

Rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi

Wprowadzenie

Charakterystyka białka całkowitego w osoczu krwi pozwala wstępnie określić stan zdrowia pacjenta. Większość białek jest produkowana w wątrobie, dlatego białko całkowite pozwala na wstępną ocenę jej wydolności. Zwiększenie zawartości białka w osoczu jest najczęściej spowodowane pojawianiem się w nadmiernej ilości białek nieprawidłowych, produkowanych np. przez komórki nowotworowe.

Mała zawartość białka całkowitego zazwyczaj związana jest z uszkodzeniem miąższu wątroby, niedoborami pokarmowymi, chorobami nowotworowymi lub nadmierną utratą białka (np. białkomocz). W celu dokładnej oceny ilościowej i jakościowej poszczególnych białek wykonywany jest tzw. proteinogram.

Proteinogram pozwala na wyróżnienie pięciu podstawowych grup białek: albumin, alfa-1 globulin, alfa-2 globulin, beta-1 globulin, beta-2 globulin, gamma globulin. Odchylenia od normy polegają na zmianach ilościowych i udziale procentowym poszczególnych frakcji białek w proteinogramie. Odchylenia te występują w wielu patologich, m.in. stanach zapalnych, chorobach układowych, nowotworach, schorzeniach wątroby i nerek oraz wielu innych jednostkach chorobowych, przyjmując niejednokrotnie obraz charakterystyczny dla danego schorzenia. Podstawową techniką otrzymywania proteinogramu jest elektroforeza żelowa. Technika ta bazuje na zróżnicowanej szybkości wędrówki jonów w stałym polu elektrycznym.

Z chemicznego punktu widzenia, białka są liniowymi sekwencjami aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi (struktura pierwszorzędowa). Przestrzenna struktura białek (drugo-, trzecio-, czwartorzędowa) bywa bardzo skomplikowana i zależy od różnorodnych oddziaływań, takich jak tworzenie wiązań wodorowych, mostków disiarczkowych, asocjacja, oddziaływania warstwowe i inne. Większość białek rozpuszcza się w wodzie, co jest efektem występowania ugrupowań o ładunku dodatnim lub ujemnym (głównie grup amoniowych i karboksylowych). Sumaryczny ładunek biopolimeru zależy od pH roztworu. W pH wyższym niż pI (punkt izoelektryczny) białko ma charakter anionowy, niskie pH (< pI) sprzyja protonizacji grup aminowych i powstają ładunki dodatnie.

Pod wpływem działania pola elektrycznego naładowane cząstki kierują się w stronę elektrod o przeciwnym znaku. Analizowane cząstki są dodatkowo „przesiewane” przez sito molekularne, którym jest matryca żelowa. Dzięki wykorzystaniu tych zjawisk cząsteczki o różnym ładunku i wielkości można rozdzielić na poszczególne frakcje.

Cel ćwiczenia:

Zapoznanie się z techniką elektroforezy żelowej, przeprowadzenie rozdzielania elektroforetycznego mieszaniny białek i otrzymanie tzw. proteinogramu.

Sprzęt i materiały:

- Komora do rozdzielania elektroforetycznego wraz z zasilaczem „mini GES Cell complete system” firmy WEALTEC,
- Zestaw diagnostyczny do rozdzielania elektroforetycznego białek surowicy na agarozie *Cormay gel protein100*-skład:
 - Płytki z agarozą: gotowe do użycia,
 - Rozcieńczony bufor weronalowy - Tris-BARBITAL,
 - Rozcieńczony barwnik - czerń amidowa,
 - Rozcieńczony odbarwiacz,
 - Utrwalacz (135 ml alkoholu etylowego 96 %, 30 ml kwasu octowego lodowatego, 135 ml wody destylowanej),
 - Paski bibuły,
 - Folia do nanoszenia próbek,
- Surowica krwi ludzkiej,
- Wzorcowy roztwór albuminy z surowicy bydłowej o stężeniu 1.5 mg/ml,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- Zlewka o poj. 150 ml,
- 5 Szalek Petriego,
- 2 Cylindry miarowe: 100ml, 50ml,
- Pinceta.

Wykonanie ćwiczenia

1. Rozcieńczyć 7-krotnie 5µl surowicy krwi roboczym roztworem buforu.
2. Zdjąć pokrywę komory elektroforetycznej i włączyć max. 250 ml rozcieńczonego buforu weronalowego.
3. Delikatnie wyjąć płytkę z opakowania (nie dotykać powierzchni żelu!) i położyć na bibule. Aby uniknąć przesuszenia żelu i związanych z tym problemów analitycznych zaleca się otwierać opakowanie foliowe bezpośrednio przed naniesieniem próbek na płytkę, kiedy komora jest już przygotowana do pracy, a surowice odpowiednio rozcieńczone.
4. Osuszyć miejsce nałożenia próbek przez przyłożenie paska bibuły. Wilgotną bibułę natychmiast delikatnie usunąć.
5. W osuszonym miejscu umieścić folię do nanoszenia próbek delikatnie przyciskając ją do podłoża przez przesunięcie po niej palcem. Folia musi dokładnie przylegać do żelu!
6. Nałożyć 5 µl próbki - rozcieńczonej surowicy, wzorcowego roztworu albuminy i dwóch nieznanymi białek - na każde wycięcie folii. Pozostawić na 5 minut od momentu naniesienia ostatniej próbki.
7. Usunąć nadmiar surowicy przez przyłożenie paska bibuły.
8. Zdjąć delikatnie bibułę i folię.
9. Płytkę z agarozą i umieścić w komorze tak, aby żel był skierowany do dołu, a miejsca naniesienia surowic znajdowały się od strony katody (-).
10. Zamknąć komorę pokrywą.
11. Prowadzić elektroforezę przez 45 minut przy napięciu 120V.
12. Po zakończeniu elektroforezy wyłączyć zasilacz i odłączyć przewody elektryczne. Wyjąć płytkę i zanurzyć ją w **pozycji pionowej** na 15 minut w utrwalaczu.
13. Suszyć płytkę w strumieniu gorącego powietrza lub w suszarce w temp. do 80°C do zupełnego wyschnięcia.
14. Zanurzyć płytkę w 20 ml barwnika (szalka Petry'ego) na 10 minut, a następnie odbarwiać 3-krotnie w kolejnych kąpielach odbarwiacza (3x20 ml na szalkach Petry'ego).
15. Odbarwioną płytkę wypłukać w wodzie destylowanej i wysuszyć.

Opracowaniw wyników:

1. Sfotografować pasma widoczne na żelu i zinterpretować uzyskane proteinogramy.

Literatura uzupełniająca:

1. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.