IZOLACE, SEPARACE A DETEKCE PROTEINŮ
Část II

Michael Jelínek
Jan Šrámek
Pavla Elčknerová

SDS-PAGE

(= sodium dodecylsulphate - polyacrylamide gel electrophoresis)

- metoda pro separaci proteinů dle velikosti (molekulové hmotnosti)

Molekulová hmotnost (velikost) proteinů udávána v daltonech (Da) či kilodaltonech (kDa)

1 kDa = 1000 Da

= 1 Da se přibližně rovná hmotnosti atomu vodíku ($1{,}66 \times 10^{-24}$ g)

Pracovní postup

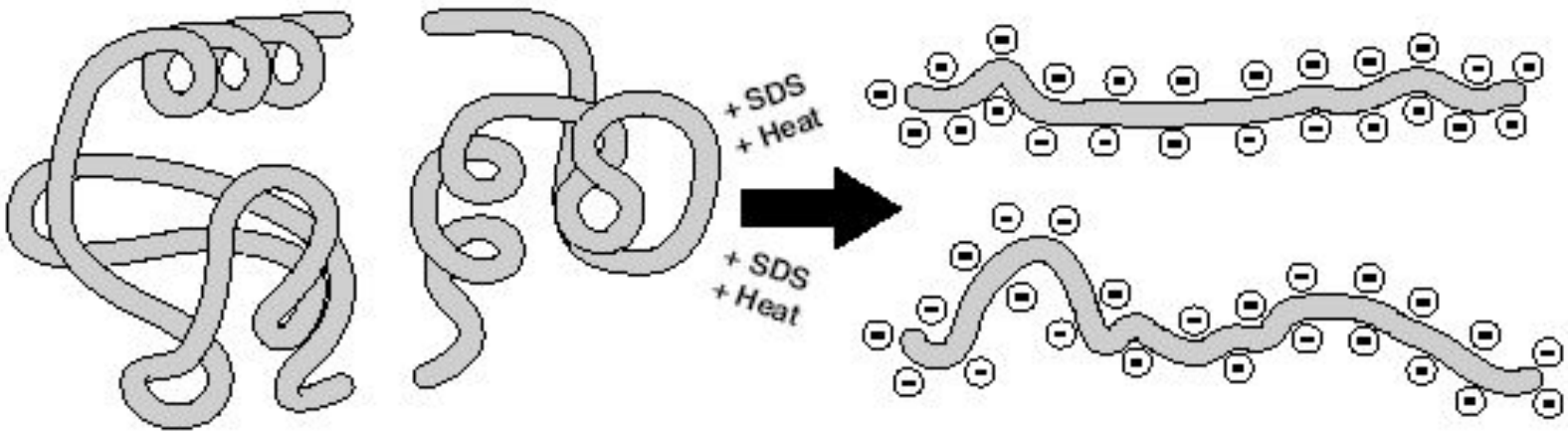
- smíchání proteinových roztoků se vzorkovým pufrem
- povaření vzorků při 95°C
- nanesení vzorků na gel
- separace proteinů - proteinová elektroforéza

- příprava polyakrylamidových gelů pro další studijní kruh

- barvení proteinů v gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue
- odmytí nenavázeného barviva
- analýza gelů

Příprava vzorku pro SDS-PAGE

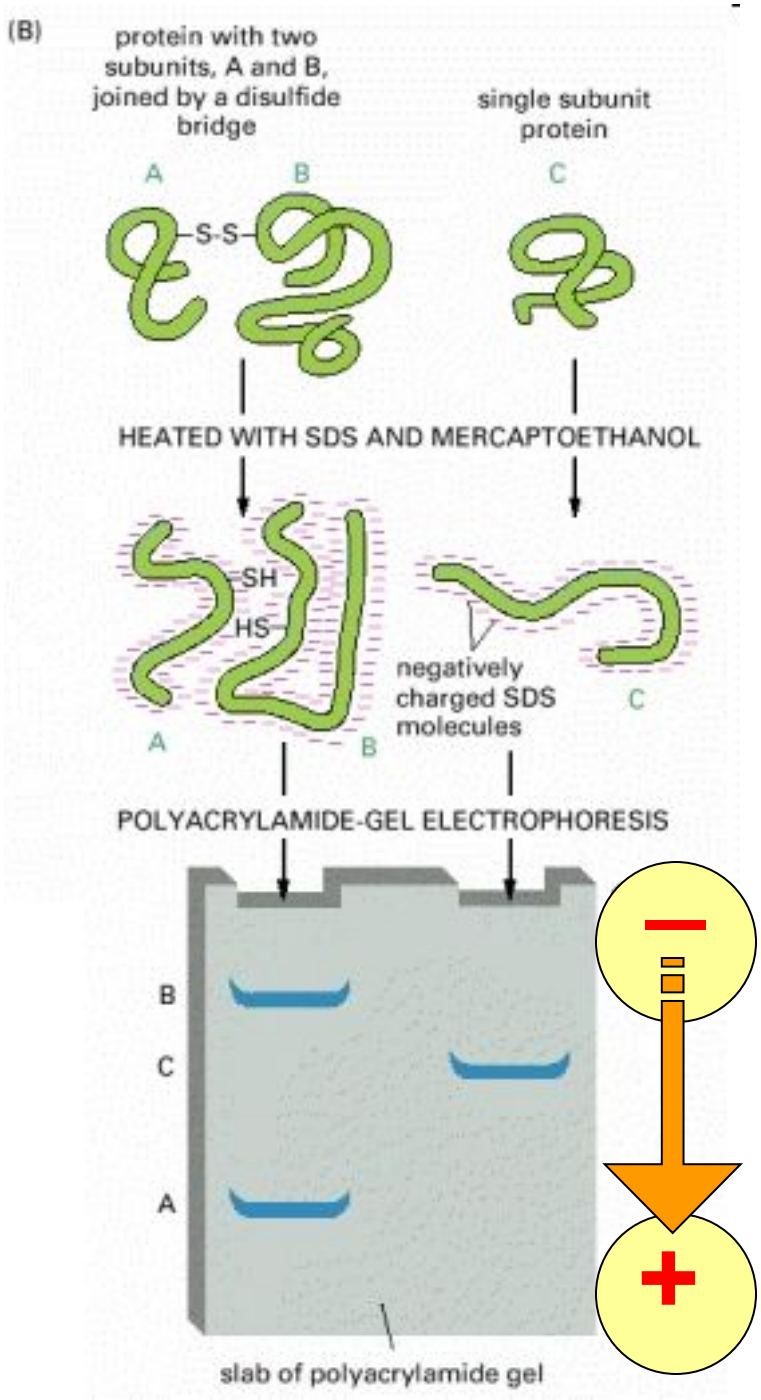
- proteiny je nutné před separací denaturovat
- obvykle působením SDS, merkaptoethanolu a zahřátí (cca 95°C)
- denaturované proteiny mají vláknitý tvar a stejný záporný náboj na jednotku délky proteinu - zachována je tak pouze primární struktura proteinů
- rychlost migrace v gelu závisí pouze na jejich molekulové hmotnosti



Vzorkový pufr pro SDS-PAGE

- **SDS (dodecyl sulfát sodný) - detergent denaturující proteiny a poskytující jim negativní náboj**
- **Merkaptoethanol - redukuje disulfidické můstky**
- **Glycerol - zajišťuje klesnutí vzorku ke dnu jamky v gelu po nanesení**
- **Bromfenolová modř - barvivo umožňující sledovat průběh elektroforézy (pohyb čela v gelu)**

Jak funguje SDS-PAGE?



- **Negativně nabité proteiny se pohybují ke kladné elektrodě (anoda)**
- **Menší proteiny se pohybují rychleji**

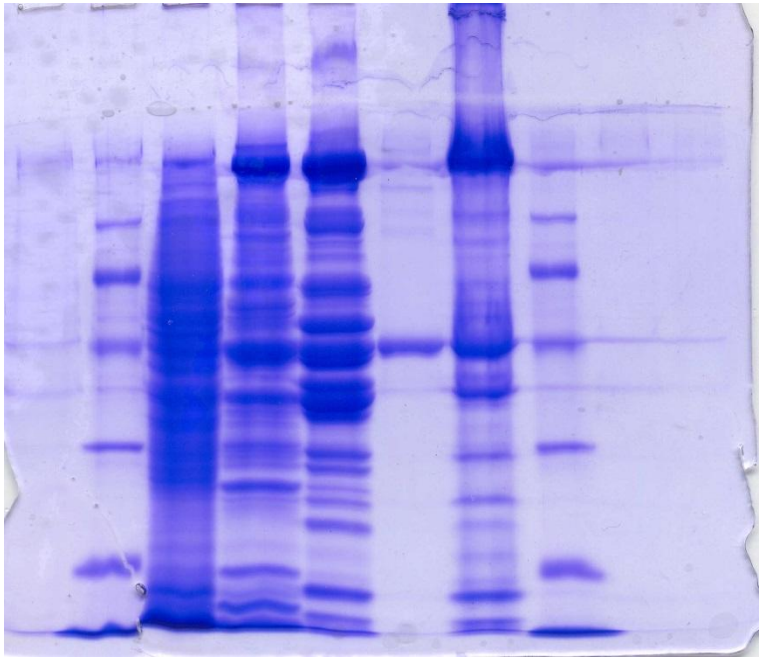
Polyakrylamidové gely

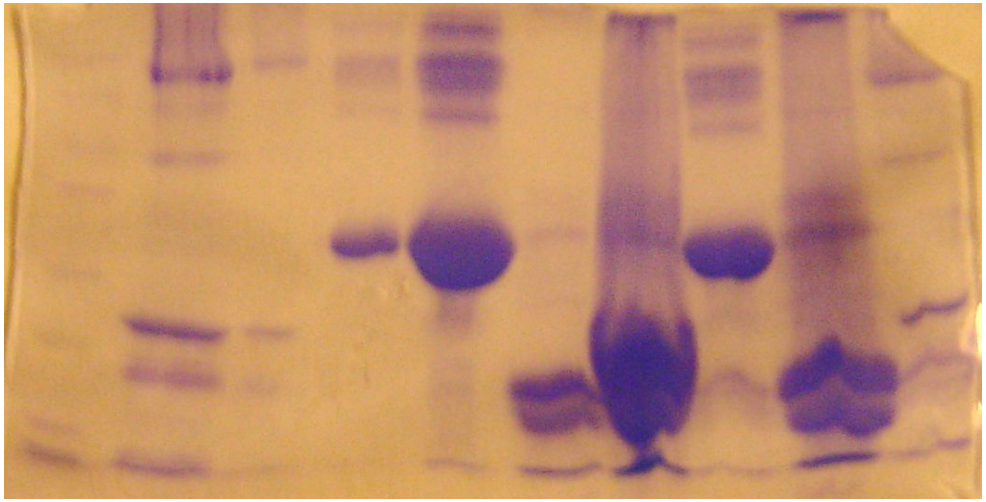
- **gel: porézní 3D síť**
- **⇨ taková velikost pórů v gelu, aby se separované molekuly s různou velikostí pohybovaly rozdílnou rychlostí**
- **proteiny - obvykle polyakrylamidový gel (menší velikost pórů)**

- **vytvořen polymerizací akrylamidu - potřeba volných radikálů vzniklých při rozkladu persíranu amonného (ammonium persulfate = APS) a katalyzátoru TEMED (Tetramethylethylenediamine)**

- **Obvykle se připravují dva gely, zaostřovací a separační**

Separované proteiny jsou poté nespecificky barveny pomocí roztoku Coomassie Briliant blue





Po separaci a detekci proteinů obvykle řešíme jednu ze dvou typických otázek:

Je daný protein v našem vzorku?

Pro zodpovězení potřebujeme vzorek obsahující daný protein (pozitivní kontrolu) a vzorek bez daného proteinu (negativní kontrolu).

Jaká je hladina daného proteinu v našem vzorku?

Pro zodpovězení potřebujeme vzorky obsahující vysokou (pozitivní kontrolu) a nízkou (negativní kontrolu) hladinu proteinu pro srovnání s naším vzorkem.