimeryzacji, można zainicjować chemicznie lub fotochemicznie. Przy chemicznej inicjacji procesu najczęściej stosuje się nadsiarczan amonu w obecności katalizatora N,N,N',N'-tetrametyletylenodiaminy (TEMED). Fotochemiczne wyzwolenie procesu polimeryzacji zachodzi w obecności ryboflawiny pod działaniem długofalowego światła UV i jest katalizowane przez TEMED. Ze względu na wydzielanie się znacznych ilości ciepła podczas polimeryzacji akrylamidu, dla właściwego przebiegu procesu należy przestrzegać odpowiedniego dozowania substancji inicjujących i katalizujących, tak aby czas polimeryzacji nie był krótszy od 30 minut. W szczególnych przypadkach, gdy zawartość akrylamidu przekracza 15%, należy zapewnić efektywne odprowadzanie powstałego ciepła poprzez umieszczenie kasety z polimeryzującym żelem w łaźni wodnej. Gęstość sieciowania oraz rozmiary porów można regulować poprzez odpowiedni dobór stężenia akrylamidu i bisakrylamidu.

Właściwości żelu przyjęto opisywać dwoma parametrami. Najczęściej mówi się o całkowitym (ang. total) stężeniu akrylamidu:

$$T [\%] = ((\text{akrylamid} + \text{bis-akrylamid}) [\text{g}] / \text{objętość} [\text{ml}]) \times 100$$

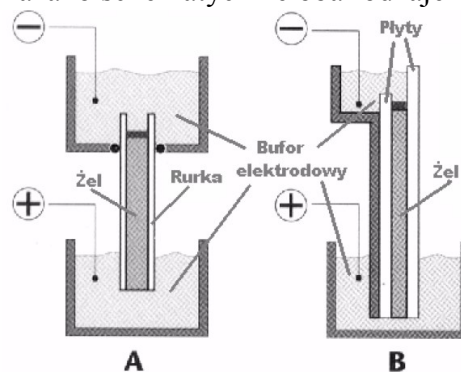
Dopełniającym parametrem jest wagowy stosunek ilości substancji sieciującej do sumy akrylamidu i substancji sieciującej:

$$C [\%] = (\text{bis-akrylamid} [\text{g}] / (\text{akrylamid} + \text{bis-akrylamid}) [\text{g}]) \times 100$$

Ze wzrostem wartości T maleje średni rozmiar porów. Natomiast minimalny rozmiar porów, przy zadanej wartości T, uzyskuje się dla wartości C = 5%. Powyżej i poniżej tej wartości rozmiary porów wzrastają.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym jest wykorzystywana do rozdzielania głównie białek i analizy małych fragmentów DNA.

W elektroforezie poliakrylamidowej najczęściej stosuje się technikę **elektroforezy pionowej**. W technice tej nośnik elektroforetyczny wypełnia szklane rurki (elektroforeza rurkowa) lub znajduje się pomiędzy dwoma płytkami rozdzielonymi przekładkami dystansowymi (ang. spacer) (elektroforeza płytowa). Na poniższym rysunku pokazano schematycznie oba rodzaje elektroforezy pionowej.



**Rys 2.** Schematyczne przedstawienie rodzajów elektroforezy pionowej.

A. elektroforeza rurkowa (ang. tube electrophoresis)

B. elektroforeza płytowa (ang. slab electrophoresis)

Jak łatwo zauważyć, górna część nośnika musi być przykryta warstwą buforu elektrodowego (elektrolitu). Rozwiązanie takie ma naturalną tendencję do wyciekania buforów z górnego naczynia, co wymaga uwagi laboranta podczas trwania rozdzielania. Brak kontaktu elektrolitu z żelem powoduje przerwanie obwodu elektrycznego i w związku z tym przerwanie procesu elektroforezy. Inną niedogodnością tego rozwiązania jest trudność z odprowadzeniem ciepła generowanego przez przepływający prąd. Dotyczy to szczególnie elektroforezy rurkowej. W przypadku elektroforezy płytowej możliwe jest odprowadzanie ciepła przez ściankę kontaktującą się z jedną z płyt. Zaletą tego typu rozwiązania jest zwykle stosunkowo niska cena dostępnych na rynku aparatów.

**Metody elektroforetyczne** stosowane w praktyce są pochodnymi lub kombinacją trzech podstawowych rodzajów separacji. Są to: elektroforeza strefowa (ang. zone electrophoresis), izotachoforeza (ang. isotachphoresis) oraz ogniskowanie izoelektryczne (ang. isoelectric focusing).

Elektroforeza strefowa - podstawowy i najszerzej stosowany rodzaj elektroforezy. Odbywa się w nośniku, w którym elektrolit ma w całej objętości stałą wartość pH. Różnica dystansów migracji poszczególnych makrojonów, w ciągu określonego czasu, w bezpośredni sposób wynika z różnicy w ruchliwości elektroforetycznej tych jonów w nośniku w obecności pola elektrycznego.

Izotachoforeza - w tym rodzaju elektroforezy rozdział odbywa się w nośniku, w którym występuje nieciągłość wartości pH. Makrojonny separowanej próbki migrują w obszarze pomiędzy dwoma systemami elektrolitów o różnej wartości pH i różnej ruchliwości jonów elektrolitu. Elektrolit wiodący (ang. leading electrolyte) zawiera jony o dużej ruchliwości elektroforetycznej, znacznie przewyższającej ruchliwość makrojonów. Z kolei elektrolit zamykający (ang. tailing electrolyte) zawiera jony o bardzo niskiej ruchliwości elektroforetycznej, zwykle znacznie niższej od ruchliwości makrojonów. W obszarze pomiędzy tymi dwoma elektrolitami znajdują się separowane makrojonny. Wszystkie jony - wiodące, zamykające oraz makrojonny - migrują w tym obszarze z tą samą prędkością ale w ściśle określonym porządku. Najpierw przemieszczają się jony wiodące, a za nimi najszybsze makrojonny. Potem kolejno makrojonny zgodnie z ich malejącą ruchliwością i w końcu jony zamykające. Wynikiem tego rodzaju elektroforezy jest uporządkowanie makrojonów zgodnie z ich malejącą ruchliwością elektroforetyczną, przy czym separacja ta zachodzi w bardzo małym obszarze będącym granicą dwóch systemów elektrolitów. Uzyskuje się w ten sposób dodatkowy efekt zagęszczania makrojonów w małej objętości.

### **Elektroforeza poliakrylamidowa DNA.**

Najlepszy rozdział uzyskuje się dla DNA o długości mniejszej niż 1000 par zasad. W żelach tych można efektywnie rozdzielać także jednoniciowe fragmenty DNA i RNA. Elektroforezę w żelach poliakrylamidowych prowadzona jest w aparaturze ustawionej pionowo, a więc migracja cząsteczek DNA jest zgodna z kierunkiem siły ciężenia, gdzie jednoniciowe DNA charakteryzują się spowolnioną, w stosunku do dwuniciowego DNA, migracją w żelu. Rozdział elektroforetyczny prowadzony jest w buforze TBE×1. Jest to odmiana elektroforezy strefowej natywnej. DNA w żelu poliakrylamidowym można wybarwiać za pomocą np. EtBr lub Sybr Gold.

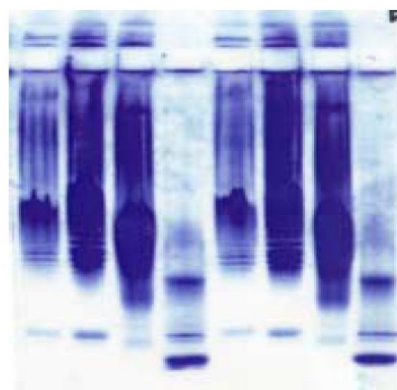
Stężenie poliakrylamidu [%]	Zakres długości rozdzielanego liniowego DNA [kp.z]
3,5	1000-2000
5,0	80-500
8,0	60-400
12,0	40-200
15,0	25-150
20,0	6-100

Żele poliakrylamidowe mają przewagę nad żelami agarozowymi z kilku przyczyn:

- zdolność rozdzielcza żeli poliakrylamidowych jest tak duża, że można rozdzielać cząsteczki DNA różniące się o 1 p.z.
- studzienkę żelu poliakrylamidowego można załadować znacznie większą ilością DNA niż w żelu agarozowym
- DNA odzyskany z żelu poliakrylamidowego jest czysty (nie wymaga dodatkowego czyszczenia przy stosowaniu w biologii molekularnej)

### **Elektroforeza poliakrylamidowa białek.**

**Elektroforeza natywna**, to rodzaj elektroforezy strefowej prowadzony zwykle w poliakrylamidzie w warunkach, w których makrocząsteczki pozostają niezdenaturowane. Zaletą tego typu separacji elektroforetycznej jest możliwość odzyskania cząsteczek białkowych w stanie pełnej aktywności biologicznej. Wadą zaś jest stosunkowo słaba rozdzielczość metody.



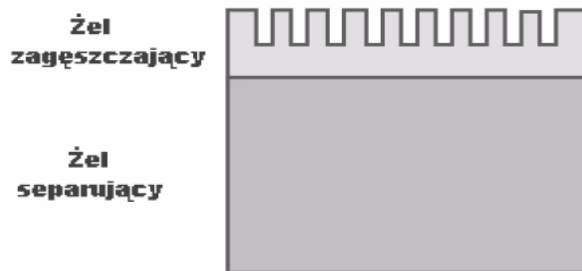
**Rys. 3** Przykład elektroforezy białek w warunkach natywnych. Analizie poddano białka wyekstrahowane z różnych odmian jęczmienia. Separację przeprowadzono w żelu 25S uwodnionym w buforze do natywnej elektroforezy pH 5,0, zawierającym mocznik i niejonowy detergent.

**Elektroforeza w obecności SDS (strefowa)** - ten rodzaj elektroforezy jest najczęściej stosowany dla separacji makromolekuł białkowych. Zastosowanie SDS (siarczan dodecyłu sodu) - substancji powierzchniowo czynnej - przyczynia się do znacznego poprawienia rozdzielczości techniki elektroforetycznej. Potraktowanie cząsteczki białka przez SDS skutkuje powstaniem kompleksów białko-SDS o ustalonym stosunku ładunku elektrycznego do masy. Wykazano, że 1g białka wiąże 1,4g SDS. W kompleksie takim SDS skutecznie maskuje oryginalny ładunek białka normalnie występujący w danym elektrolicie. Właściwość ta pozwala na łatwe i dokładne oznaczenie mas cząsteczkowych rozdzielonych białek. Obecność SDS przynosi szereg korzyści:

- zdecydowana większość białek jest rozpuszczalna w elektrolitach zawierających SDS, szczególnie po redukcji mostków disiarczkowych
- separacja białek odbywa się zgodnie z ich masami cząsteczkowymi
- barwienia kompleksów białko-SDS jest znacznie wydajniejsze niż samego białka
- obecność SDS skutecznie eliminuje enzymatyczną degradację białek w trakcie separacji.

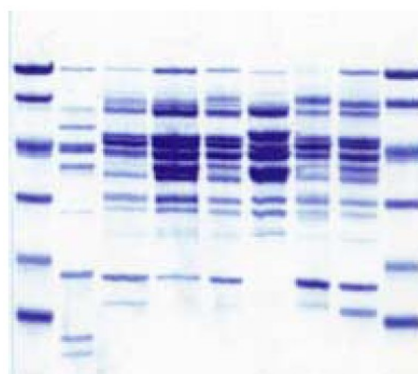
Elektroforeza nieciągła - połączenie izotachoforezy z elektroforezą strefową prowadzi do jeszcze lepszych rezultatów separacji białek. Nośnik elektroforetyczny składa się z dwóch kontaktujących się ze sobą części wypełnionych elektrolitami o różnym składzie i różnej wartości pH (rys. 4) (ang. discontinue electrophoresis or disc-electrophoresis). W górnej części nośnika znajduje się żel zagęszczający, czasami określane jako ogniskujący, (ang. stacking gel), w którym realizuje się izotachoforeza. Uporządkowane i zagęszczone tam cząsteczki białka wchodzi do drugiej części nośnika zwanej żelem separującym (ang. running gel). W tym żelu zachodzi elektroforeza strefowa.

**Rys 4.** Schemat żelu do elektroforezy nieciągłej. Skład elektrolitów i wartość pH obu żeli oraz ich porowatości różnią się.



W wyniku połączenia obu metod uzyskuje się bardzo ostre prążki zawierające białka o tej samej ruchliwości elektroforetycznej, co często jest interpretowane jako białka o tej samej masie cząsteczkowej (rys 5).

**Rys 5.** Przykład elektroforezy w obecności SDS. Analizie poddano białka zwierzęce i ryb ekstrahowane z różnych tkanek. Rozdział wykonano w żelu ExcelGel Homogenous 1. Dwie skrajne ścieżki zawierają standardy mas cząsteczkowych, co pozwala przyporządkować białkom na pozostałych ścieżkach odpowiednie masy cząsteczkowe.



## BARWIENIE I DOKUMENTACJA.

Ukończenie rozdziału elektroforetycznego nie kończy procedury separacji. Większość białek i kwasów nukleinowych nie jest widoczna w świetle białym. Niezbędne jest ich wybarwienie (wizualizacja) w żelach lub na membranach, tak aby uzyskać informację o dystansie ich migracji i ich ilości w prążku

**Barwienie** - stosowanych jest wiele metod wizualizacji żeli i membran. Białka najczęściej wybarwia się stosując naturalne barwniki, takie jak błękit kumassi (ang. Coomassie Brilliant Blue) czy czern amidową. Barwnik dodawany jest zwykle do roztworu utrwalającego po położeniu białka w żelu (denaturacja i unieruchomienie molekuł), po czym nadmiar barwnika jest wmywany. Pozostaje tylko barwnik związany z białkami. Czulość takiej detekcji białek jest stosunkowo dobra. Można w ten sposób znaleźć 1 µg białka w prążku. Znacznie bardziej czułą metodą jest barwienie srebrem. Metoda ta pozwala oznaczyć 10 ng białka w prążku. Przy pomocy srebra można również wybarwić kwasy nukleinowe oraz oligonukleotydy, a czulość detekcji zbliżona jest również do 10 ng DNA na prążek.

**Barwienie fluoroforami** - tradycyjnie oligonukleotydy barwione są przy pomocy bromku etydyny, barwnika wykazującego właściwości fluorescencyjne. Obraz separacji makrocząsteczek może być wtedy uwidoczniiony w świetle UV (około 300 nm). Ten sposób barwienia wymaga dużej ostrożności ze strony laboranta ze względu na silnie karcinogenne właściwości bromku etydyny. Obecnie dostępne są liczne barwniki fluorescencyjne pozwalające na uwidocznienie białek i oligonukleotydów po zakończeniu elektroforezy lub wybarwienie makrocząsteczek przed separacją. Wszystkie te znaczniki uwidaczniają położenie prążków w świetle UV lub rzadziej w świetle widzialnym. Czulość detekcji jest porównywalna z barwieniem srebrem lub jest nieco lepsza.

**Dokumentacja rozdziałów** - najprostszą formą dokumentacji rozdziałów elektroforetycznych wykonanych w żelach poliakrylamidowych jest ich wysuszenie pomiędzy warstwą bibuły i celofanu lub pomiędzy dwoma warstwami celofanu. Wysuszony w ten sposób żel można przechowywać dowolnie długo bez widocznego uszczerbku w jakości tego dokumentu. Żele poliakrylamidowe przygotowane na folii można suszyć bez okrywania celofanem. Trudności

pojawiają się wtedy, gdy trzeba wysuszyć żel o zawartości akrylamidu powyżej 15%. Odwodnienie żelu powoduje silne jego obkurczenie i w rezultacie pękanie. Można temu przeciwdziałać wypierając z żelu wodę glicerolem. Żele takie pozostają jednak nieco lepkie i muszą być okryte folią. Żele agarozowe nie poddają się jednak tej formie dokumentowania. Najprostszym sposobem utrwalenia informacji zawartej w żelu agarozowym jest sporządzenie jego fotografii. Technikę tę można zastosować również do żeli poliakrylamidowych. Od kilku lat do dokumentacji rozdzielów elektroforetycznych stosuje się z powodzeniem kamery cyfrowe, a uzyskany obraz przechowywany jest w formie elektronicznej w pamięci komputera lub na dyskietkach. Kamery cyfrowe pozwalają na uzyskanie i przetworzenie obrazu żeli i membran wizualizowanych barwnie, z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych lub substratów chromogennych.