

Κεφάλαιο 2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Σύνοψη – Περίληψη

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου αποτελεί ευρύτατα διαδεδομένη μέθοδο, μέθοδο εκλογής θα λέγαμε, για τον διαχωρισμό διαφορετικών πρωτεϊνών που συνυπάρχουν σε ένα δείγμα και επίσης για τον έλεγχο της καθαρότητας πρωτεϊνικών δειγμάτων και την ανίχνευση ανεπιθύμητων προσμίξεων. Επιπλέον, η διαδικασία αποτελεί ουσιαστικό προπαρασκευαστικό στάδιο κατά την περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών, όπως κατά την ανοσοχημική τους ταυτοποίηση με ανοσοαποτύπωση. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί ο διαχωρισμός των μορίων ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο τους ή συνδυασμό των παραμέτρων κατά τη μετακίνησή τους εντός ομογενούς ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφόρηση τις περισσότερες φορές εξελίσσεται σε υδατικό διάλυμα που υποστηρίζεται από σύστημα πηκτής το οποίο διασφαλίζει την οριοθέτηση των ζωνών μετακίνησης διαφορετικών μορίων, αλλά και τα όρια μεταξύ των μορίων και του ρυθμιστικού διαλύματος. Η περισσότερο διαδεδομένη παραλλαγή της μεθόδου είναι με τη χρήση του δωδεκυλοθειικού νατρίου σε αποδιατακτικές συνθήκες, όπου είναι δυνατός ο προσδιορισμός των μοριακών μαζών των επιμέρους πρωτεϊνικών υπομονάδων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση τη μοριακή τους μάζα. Η πηκτή βαθμίδωσης ακρυλαμιδίου πλεονεκτεί έναντι της ομοιογενούς πηκτής, καθώς επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών ευρύτερης κλίμακας μοριακών μαζών. Η μη αποδιατακτική πηκτή ηλεκτροφόρησης διαχωρίζει πρωτεΐνες βάσει τόσο του μεγέθους, όσο και του ηλεκτρικού τους φορτίου. Έτσι, ενώ το μέγεθος των πόρων του ακρυλαμιδίου λειτουργεί ως ένα φυσικό κόσκινο, διαχωρίζοντας τα διαφορετικού μεγέθους μόρια, ταυτόχρονα, πρωτεΐνες που είναι περισσότερο φορτισμένες, στην τιμή pH της πηκτής διαχωρισμού εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα. Παραλλαγή του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού αποτελεί και η ισοηλεκτρική εστίαση, κατά την οποία ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στηρίζεται στις διαφορές στα ισοηλεκτρικά τους σημεία. Στην ισοηλεκτρική εστίαση, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των πρωτεϊνών, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε πηκτή διαβαθμιζόμενης τιμής pH. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να φτάσει σε ένα σημείο στην πηκτή, όπου η τιμή pH γίνεται ίση με το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση σε δυο διαστάσεις είναι πολύ σημαντική στην περίπτωση που απαιτείται ανάλυση και διαχωρισμός σε ιδιαίτερος πολύπλοκα μείγματα. Η τεχνική αυτή συνίσταται στον συνδυασμό της τυπικής ηλεκτροφόρησης σε πηκτή υπό αποδιατακτικές συνθήκες, με τη χρήση του δωδεκυλοθειικού νατρίου, με την ισοηλεκτρική εστίαση.

Προαπαιτούμενη γνώση

Για την καλύτερη κατανόηση των πρωτοκόλλων που ακολουθούν θα πρέπει ο εκπαιδευόμενος να γνωρίζει βασικά θέματα βιοχημείας που αφορούν στη δομή των πρωτεϊνών. Προτείνεται το σύγγραμμα: Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005, κεφ. 3, 4. Επίσης, χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τεχνικά θέματα που αφορούν στην ηλεκτροφόρηση μπορούν να αναζητηθούν στο «A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Bio-Rad», στον ιστότοπο: www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040A.pdf.

Σημειώσεις ασφάλειας

- **Ακρυλαμίδιο:** Εξαιρετικά τοξικό, προκαλεί παράλυση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ενέχεται σε καρκινογένεση και τερατογένεση. Μπορεί να απορροφηθεί μέσα από άθικτο δέρμα. Εάν το δέρμα έρθει σε επαφή με σκόνη ακρυλαμιδίου ή διάλυμα, πλύνετε με σαπούνι και άφθονο νερό. Το μη πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο πρέπει να πολυμερίζεται με περίσσεια καταλύτη και να εξαφανίζεται με στερεά απόβλητα (Merck Index and BioRad Bulletin 1156).
- **Ammonium Persulfate:** Εξαφανίστε διαλύοντας με νερό (BioRad Bulletin 1156).
- **TEMED:** Αποθηκεύστε παγωμένο σε σκούρο μπουκάλι. Έχει αναφερθεί σημαντική μείωση της δραστηριότητας μετά από 10 – 12 μήνες (BioRad Bulletin 1156), αν και έχουν επιτευχθεί καλά αποτελέσματα με διαλύματα που είναι αποθηκευμένα πολύ περισσότερο καιρό.
- **Νιτρικός Αργυρός:** Δηλητηριώδης και ερεθιστικός για το δέρμα (Merck Index).

- **Φορμαλδεΐδη:** Οι ατμοί είναι πολύ ερεθιστικοί. Αποθηκεύστε καλά κλεισμένο τον περιέκτη σε ένα μέτρια ζεστό περιβάλλον (Merck Index).

2.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής σε αποδιατακτικές συνθήκες

2.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης παρουσία δωδεκυλο-θεικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

2.1.1.1 Εισαγωγή

Η SDS-PAGE αποτελεί μια ταχεία, χαμηλού κόστους και ικανοποιητικά ακριβή μέθοδο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που τίθενται προς ανάλυση βασίζεται στη μοριακή τους μάζα (Laemmli, 1970). Το SDS προσδένεται στα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης, διαλύοντας την τριτοταγή της δομή, ώστε διατηρείται στο διάλυμα της σε διαμόρφωση χαμηλότερης οργάνωσης. Το σύμπλεγμα του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη, αποκτά σημαντικό αρνητικό φορτίο, που είναι ανάλογο με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, ενώ το φορτίο της αρχικής φυσικής δομής καθίσταται αμελητέο. Ως αποτέλεσμα, η μοριακή μάζα του συμπλόκου SDS-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με το μέγεθος και κατ' επέκταση με το μήκος της αλυσίδας. Η ευκολία της εκτέλεσης και η ευρεία εφαρμογή του SDS-PAGE το έχουν κάνει μια σημαντική αναλυτική τεχνική για πολλά πεδία της έρευνας.

Τα πρωτόκολλα που συζητούνται ακολούθως αναφέρονται σε πηκτές σε σχήμα πλακών που δημιουργούνται μεταξύ δύο υποστηρικτικών φύλλων γυαλιού (Linear Slab Gels). Οι πηκτές σε σχήμα πλακών χρησιμοποιούνται ευρύτερα συγκριτικά με τις σωληνοειδείς πηκτές (που σχηματίζονται με υποστηρικτικά γυάλινων σωληνών), αφού πολλά δείγματα μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα στο ίδιο πήγμα, διασφαλίζοντας σταθερές και κοινές συνθήκες επεξεργασίας, σε όλα τα στάδια της ανάλυσης, όπως ο χρωματισμός και ο αποχρωματισμός της πηκτής. Στα ερευνητικά εργαστήρια, σε αναλύσεις ρουτίνας, εφαρμόζονται μίνι πηκτές, οι οποίες απαιτούν ελάχιστα υλικά και λίγο χρόνο, εξασφαλίζοντας παράλληλα αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται ακολούθως και τα αντιδραστήρια σε αυτές έχουν υπολογιστεί με δεδομένη τη χρήση συστήματος μίνι πηκτής, διατηρώντας όμως την ευελιξία προσαρμογής και σε διαφορετικά αναλυτικά συστήματα πηκτών. Σε σωρεία βασικών αναλύσεων βρίσκουν εφαρμογή οι πηκτές βαθμιδωτής συγκέντρωσης. Προσχηματισμένες ομογενείς, αλλά και βαθμιδωτής συγκέντρωσης πηκτές, διατίθενται στο εμπόριο (Novex, ISS, Pharmacia, Bio-Rad).

Μεταξύ των ποικίλων χρήσεων της παραπάνω αναλυτικής τεχνικής περιλαμβάνονται:

- Διερεύνηση της καθαρότητας ορισμένης πρωτεΐνης.
- Καθορισμός του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης.
- Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης στο δείγμα ή και επαλήθευση της ήδη γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.
- Διερεύνηση της ύπαρξης πρωτεολυτικής δραστηριότητας.
- Αναγνώριση των ανοσοκαταβυθιζόμενων πρωτεϊνών.
- Απαραίτητη και προαπαιτούμενη διεργασία κατά την ανοσοαποτύπωση.
- Αναζήτηση πιθανών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων (π.χ. μεθυλίωση).
- Διαχωρισμός και συμπίκνωση πρωτεϊνικών αντιγόνων για την παραγωγή αντισωμάτων.
- Διαχωρισμός των ραδιενεργά προσδιορισμένων πρωτεϊνών.

Ευαισθησία χρώσης

- Coomassie Blue: 0,1 - 1 μg πρωτεΐνης ανά ζώνη (Smith, 1984)
- Χρωστική Αργύρου: 2 - 10 ng πρωτεΐνης ανά ζώνη (Giulian *et. al.*, 1983)

Καταλληλότερες κλίμακες ανάλυσης (Optimal Resolution Ranges) (adapted from Hames, 1981)

(%) συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης αναλυτική ικανότητα

15% Gel	15 με 45 kDa
12,5% Gel	15 με 60 kDa
10% Gel	18 με 75 kDa
7,5% Gel	30 με 120 kDa
5% Gel	60 με 212 kDa

Απαιτούμενος χρόνος (ενδεικτικά)

- Προετοιμασία πηκτής διαχωρισμού: 60 λεπτά.
- Προετοιμασία πηκτής επιστοίβασης: 30 λεπτά.
- Φόρτωση (τοποθέτηση) δειγμάτων: 15 λεπτά.
- Ηλεκτροφόρηση: 45 λεπτά.
- Χρωματισμός: Coomassie Staining (30 λεπτά), Χρωστική αργύρου (3 ώρες).

2.1.1.2 Εξοπλισμός

- Συσκευή μίνι πηκτής. Τα συστήματα μίνι πηκτής προτιμώνται λόγω της οικονομίας που εξασφαλίζουν σε αναλώσιμα υλικά και χρόνο και επιπροσθέτως επειδή παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα.
- Τροφοδοτικό ρεύματος συνεχούς τάσης (200 V, 500 mA).
- Συσκευή ζέοντος ύδατος (υδατόλουτρο, hot bath) ή θερμή πλάκα (hot plate) ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας.
- Συσκευή φυγοκέντρησης μικροσωλήνων τύπου Eppendorf (προαιρετικά).
- Σύριγγες τύπου Hamilton ή μιας χρήσης ακροφύσια μικροπιπέτας τύπου Gilson, για τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή.
- Στεγνωτήρας πηκτής και αντλία κενού ή αντλία νερού (προαιρετικά).
- Μικρό γυάλινο ή πλαστικό δοχείο με καπάκι (π.χ. 12 × 16 × 3 εκ.).
- Σωλήνες Eppendorf.
- Μαγνητικός αναδευτήρας.

2.1.1.3 Μορφοποιώντας - πακετάροντας μια πηκτή

Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδιο, κατάλληλης καθαρότητας (biochemical grade)
- Δις-ακρυλαμίδιο (*N,N'*-μεθυλεν-δισακρυλαμίδιο)
- Tris (2-hydroxymethyl-2methyl-1,3-propanediol)
- SDS (sodium dodecyl sulfate or sodium lauryl sulfate)
- TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylene-ethylenediamine)
- Ammonium persulfate
- 2-μερκαπτοαιθανόλη
- Γλυκερόλη
- Μπλε της βρωμοφαινόλης
- Γλυκίνη
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl)
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT)

Προπαρασκευασμένα μητρικά διαλύματα (stock buffers)

2 M Tris-HCl (pH 8,8), 100 ml

- Ζυγίζουμε 24,2 g Tris base.

- Προσθέτουμε 50 ml απεσταγμένο νερό.
- Προσθέτουμε αργά πυκνό HCl μέχρι τιμής pH 8,8 (~4 ml).
- Αφήνουμε το διάλυμα να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, το pH θα αυξηθεί.
- Προσθέτουμε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

1 M Tris-HCl (pH 6,8), 100 ml

- Ζυγίζουμε 12,1 g Tris base.
- Προσθέτουμε 50 ml απεσταγμένο νερό.
- Προσθέτουμε αργά πυκνό HCl μέχρι τιμής pH 6,8 (~8 ml).
- Αφήνουμε το διάλυμα να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, το pH θα αυξηθεί.
- Προσθέτουμε απεσταγμένο νερό έως τελικό όγκο 100 ml.

10% SDS (w/v), 100 ml, αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου

- Ζυγίζουμε 10 g SDS.
- Προσθέτουμε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml.

50% Γλυκερόλη (v/v), 100 ml

- Ογκομετρούμε 50 ml 100% γλυκερόλης.
- Προσθέτουμε 50 ml απεσταγμένου νερού.

1% Μπλε της βρωμοφαινόλης (w/v), 10 ml

- Ζυγίζουμε 100 mg χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.
- Προστίθεται υπό ανάδευση απεσταγμένο νερό, μέχρι διαλύσεως της ουσίας και έως τελικό όγκο 10 ml. Με διήθηση απομακρύνεται η τυχόν αδιάλυτη χρωστική.

Διαλύματα εργασίας (working buffers)

Διάλυμα Α (Αποθηκευμένο διάλυμα ακρυλαμίδιου), 100 ml

- 30% (w/v) ακρυλαμίδιο, (29,2 g ακρυλαμίδιο)
- 0,8% (w/v) δισ-ακρυλαμίδιο (0,8 g δισ - ακρυλαμίδιο)

Προσθέτουμε απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 100 ml και αναδεύουμε μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης των ουσιών. Εργαζόμαστε με καλυμμένο το κεφάλι και κρατούμε το διάλυμα του ακρυλαμίδιου καλυμμένο με διαφανή μεμβράνη μέχρι η σκόνη του ακρυλαμίδιου να διαλυθεί εντελώς. Μπορεί να αποθηκευτεί για μήνες στο ψυγείο. **Προσοχή:** Το μη πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο ερεθίζει το δέρμα και είναι νευροτοξικό. Να χρησιμοποιείτε πάντοτε γάντια.

Διάλυμα Β (4× Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού), 100 ml

- 75 ml 2 M Tris - HCl pH 8,8
- 4 ml 10% SDS
- 21 ml H₂O

Σταθερό για μήνες στο ψυγείο.

Διάλυμα Γ (4× Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής επιστοίβασης), 100 ml

- 50 ml 1 M Tris - HCl pH 6,8
- 4 ml 10% SDS
- 46 ml H₂O

Διατηρείται αναλλοίωτο για μήνες στο ψυγείο.

10% ammonium persulfate, 5 ml

- 0,5 g ammonium persulfate
- 5 ml H₂O

Σταθερό για μήνες σε έναν καλυμμένο σωλήνα στο ψυγείο.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή διάλυμα ηλεκτροδίων (Running buffer), 1 λίτρο

- 3 g Tris (25 mM)
- 14,4 g γλυκίνης (192 mM)
- 1 g SDS (0.1%)
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρις όγκου 1 λίτρου.

Το pH του διαλύματος είναι περίπου 8,3. Σταθερό επ' αόριστο σε θερμοκρασία δωματίου. Μπορεί επίσης να παρασκευαστεί ένα μητρικό διάλυμα 10πλάσιας συγκέντρωσης (10 × stock buffer).

Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 5 ×, 10 ml

- 0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) (60 mM)
- 5 ml 50% γλυκερόλης (25%)
- 2 ml 10% SDS (2%)
- 0,5 ml 2-mercaptoethanol (14,4 mM)
- 1 ml 1% μπλε της βρωμοφαινόλης (0,1%)
- 0,9 ml H₂O

Διατηρείται αναλλοίωτο για εβδομάδες στο ψυγείο ή για μήνες στους -20 °C.

Όγκοι διαλυμάτων εργασίας σε συνήθη χρήση

Απαιτούμενοι όγκοι για πηκτές γέλης (ημίρρευστες πηκτές) διαφορετικής πυκνότητας (οι όγκοι αναφέρονται στην παρασκευή δύο πηκτών, διαστάσεων 6 εκ. × 8 εκ.).

Πάχος πηκτής	Πηκτή διαχωρισμού	Πηκτή επιστοιίβασης
0,5 mM	5,6 ml	1,4 ml
0,75 mM	8,4 ml	2,1 ml
1,0 mM	11,2 ml	2,8 ml
1,5 mM	16,8 ml	4,2 ml

Η διαχωριστική ικανότητα της πηκτής διαχωρισμού καθορίζεται από την πυκνότητά της, που απορρέει από την ποσότητα ακρυλαμίδης ή καλύτερα από την αναλογία ακρυλαμίδης - δισ-ακρυλαμίδης.

Υπολογισμός για (X%) πηκτή διαχωρισμού

Διάλυμα A	x/3 ml
Διάλυμα B	2,5 ml
H ₂ O	(7,5 - x/3) ml
10% Ammonium Persulfate	50 μl
TEMED	5 μl (10 μl εάν x < 8%)
Συνολικός όγκος	10 ml

Χρήσιμη πληροφορία: Μην ετοιμάσετε διάλυμα πριν διαβάσετε τις οδηγίες που ακολουθούν στην επόμενη ενότητα, «μεταγγίζοντας» την πηκτή διαχωρισμού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Μεταγγίζοντας την πηκτή διαχωρισμού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

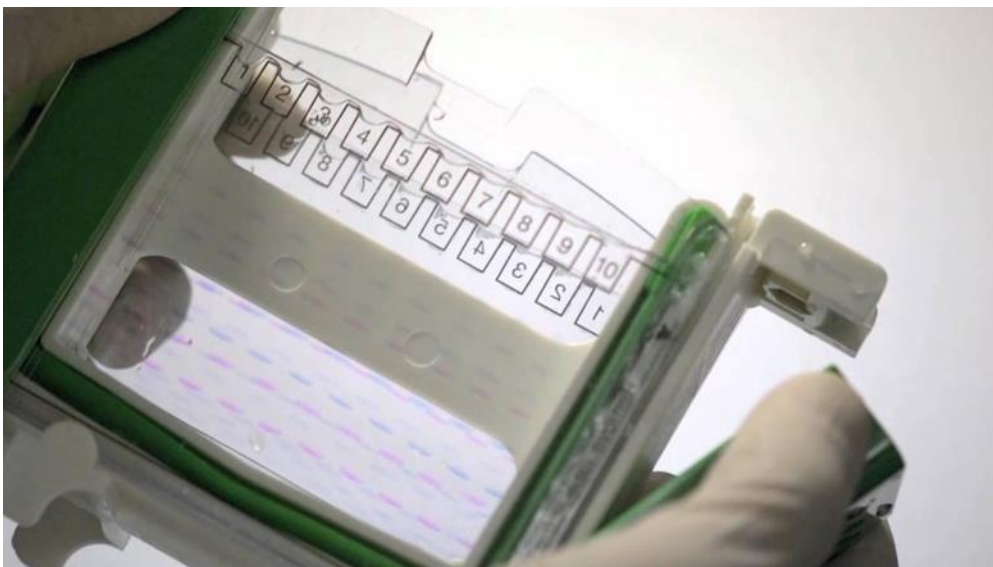
- *Παράδειγμα προετοιμασίας πηκτής διαχωρισμού*

Παρασκευή πηκτών διαχωρισμού, 8% (για δύο πηκτές 6 εκ. × 8 εκ. × 0,75 mM, απαιτούνται 10 ml διαλύματος).

2,7 ml Διαλύματος A
2,5 ml Διαλύματος B
4,8 ml H ₂ O
<hr/>
50 μl 10% Ammonium Persulfate
5 μl TEMED

Χρήσιμη πληροφορία: Μην το ετοιμάσετε πριν διαβάσετε τις αριθμημένες οδηγίες που ακολουθούν.

1. Συναρμολογείτε το «σάντουιτς» της πηκτής σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, στην περίπτωση συσκευής του εμπορίου (π.χ., Bio-Rad mini-Gel), ή σύμφωνα με συγκεκριμένες οδηγίες στην περίπτωση αυτοσχέδιου συναρμολογούμενου συστήματος. Για το mini-Gel, σιγουρευτείτε ότι η βάση των δύο πλακών του πήγματος (gel plates) και τα στοιχεία δημιουργίας ενδιάμεσου κενού (spacers) εφάπτονται τέλεια στην κάτω επιφάνεια (βάση) της συσκευής, πριν τεντώσετε τον σφικτήρα (Εικ. 2.1). Ημιτελής ή λανθασμένη ευθυγράμμιση θα οδηγήσει σε διαρροή υλικού διαμέσου των θέσεων επαφής, πριν τη στερεοποίηση της γέλης (πηκτής).



Εικόνα 2.1 Το «σάντουιτς» της πηκτής όπου φαίνονται οι θέσεις σχηματισμού των φρεατιδίων φόρτωσης του δείγματος.

2. Συνδυάστε τα διαλύματα Α και Β με νερό σε μικρή κωνική φιάλη ή σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα. Λόγω της τοξικότητας του ακρυλαμιδίου (στο Διάλυμα Α), απαιτείται η χρήση προστατευτικών γαντιών σε όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας.
3. Προσθέστε ammonium persulfate και TEMED (καταλύτες του πολυμερισμού) και ομογενοποιήστε με ήπια ανάδευση (υπερβολικός αερισμός πιθανόν να οδηγήσει σε πρόωρο πολυμερισμό και ανεπιθύμητη πήξη). Σε αυτό το σημείο απαιτείται ακρίβεια κινήσεων και ταχύτητα, γιατί ο πολυμερισμός θα έχει ξεκινήσει.
4. Εισάγετε προσεκτικά το διάλυμα μέσα στο «σάντουιτς» μορφοποίησης της πηκτής χρησιμοποιώντας μια πιπέτα. Ρίξτε σταγόνες του διαλύματος με την πιπέτα έτσι ώστε να βυθιστεί κατά μήκος του spacer. Αυτό ελαχιστοποιεί την πιθανότητα να παγιδευτούν μέσα στο πήγμα φυσαλίδες αέρα, γεγονός που θα δυσχέραινε τη μετακίνηση των μορίων κατά τον διαχωρισμό τους.
5. Όταν ο κατάλληλος όγκος του διαλύματος της πηκτής διαχωρισμού έχει προστεθεί (στην περίπτωση του mini-Gel, περίπου 1,5 εκ. από την κορυφή του μπροστινού πλακιδίου ή 0,5 εκ. κάτω από το επίπεδο όπου τα «δόντια» της «χτένας» θα φτάσουν), τοποθετείται με προσοχή λεπτό στρώμα νερού, ύψους περίπου 1-5 mm, στην κορυφή του διαλύματος της πηκτής διαχωρισμού, ώστε να ομαλοποιηθεί η άνω επιφάνεια της πηκτής. Η εξομάλυνση διασφαλίζει την άριστη επαφή μεταξύ της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοιβάσης.
6. Αφήστε την πηκτή να πολυμεριστεί (30 - 60 λεπτά).
7. Όταν η πηκτή έχει πολυμεριστεί, θα εμφανιστεί μια ευδιάκριτη ζώνη μεταξύ της πηκτής διαχωρισμού και του νερού, και το καλούπι του πήγματος μπορεί να κλιθεί (tilted) για να επαληθεύσει τον πολυμερισμό. Είναι καλή ιδέα να πάρουμε λίγο από το αχρησιμοποίητο διάλυμα πηκτής διαχωρισμού σε μια πιπέτα Pasteur, αμέσως αφού μεταγγίσουμε το διάλυμα. Αυτό λει-

τουργεί ως δείκτης προόδου του πολυμερισμού. Οι πηκτές διαχωρισμού μπορούν να αποθηκευτούν μέχρι μια εβδομάδα στους 4 °C. Αφαιρέστε το νερό, με απόχυση, αντικαταστήστε με Διάλυμα Β, αραιωμένο 1:3, και καλύψτε με πλαστικό κάλυμμα, προς αποθήκευση.

Μεταγγίζοντας την πηκτική επιστοιβάση στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

- *Παράδειγμα προετοιμασίας πηκτής επιστοιβάσης*

Παρασκευή πηκτών επιστοιβάσης 5% (για την παρασκευή 2 πηκτών διαστάσεων 6 εκ. × 8 εκ. × 0,75 mM, απαιτούνται 4 ml).

2,3 ml H ₂ O
0,67 ml Διαλύματος Α
1,0 ml Διαλύματος Γ
<hr/>
30 μl 10% Ammonium Persulfate
5 μl TEMED

Χρήσιμη πληροφορία: Μην το ετοιμάσετε πριν διαβάσετε τις αριθμημένες οδηγίες που ακολουθούν.

1. Απομακρύνετε τυχόν υπολείμματα νερού ή διαλύματος διατήρησης από την επιφάνεια της πηκτικής διαχωρισμού. Οι μικρές σταγόνες που ίσως παραμένουν δεν παρεμποδίζουν την ένωση με την πηκτική επιστοιβάση.
2. Συνδυάστε τα διαλύματα Α και Γ με νερό σε μια μικρή κωνική φιάλη ή σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Προσθέστε ammonium persulfate και TEMED και αναμειξτε με απαλούς στροβίλους ή αντιστρέφοντας το δοχείο, γενικά με ήπιο τρόπο.
4. Μεταφέρετε με πιπέτα το διάλυμα της πηκτικής επιστοιβάσης πάνω στην πηκτική διαχωρισμού μέχρι το διάλυμα να φτάσει στην κορυφή του μπροστινού πλακιδίου.
5. Εισάγετε προσεκτικά τη «χτένα» μέσα στο «σάντουιτς» της πηκτής μέχρι οι άνω άκρες από τα «δόντια» να φτάσουν στην κορυφή του μπροστινού πλακιδίου. Βεβαιωθείτε ότι δεν έχουν παγιδευτεί φυσαλίδες αέρα στις άκρες των «δοντιών». Γέροντας τη «χτένα» θα αποφύγετε την παγίδευση φυσαλίδων, οι οποίες μπορεί και να απομακρυνθούν με πολύ προσεκτική ανακίνηση της κτένας, κατά τη μετάγγιση του διαλύματος επιστοιβάσης.
6. Αφήστε την πηκτική επιστοιβάση να πολυμεριστεί (περίπου 30 λεπτά).
7. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, αφαιρέστε τη «χτένα» προσεκτικά, ώστε να μην αλλοιωθούν τα πηγαδάκια τοποθέτησης δείγματος.
8. Τοποθετήστε την πλήρη πηκτική μέσα στο δοχείο εκτέλεσης της ηλεκτροφόρησης (tank). Εάν χρησιμοποιείτε το mini-Gel, συναρμολογήστε και τις δύο πλήρεις πηκτές στο ηλεκτρόδιο, πριν την τοποθέτησή τους στο δοχείο εκτέλεσης του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού.
9. Προσθέστε το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (running buffer) στην εσωτερική και εξωτερική δεξαμενή, διασφαλίζοντας ότι και οι δύο άκρες κάθε πηκτής είναι βυθισμένες στο ρυθμιστικό διάλυμα.
10. Ελέγξτε τα φρεάτια ή πηγαδάκια για παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα και για την ύπαρξη μη άρτιων δομών. Μικρές διορθώσεις στη δομή των φρεατίων μπορούν να γίνουν με τη χρήση μιας σύριγγας Hamilton. Οι φυσαλίδες του αέρα που είναι προσκολλημένες στον βυθό του δοχείου πρέπει να απομακρυνθούν, διότι παρεμποδίζουν την ομαλή εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου. Είναι επίσης απαραίτητο πριν τη φόρτωση του δείγματος, να ξεπλύνουμε τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για να απομακρυνθεί το μη πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο και κάθε υλικό που μπορεί να παρεμποδίσει την ομαλή προσθήκη των δειγμάτων.

Παρατηρήσεις

1. Τα διαλύματα των αντιδραστηρίων είναι αποθηκευμένα στους 4 °C και δεν χρειάζεται να ξεσταθούν σε θερμοκρασία δωματίου πριν αναμειχθούν και εισαχθούν στις πηκτές.

2. Πιθανοί λόγοι που μια πηκτή δεν πολυμερίζεται:
 - Ανεπαρκές ammonium persulfate ή TEMED. Αυξάνει τους χρόνους της κατάλυσης και άρα καθυστερεί τον πολυμερισμό.
 - Ακατάλληλη ποιότητα αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιήστε αντιδραστήρια καθαρότητας κατάλληλης για ηλεκτροφόρηση.
 - Τα ammonium persulfate ή TEMED είναι ανενεργά. Προετοιμάστε ή αγοράστε ένα φρέσκο απόθεμα.
 - Η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή. Παρασκευάστε την πηκτή σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Η κλίμακα του πολυμερισμού μπορεί πιο εύκολα να ρυθμιστεί με τη μεταβολή των ποσών των καταλυτών πολυμερισμού που χρησιμοποιήθηκαν.
4. Η απαέρωση του διαλύματος του ακρυλαμιδίου θα οδηγήσει σε πιο ραγδαίο πολυμερισμό.
5. Η διάσπαση της πηκτής κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού (ειδικότερα σε υψηλής πυκνότητας πηκτές) είναι πιθανότατη εξαιτίας της παραγωγής θερμότητας. Χρησιμοποιήστε ψυχρά αντιδραστήρια.

2.1.1.4 Προετοιμάζοντας και φορτώνοντας (loading) δείγματα

Χωρητικότητα ανά φρεάτιο (Well) (mini-Gel System)

Πυκνότητα πηκτής	1 Well	5 Wells	10 Wells	15 Wells
0,5 mM	0,7 ml	45 μ l	16 μ l	9 μ l
0,75 mM	1,0 ml	68 μ l	24 μ l	14 μ l
1,0 mM	1,4 ml	90 μ l	32 μ l	18 μ l
1,5 mM	2,1 ml	135 μ l	48 μ l	27 μ l

Πειραματική διαδικασία

1. Συνδυάστε δείγμα πρωτεΐνης και 5× ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (π.χ. 20 μ l + 5 μ l) σε έναν σωλήνα Eppendorf.
2. Θερμάνετε στους 100 °C για 2 - 10 λεπτά.
3. Φυγοκεντρίτε (spin down) το διάλυμα της πρωτεΐνης για τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο σε μικροφυγόκεντρο.
4. Εισάγετε διάλυμα δείγματος μέσα στο φρεάτιο, χρησιμοποιώντας μια σύριγγα Hamilton ή αυτόματη πιπέτα (Εικ. 2.2). Τοποθετήστε σε στρώματα την πρωτεΐνη στον πάτο του φρεατίου και ανυψώστε την άκρη της σύριγγας μέχρι το ύψος της χρωστικής να ανέβει. Να είστε προσεκτικοί κατά την τοποθέτηση του δείγματος, ώστε να αποφύγετε την εισαγωγή φυσαλίδων αέρα, καθώς αυτό μπορεί να επιτρέψει σε ποσότητα δείγματος να μεταφερθεί στο διπλανό φρεάτιο. Εναλλακτικά για τη φόρτωση χρησιμοποιήστε μικροπιπέτα τύπου Gilson.
5. Καθαρίστε επιμελώς τη σύριγγα με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων ή νερό πριν φορτώσετε διαφορετικά δείγματα. Συμπεριλάβετε και φορτώστε το διάλυμα προτύπων μοριακού βάρους (molecular weight markers) σε ένα ή και στα δύο εξωτερικά φρεάτια της πηκτής.

Τα δείγματα μπορούν να φορτωθούν στην πηκτή και πριν την εισαγωγή της στο δοχείο ηλεκτροφόρησης, με τον κίνδυνο όμως, διαδοχικές προσθήκες ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης στο δοχείο, να προκαλέσουν ανατάραξη, οδηγώντας σε σταυρωτή μόλυνση (cross – contamination) των φρεατιδίων. Αν και η ενέργεια της επιστοίβασης θα έπρεπε να μειώνει τις αποκλίσεις εξαιτίας των διαφορών στους όγκους που φορτώνονται, για αναλυτική μελέτη συνίσταται ισοδύναμο δείγμα όγκων. Για να είναι ορατά τα φρεάτια κατά τη φόρτωση, μπορείτε να προσθέσετε μπλε της βρωμοφαινόλη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml στο διάλυμα της πηκτής επιστοίβασης (Smith *et al.*, 1988).



Εικόνα 2.2 Φόρτωση δείγματος στην πηκτή με μικροπιπέτα τύπου Gilson.

Παρατηρήσεις

1. Ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα πρωτεΐνης ανά φρεάτιο (μονή ζώνη πρωτεΐνης): 0,1 μg (χρωστική Coomassie) και 2 ng, χρωστική αργύρου (Guilian *et al.*, 1983).
2. Μέγιστη επιτρεπτή ποσότητα πρωτεΐνης ανά φρεάτιο (μείγμα πρωτεϊνών): 20 - 40 μg .
3. Η καθίζηση της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα μπορεί να οφείλεται σε αποδιάταξη της πρωτεΐνης, στην ανεπάρκεια SDS, στην ανεπάρκεια αναγωγικών παραγόντων, σε αυξημένη οξύτητα ή στην παρουσία καλίου το οποίο καθιζάνει το SDS (Hames, 1981).
4. Εάν το δείγμα δεν βυθιστεί στον πάτο του φρεατίου, είτε η γλυκερόλη είναι ανεπαρκής στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος είτε η «χτένα» δεν ταιριάζει εφαρμοστά, αφήνοντας το πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο να εναποτίθεται κατά μήκος του φρεατίου, παρεμποδίζοντας τη φόρτωση. (Hames, 1981).
5. Εάν τα βρασμένα δείγματα δεν φυγοκεντρηθούν πριν φορτωθούν, θα οδηγηθούμε σε κερματισμό σε λωρίδες των ομάδων της πρωτεΐνης. Το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στην καθίζηση της πρωτεΐνης μετά τη συσσώρευσή της στην πηκτή επιστοίβασης. Η αραίωση του δείγματος της πρωτεΐνης μπορεί να βοηθήσει (Hames, 1981).
6. Τα βρασμένα δείγματα, σε ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, είναι συνήθως σταθερά για εβδομάδες εάν αποθηκευτούν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, αν και επαναλαμβανόμενη κατάψυξη-απόψυξη μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση της πρωτεΐνης.
7. Εάν τα βρασμένα δείγματα είναι αποθηκευμένα στην κατάψυξη, πρέπει να θερμανθούν πριν τη φόρτωση (θερμοκρασία δωματίου) για να επαναδιαλυτοποιηθεί το SDS, το οποίο καθιζάνει σε χαμηλές θερμοκρασίες (Hames, 1981).

2.1.1.5 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των δειγμάτων

Πειραματική διαδικασία

1. Προσαρμόστε τα βύσματα του ηλεκτροδίου στα κατάλληλα ηλεκτρόδια. Το ρεύμα πρέπει να κυκλοφορήσει προς την άνοδο.
2. Ανοίξτε την παροχή του ρεύματος στα 200 V (σταθερή τάση· το ρεύμα θα πρέπει να είναι περίπου 100 mA στην αρχή, 60 mA στο τέλος της ηλεκτροφόρησης για δύο πήγματα των 0,75 mM· 110 mA στην αρχή, 80 mA στο τέλος για δύο πήγματα των 1,5 mM).

3. Η χρωστική, η οποία λόγω του μικρού μοριακού της βάρους προηγείται στην κίνηση, θα πρέπει να μετακινηθεί στο 1 – 5 mm από τη βάση της πηκτής σε 30 - 40 λεπτά για δύο πηκτές πάχους 0,75 mm (40 - 50 λεπτά για δύο πηκτές πάχους 1,5 mm). Ακολουθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών.

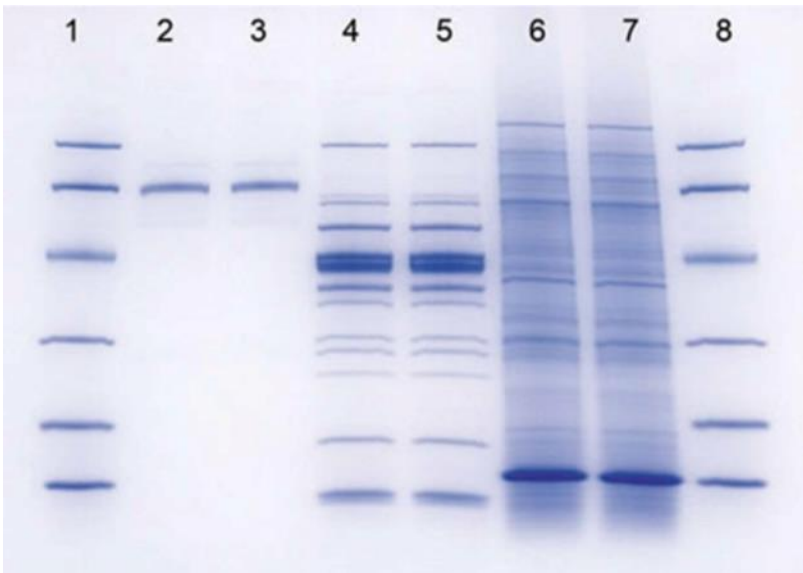
Οι πηκτές θερμαίνονται αρκετά κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης αν και αυτό δεν επηρεάζει τον διαχωρισμό. Ωστόσο, οι αλλαγές της θερμοκρασίας θα επηρεάσουν τη μετακίνηση των πρωτεϊνών σε ένα πήγμα. Εφαρμογή χαμηλότερης τάσης συνεπάγεται μικρότερη παραγωγή θερμότητας, αυξημένους χρόνους μετακίνησης και πιθανόν ασήμαντα μειωμένη ανάλυση- διαχωρισμό (resolution). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πηκτές μπορούν να διατηρηθούν για μερικές ώρες πριν τη χρώση τους, χωρίς να αλλοιωθούν. Εξαιρούνται οι πηκτές με χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, στις οποίες η πρωτεΐνη θα αρχίσει να διαχέεται.

Το ισχυρό ηλεκτρικό ρεύμα που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση πηκτής είναι πολύ επικίνδυνο. Ποτέ να μην αποσυνδέετε τα ηλεκτρόδια πριν από το κλείσιμο της παροχής ρεύματος. Εάν χρησιμοποιείτε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης που δεν είναι τελείως απομονωμένη -και άρα ασφαλής- από το περιβάλλον, να αφήνετε πάντοτε ένα ξεκάθαρα ορατό σημάδι προειδοποίησης ότι η ηλεκτροφόρηση βρίσκεται σε εξέλιξη, ενημερώνοντας έτσι για τον κίνδυνο.

4. Κλείστε την παροχή ρεύματος.
5. Απομακρύνετε τα καλώδια των ηλεκτροδίων από τα ηλεκτρόδια.
6. Απομακρύνετε τα πλακίδια με τις πηκτές από τη συναρμολόγηση των ηλεκτροδίων.
7. Αφαιρέστε προσεκτικά ένα διαχωριστικό (spacer), και εισάγοντάς το υπό γωνία ανάμεσα στα πλακίδια, ανοίξτε απαλά τα πλακίδια της πηκτής. Η πηκτή θα κολλήσει σε ένα από τα πλακίδια και από εκεί μπορεί σχετικά εύκολα να αποκολληθεί και να μεταφερθεί σε δοχείο για τη χρώση της.

2.1.1.6 Χρωματίζοντας μια πηκτή με χρωστική Coomassie blue

Αυτή η μέθοδος (Εικ. 2.3) χρωματισμού είναι απλή, γρήγορη και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και 0,1 μg πρωτεΐνης. Γενικά μια επιλογή γίνεται μεταξύ της χρήσης coomassie blue ή χρωστικής αργύρου ανάλογα με την επιθυμητή ευαισθησία.



Εικόνα 2.3 Χρώση πηκτής με χρήση coomassie blue. Διακρίνονται αριστερά ο μάρτυρας μοριακού βάρους (1 και 8) και έξι πειραματικά δείγματα.

Αντιδραστήρια

- Coomassie blue R-250

- Μεθανόλη – CH₃OH
- Παγωμένο (glacial) οξικό οξύ – CH₃COOH

Μητρικά διαλύματα

Διάλυμα χρώσης πηκτής με Coomassie, 1 λίτρο

- 1,0 g Coomassie blue R-250
- 450 ml μεθανόλη
- 450 ml H₂O
- 100 ml παγωμένο οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής χρωσμένης με Coomassie, 1 λίτρο

- 100 ml μεθανόλη
- 100 ml παγωμένο οξικό οξύ
- 800 ml H₂O

Διαδικασία χρώσης

1. Φορώντας γάντια για να αποφύγετε τη δημιουργία αποτυπωμάτων στην πηκτή, σηκώστε και μεταφέρετέ την σε ένα μικρό δοχείο που περιέχει μικρό όγκο διαλύματος χρωστικής Coomassie (20 ml είναι αρκετό), ή απαλά αναταράξτε το γυάλινο πλακίδιο που φέρει την πηκτή στο διάλυμα χρωστικής μέχρι η πηκτή να αποκολληθεί από το πλακίδιο.
2. Αναταράξτε για 5 - 10 λεπτά για πηκτή πάχους 0,75 mm, (10 - 20 λεπτά για 1,5 mm πάχος) σε συσκευή που εκτελεί αργή περιστροφική κίνηση. Καλύψτε το δοχείο με καπάκι ή πλαστικό κάλυμμα κατά τη διάρκεια του χρωματισμού και του αποχρωματισμού.
3. Αδειάστε το διάλυμα χρωστικής (μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί αρκετές φορές, αλλά είναι αρκετά φτηνό ώστε γενικά συνιστούμε να το πετάτε) και απομακρύνετε τα υπολείμματα χρωστικής από την πηκτή με μερικές εκπλύσεις με νερό. Χρησιμοποιήστε γάντια για να αποφύγετε το λέκκισμα των χεριών.
4. Προσθέστε διάλυμα αποχρωματισμού Coomassie (περίπου 50 ml). Οι έντονες, υψηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνικές ζώνες γίνονται αμέσως ορατές σε διάφανο δοχείο, ενώ η πηκτή αποχρωματίζεται ικανοποιητικά μέσα σε μια ώρα. Για πλήρη αποχρωματισμό, ανανεώστε το διάλυμα αποχρωματισμού και ανακινήστε για μια νύχτα.

Παρατηρήσεις

1. Οι χρόνοι χρωματισμού και αποχρωματισμού που δίνονται είναι οι ελάχιστοι χρόνοι επώασης, αλλά ο χρωματισμός κατά τη διάρκεια της νύχτας θα απαιτήσει μόνο περισσότερο χρόνο αποχρωματισμού. Εάν η χρώση εμφανίζεται ημιτελής μετά τον αποχρωματισμό, η πηκτή μπορεί να επαναχρωστεί.
2. Για πιο εύθραυστες πηκτές (συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου μικρότερες του 6%), μεταφέρατε την πηκτή στο δοχείο χρωματισμού τοποθετώντας ένα φύλλο χαρτιού Whatman πάνω από την πηκτή, ενώ είναι ακόμα πάνω στο γυάλινο πλακίδιο. Σηκώστε το χαρτί με την πηκτή προσκολλημένη πάνω του και «πλύνετε» την πηκτή από το χαρτί μέσα στο δοχείο χρωματισμού.
3. Ανομοιόμορφη χρώση είναι περισσότερο πιθανό να οφείλεται σε μη ολοκληρωμένη διείδυση της χρωστικής, είτε επειδή δεν έχει προστεθεί αρκετή χρωστική είτε επειδή η ανάδευση ήταν ανεπαρκής.
4. Μη ειδική χρώση της πηκτής με Coomassie μπορεί να οφείλεται σε ιζήματα αδιάλυτης χρωστικής. Διηθήστε το διάλυμα της χρωστικής πριν τη χρήση του.
5. Οι χρωστικές τείνουν να προσκολλώνται σε θετικά φορτισμένες ομάδες (Lys, Arg), με αποτέλεσμα βασικές πρωτεΐνες να χρωματίζονται πιο έντονα, ενώ κάποιες όξινες να διαφεύγουν από τον εντοπισμό.

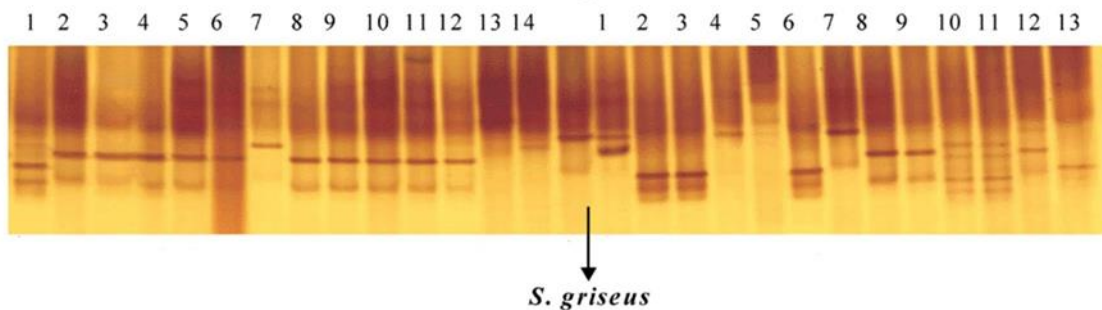
6. Εάν η χρωστική Coomassie δεν είναι αρκετά ευαίσθητη, η πηκτή μπορεί να αποχρωματιστεί και έπειτα να χρωματιστεί με άργυρο (βλέπε σχόλια για χρωματισμό με άργυρο παρακάτω).

2.1.1.7 Χρωματίζοντας μια πηκτή με χρωστική αργύρου

Αυτή η μέθοδος χρωματισμού μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και 2 ng πρωτεΐνης σε μια μόνο δέσμη (Εικ. 2.4).

Αντιδραστήρια

- Νιτρικός άργυρος (AgNO_3) (Σημείωση: Διαφορετικές παρτίδες νιτρικού αργύρου μπορούν να έχουν διαφορετική ευαισθησία.)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH)
- 14,8 M (30%) Υδροξείδιο του Αμμωνίου (NH_4OH)
- Κιτρικό οξύ
- 38% Φορμαλδεΰδη
- Μεθανόλη (Διαβάθμιση αντιδραστηρίου)
- Οξικό οξύ
- Kodak rapid fix
- Kodak hypo clearing agent



Εικόνα 2.4 Χρώση πηκτής με άργυρο.

Διαλύματα εργασίας

Προετοιμάστε τα ακόλουθα διαλύματα

- 0,36% NaOH
- 1% Κιτρικό οξύ (μπορεί να αποθηκευτεί για αρκετές εβδομάδες)
- 50% Μεθανόλη / 10% Οξικό οξύ
- 1% Οξικό οξύ

Ετοιμάστε φρέσκα διαλύματα

- **Διάλυμα Α**
0,8 g Νιτρικός άργυρος σε 4 ml απεσταγμένου νερού.
- **Διάλυμα Β**
21 ml 0,36% NaOH.
1,4 ml 14,8 M (30%) Υδροξείδιο αμμωνίου.
- **Διάλυμα Γ**

Προσθέστε το Διάλυμα Α στο Διάλυμα Β ρίχνοντας σταγόνες με σταθερή ζωηρή ανατάραξη, επιτρέποντας στο καφέ ίζημα να καθαρίσει. Προσθέστε νερό μέχρι 100 ml. Χρησιμοποιήστε το μέσα στα επόμενα 15 λεπτά.

- **Διάλυμα Δ**

Αναμειξτε 0,5 ml 1% κιτρικού οξέος με 50 ml 38% φορμαλδεΰδης, προσθέστε νερό μέχρι 100 ml. Το διάλυμα πρέπει να είναι φρέσκο.

Διαδικασία χρώσης

1. Φορώντας γάντια, σηκώστε την πηκτή και μεταφέρετέ την σε ένα μικρό δοχείο. Διαποτίστε την με 50% μεθανόλη / 10% οξικό οξύ για τουλάχιστον 1 ώρα με 2 - 3 αλλαγές μεθανόλης / οξικού οξέος.
2. Ξεπλύνετε για 30 λεπτά με νερό, με τουλάχιστον 3 αλλαγές.
3. Προετοιμάστε τα Διαλύματα Α, Β και έπειτα το Γ.
4. Μετακινήστε την πηκτή σε ένα καθαρό δοχείο και χρωματίστε με Διάλυμα Γ για 15 λεπτά με απαλή, σταθερή ανάδευση.
5. Ξεπλύνετε την πηκτή δύο φορές με νερό, έπειτα διαποτίστε 2 λεπτά με απαλή ανάδευση.
6. Προετοιμάστε το Διάλυμα Δ.
7. Μετακινήστε την πηκτή σε καθαρό δοχείο και αναπτύξτε το χρωματογράφημα με την πλύση της πηκτής με Διάλυμα Δ. Οι ζώνες θα πρέπει να εμφανιστούν σε λιγότερο από 10 λεπτά, διαφορετικά αλλάξτε το Διάλυμα Δ. Εάν εμφανιστεί υποκίτρινο φόντο, η αντίδραση πρέπει να σταματήσει.
8. Σταματήστε την ανάπτυξη με έκπλυση με διάλυμα 1% οξικού οξέος.
9. Πλύνετε την πηκτή με νερό για τουλάχιστον 1 ώρα με τουλάχιστον τρεις αλλαγές.
10. Αποθηκεύστε την πηκτή σε νερό ή στεγνώστε (βλ. επόμενη ενότητα).

Παρατηρήσεις

1. Η χρώση με άργυρο συντελείται κυρίως στην επιφάνεια της πηκτής. Ωστόσο, για να αυξήσουμε την αναλογία επιφάνειας/όγκου για τις ζώνες της πρωτεΐνης, χρησιμοποιούμε λεπτή πηκτή (πάχους 0,5 – 0,75 mm).
2. Εάν μια πηκτή είναι ανεπαρκώς χρωματισμένη με Coomassie blue, απλώς ξεπλύνετε με μεθανόλη και συνεχίστε με το βήμα 2 του πρωτοκόλλου χρωματισμού με άργυρο. Το οξικό οξύ παρεμποδίζει τη χρώση αργύρου, οπότε βεβαιωθείτε ότι έχει απομακρυνθεί πλήρως από την πηκτή. Αντιστρόφως, εάν ο άργυρος έχει υπερχρωματίσει την πηκτή, μπορεί να αποχρωματιστεί με Rapid Fix και να ξαναχρωματιστεί με Coomassie blue.
3. Διαφορετικές πρωτεΐνες εμφανίζουν ανάμοια γραμμική αντίδραση στη χρώση αργύρου, δηλαδή η γραμμική σχέση μεταξύ έντασης σήματος και ποσότητας πρωτεΐνης δεν είναι αξιόπιστη για ποσοτική σύγκριση διαφορετικών πρωτεϊνών. Επίσης, βασικές πρωτεΐνες χρωματίζονται ανεπαρκώς. Έτσι, αποφύγετε την προσπάθεια να υπολογίσετε τις αναλογίες διαφορετικών πρωτεϊνών σε χρωματισμένες με άργυρο πηκτές.
4. Η αργή ανάδευση (40 - 60 rpm) είναι σημαντική κατά τη διάρκεια των επώσεων.
5. Ένα ενιαίο σκοτεινό φόντο μπορεί να οφείλεται σε ακαθαρσίες στο νερό (Bio-Rad Bulletin 1089). Το απιονισμένο νερό με αγωγιμότητα < 1 μmho είναι απαραίτητο σε όλα τα διαλύματα.
6. Εάν ένα γκρι ή καφέ ίζημα εμφανιστεί με τη μορφή σκόνης, κηλίδων ή στροβίλων στην επιφάνεια της πηκτής, αυτό μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκείς πλύσεις κατά τη διάρκεια προηγούμενων βημάτων ή σε χαμηλές θερμοκρασίες.
7. Κάποια αστάθεια στη χρωστική αργύρου μπορεί να οφείλεται στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας εάν το πρωτόκολλο εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρήση υδατόλουτρου σταθερής θερμοκρασίας (water bath) μπορεί να λύσει ένα τέτοιο πρόβλημα (Allen *et al.*, 1984).
8. Ο χρωματισμός με άργυρο μπορεί να μη λειτουργήσει όταν το δείγμα της πρωτεΐνης είναι εμπλουτισμένο με νουκλεϊκά οξέα ή μέταλλα.

9. Σε πηκτές SDS που χρησιμοποιείται 2-mercaptoethanol μπορεί να αναπτυχθούν 2 οριζόντιες ψευδείς ζώνες στα 60 kDa και στα 67 kDa. Αυτές μπορούν να εξαλειφθούν με τη χρήση μικρότερης ποσότητας 2-mercaptoethanol (Marshall and Williams, 1984).
10. Η επεξεργασία των δειγμάτων με γλουταραλδεΐδη εφαρμόζεται για να αυξήσει την ένταση του σήματος μέχρι 40 φορές. Σε σταυρο-συνδεμένες (cross – linked) πρωτεΐνες με γλουταραλδεΐδη, πλύνετε για 30 λεπτά με 10% γλουταραλδεΐδη στον απαγωγό (hood) μετά το βήμα 1, και ακολούθως με νερό επί δίωρο (Guilian *et al.*, 1983). Οι πηκτές μπορούν να αποθηκευτούν σε απεσταγμένο νερό για αρκετές εβδομάδες μετά από αυτό το βήμα.
11. Οι φωτογραφίες πρέπει να αποτυπώνονται όσο το δυνατό συντομότερα εξαιτίας των αλλαγών των χρωμάτων και της αυξανόμενης μη ειδικής χρώσης με το πέρασμα του χρόνου (Gooderham, 1984).
12. Η αυτοραδιογραφία με ¹²⁵I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C μετά τον χρωματισμό με άργυρο είναι εξαιρετική, αλλά όχι η ³H φθορισμογραφία, επειδή η χρωστική θα απορροφήσει τις περισσότερες εκπομπές από το ισότοπο. Ο αποχρωματισμός του πήγματος συνίσταται πριν τη φθορισμογραφία (Gooderham, 1984).

2.1.1.8 Αφυδάτωση πηκτής

Υλικά

- Χαρτί Whatman 3 mm.
- Οξικό φύλλο (το είδος που χρησιμοποιείται για διαφάνειες) ή κανονικό πλαστικό κάλυμμα κουζίνας.

Πειραματική διαδικασία

1. Τοποθετήστε την πηκτή ανάποδα σε μια καθαρή επιφάνεια (γυάλινο πλακίδιο ή πάγκο εργαστηρίου).
2. Χρησιμοποιώντας νερό ως λιπαντικό, προσαρμόστε τα πλευρικά τοιχώματα των φρεατίων έτσι ώστε να είναι κάθετα.
3. Καλύψτε την πηκτή με ένα κομμάτι 10 × 12 cm χαρτιού Whatman 3 mm και σηκώστε το μαζί από το πλακίδιο ή τον πάγκο. Η πηκτή πρέπει να κολλήσει στο χαρτί.
4. Καλύψτε το μπροστινό τμήμα της πηκτής με ένα οξικό φύλλο ή πλαστικό κάλυμμα, προσέχοντας να μην παγιδεύσετε φυσαλίδες αέρα, που μπορεί να οδηγήσουν σε σπάσιμο της πηκτής.
5. Τοποθετήστε το χαρτί Whatman στον στεγνωτήρα της πηκτής, ρυθμίστε τη θερμοκρασία (60 °C) και την αναρρόφηση (κενό αέρος), και καλύψτε με πώμα ασφαλείας.

Παρατηρήσεις

1. Βρίσκουμε ότι μια πηκτή πάχους 0,75 mm στεγνώνει μέσα σε 1 ώρα περίπου, ενώ μία πηκτή 1,5 mm στεγνώνει μέσα σε 2 ώρες περίπου, αλλά αυτό εξαρτάται και από την αντλία ή τη συσκευή αναρρόφησης που χρησιμοποιούμε.
2. Οι πηκτές μπορούν εναλλακτικά να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ατμοσφαιρική πίεση, πίσω από φύλλα σελοφάν (Giulian *et al.*, 1983; Smith, 1984). Οι πηκτές που στεγνώνουν πίσω από διάφανα φύλλα είναι χρήσιμες για πυκνομέτρηση.
3. Το σπάσιμο της πηκτής κατά τη διάρκεια του στεγνώματος, ειδικότερα συνηθισμένο σε πηκτές υψηλής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου, μπορεί να οφείλεται στη διακοπή του κενού αέρος πριν η πηκτή στεγνώσει εντελώς (Hames, 1981). Η διαπότιση της πηκτής κατά τη διάρκεια της νύχτας με γλυκερόλη 5% συνίσταται συχνά για να μειώσει τον κίνδυνο του σπασίματος κατά τη διάρκεια του στεγνώματος.

2.1.1.9 Πιθανά προβλήματα

1. Υψηλές συγκεντρώσεις κατιόντων στο δείγμα μπορεί να προκαλέσουν καθίζηση του SDS και πρέπει να απομακρυνθούν πριν την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος του δείγματος.
2. Κάποιες πρωτεΐνες πρέπει να αναδιαταχθούν-επιδιορθωθούν πολύ γρήγορα, διαφορετικά διαχέονται έξω από την πηκτή. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιούμε πάρα πολύ λεπτές πηκτές (< 0,5 mm), η επιδιόρθωση πριν τον χρωματισμό είναι απαραίτητη. 20% TCA μπορεί επίσης να ενεργήσει ως επιδιορθωτικός παράγοντας (Allen *et al.*, 1984).
3. Το SDS συχνά αναστέλλει τη δραστηριότητα ενζύμων λόγω αλλαγής στερεοδιάταξης, αλλά ποικίλες στρατηγικές υπάρχουν για την ανάκτηση των ενεργών ενζύμων από τις πηκτές SDS-πολυακρυλαμιδίου.
4. Για τον καθαρισμό των συσκευών και των πλακιδίων ηλεκτροφόρησης, απαλό απορρυπαντικό πιάτων είναι γενικά επαρκές. Το πλύσιμο με χρωμικό οξύ ακολουθούμενο από πλύσεις με νερό και αιθανόλη συνίσταται από πολλούς ερευνητές, αλλά εξασφαλίζουμε επιτυχή αποτελέσματα χρησιμοποιώντας μόνο απαλά απορρυπαντικά, ειδικότερα όταν χρωματίζουμε με coomassie blue.
5. Ασφαλίζοντας από διαρροές τα πλακίδια πακεταρίσματος της πηκτής (Sealing): Η συσκευή Bio-Rad mini-Protein II δεν απαιτεί ασφάλιση από διαρροές των πλακιδίων. Εάν χρησιμοποιούμε ένα σύστημα με πλακίδια το οποίο απαιτεί την ασφάλιση από διαρροές, συνιστούμε την επικάλυψη των ανυψωμένων περιοχών (mounted) των πλακιδίων με ζεστό διάλυμα 1,5% αγαρόζης.
6. Χαμηλής συγκέντρωσης πηκτές ακρυλαμιδίου (<3%) μπορούν να εμπλουτιστούν με 0,5% αγαρόζης (Hames, 1981).
7. Για πηκτές με συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου πάνω από 12%, συνίσταται μια πιο υψηλή αναλογία ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου. Βλέπε Blackshear (1984).
8. % T και % C είναι όροι που χρησιμοποιούνται συχνά για να περιγράψουν τη σύσταση της πηκτής σε ακρυλαμίδιο. Το %T αναφέρεται στο ολικό περιεχόμενο του ακρυλαμιδίου (w/v) ενώ το % C είναι η αναλογία του αντιδραστηρίου διασύνδεσης (cross-linking agent, π.χ. δισ-ακρυλαμίδιο) επί του μονομερούς ακρυλαμιδίου (w/w).

$$\% T = \frac{\text{Ακρυλαμίδιο (g)} + \text{Δις (g)}}{\text{Όγκος (ml)}} \times 100\%$$

$$\% C = \frac{\text{Δις (g)}}{\text{Ακρυλαμίδιο (g)} + \text{Δις (g)}} \times 100\%$$

9. Οι μίνι πλάκες (minislab) πηκτής έχουν γίνει το σύστημα επιλογής για τις περισσότερες εφαρμογές ηλεκτροφόρησης εξαιτίας κυρίως των μικρότερων χρόνων της διαδικασίας διαχωρισμού, αλλά και χρωματισμού. Μεγαλύτερες πηκτές μπορούν ωστόσο να είναι χρήσιμες σε περιπτώσεις όπου απαιτείται μεγαλύτερος διαχωρισμός μεταξύ των ζωνών της πρωτεΐνης π.χ. για αυτοραδιογραφία (Schleif and Wensink, 1981).
10. Οι στοιχειομετρικές αναλογίες των πρωτεϊνών μπορούν να καθοριστούν από τις πηκτές που έχουν χρωματιστεί με coomassie, με απεικόνιση πυκνομετρίας και ενοποίηση.
11. Ένα απλό τεστ για τον έλεγχο ύπαρξης ενζυμικής πρωτεόλυσης στο προς ανάλυση δείγμα, αποτελεί η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος του δείγματος σε δύο ακριβώς ίδια πρωτεϊνικά δείγματα και ο βρασμός του ενός, αλλά όχι του άλλου, ακολούθως δε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (Weber *et al.*, 1971).
12. Προετοιμασία μαρτύρων μοριακού βάρους: 2 μg πρότυπης καθαρής πρωτεΐνης ανά ζώνη είναι επαρκή. Εάν προετοιμάζετε μείγμα πρότυπων πρωτεϊνών, αυξήστε ανάλογα την ποσότητα (π.χ. για ένα μείγμα 5 πρότυπων πρωτεϊνών, 10 μg σε κατάλληλο όγκο του πρότυπου διαλύματος θα πρέπει να φορτωθούν ανά well). Ετοιμάζοντας φρέσκα δείγματα μαρτύρων για κάθε πηκτή παρεμποδίζεται η αποδόμηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης, εξαιτίας της επαναλαμβανόμενης ψύξης-τήξης. Προχρωματισμένοι δείκτες μοριακού βάρους είναι εξαιρετικά χρήσιμοι, αλλά έχετε υπόψη ότι οι ομάδες που προσδίδουν το χρώμα αυξάνουν το μοριακό βάρος των δεικτών.

2.1.2 Πηκτές διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης (gradient gels) σε αποδιατακτικές συνθήκες

2.1.2.1 Εισαγωγή

Η πηκτή βαθμίδωσης ακρυλαμιδίου πλεονεκτεί έναντι της ομοιογενούς πηκτής, καθώς επιτρέπει τον διαχωρισμό μιας ευρύτερης κλίμακας μοριακών βαρών των πρωτεϊνών σε μια πηκτή (από 15 kDa ως 200 kDa σε πηκτή 5 – 20% βαθμιδωτής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου ή 13 kDa ως 950 kDa σε πηκτή διαβάθμισης 3 – 30%). Τα όρια της εκατοστιαίας διαβάθμισης του ακρυλαμιδίου μπορούν να προσαρμοστούν ανάλογα με τις εκάστοτε πειραματικές ανάγκες (Hames, 1981). Προπαρασκευασμένες βαθμιδωτές πηκτές είναι εμπορικά διαθέσιμες.

2.1.2.2 Εξοπλισμός

- Συσκευή παρασκευής υλικού βαθμιδωτής συγκέντρωσης (Hoefler, Pharmacia-LKB)
- Περισταλτική αντλία
- Σωληνώσεις

2.1.2.3 Προετοιμασία πηκτής

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα Α

- 30% ακρυλαμίδιο, 0,8% δις-ακρυλαμίδιο

Διάλυμα Β

- 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% SDS

Διάλυμα Γ

- 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% SDS

Ποσότητες διαλυμάτων για μια πηκτή διαβάθμισης 5 - 20%

5%	20%	
1,67 ml	6,67 ml	Διάλυμα Α
2,5 ml	2,5 ml	Διάλυμα Β
5,8 ml	-----	H ₂ O
-----	1,5 g	Σακχαρόζη (προσθέτει 0,8 ml στον όγκο)
50 μl	50 μl	10% Ammonium Persulfate
5 μl	5 μl	TEMED

2.1.3 SDS - πηκτές ουρίας

2.1.3.1 Εισαγωγή

Οι κινητικότητες μικρομοριακών πρωτεϊνών σε SDS-PAGE ανάλυση μπορεί να μην είναι ανάλογες του μοριακού τους βάρους, όταν η επίδραση του φορτίου της πρωτεΐνης δεν είναι αμελητέα και επηρεάζει σημαντικά τον διαχωρισμό βάσει της μάζας. Το SDS-PAGE ουρίας χρησιμοποιείται συχνά σε αυτές τις περιπτώσεις (Schleif and Wensink, 1981). Επιπροσθέτως, το SDS-PAGE ουρίας μπορεί να είναι χρήσιμο στην περίπτωση διαχωρισμού πρωτεϊνών, που δεν είναι διαλυτές σε περιβάλλοντα χαμηλής ιοντικής ισχύος, όπως πρωτεΐνες που προέρχονται από ανοσοκαθίζηση και μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Εκτός από τη σύνθεση του πήγματος που περιγράφεται παρακάτω, όλες οι διαδικασίες είναι όπως περιγράφονται για το SDS-PAGE.

2.1.3.2 Προετοιμασία πηκτών

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα Α

- 30% ακρυλαμίδιο, 0,8% δις-ακρυλαμίδιο

Διάλυμα Β

- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS

Διάλυμα Γ

- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS

Ποσότητες διαλυμάτων

	Για X% πηκτή διαχωρισμού (10 ml)	X% πηκτή επιστοίβασης (4 ml)
Διάλυμα Α	χ/3 ml	χ/7.5 ml
Διάλυμα Β	2,5 ml	0 ml
Διάλυμα Γ	0 ml	1 ml
Ουρία	4,8 g = 3,6 ml	1,9 g = 1,4 ml
H ₂ O	3,9 - χ/3 ml	1,6 - χ/7.5 ml
10% Am. persulfate	50 μl	30 μl
TEMED	5 μl	5 μl

Σημείωση: Αυτές οι αναλογίες συστατικών για πηκτές διαχωρισμού και επιστοίβασης είναι έγκυρες μόνο μέχρι συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 12% ($X \leq 12\%$). Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου, η ουρία πρέπει να συμπεριληφθεί στα Διαλύματα Α και Β. Βλέπε Schleif and Wensink (1981).

Παράδειγμα

	8% Πηκτή Διαχωρισμού (10 ml)	5% Πηκτή Επιστοίβασης (4 ml)
Διάλυμα Α	2,7 ml	0,67 ml
Διάλυμα Β	2,5 ml	0 ml
Διάλυμα Γ	0 ml	1 ml
Ουρία	4,8 g = 3,6 ml	1,9 g = 1,4 ml
H ₂ O	1,2 ml	0,93 ml
10% Am. Persulfate	50 μl	30 μl
TEMED	5 μl	5 μl

Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης, τα ρυθμιστικά διαλύματα, καθώς και τα διαλύματα χρωματισμού και αποχρωματισμού των πηκτών είναι όμοια με εκείνα που περιγράφονται για το τυπικό SDS-PAGE. Ρυθμιστικό διάλυμα 5× πρέπει να ετοιμαστεί ώστε να περιέχει 8 M ουρίας.

2.1.4 Άλλες μέθοδοι

2.1.4.1 Ανίχνευση ραδιοϊσοτόπων δειγμάτων

Η χρήση ραδιενεργών πρωτεϊνών κατά τον διαχωρισμό μειγμάτων σε πηκτές ηλεκτροφόρησης έχει αμβλύνει τα όρια της ανίχνευσης μιας πρωτεΐνης, αυξάνοντας πολύ την ευαισθησία της μεθόδου. Η ραδιενέργεια μπορεί

να μετρηθεί με αυτοραδιογραφία (έκθεση της πηκτής σε μεμβράνη ακτίνων X) ή με τον τεμαχισμό της πηκτής σε ζώνες και μέτρηση της εκπομπής σε έναν μετρητή σπινθηρισμού.

Ο τεμαχισμός της πηκτής σε ζώνες είναι περισσότερο ποσοτική μέθοδος, αν και υστερεί σε αναλυτική ισχύ. Οι πηκτές μπορούν να τεμαχιστούν με λεπίδα ξυραφιού ή ειδικές συσκευές τεμαχισμού που είναι εμπορικά διαθέσιμες (Bio-Rad, Hoefel). Για την αύξηση της απόδοσης της μέτρησης υγρού σπινθηρισμού, οι πρωτεΐνες πρέπει πρώτα να εξάγονται από τα τεμάχια της πηκτής. Μια απλή διαδικασία για διάλυση τεμαχίων της πηκτής με H_2O_2 περιγράφεται από τον Hames (1981).

Η αυτοραδιογραφία μπορεί να εφαρμοστεί με την άμεση έκθεση μεμβράνης ευαίσθητης σε ακτίνες X στην πηκτή (ασφαλισμένη σε πλαστικό περιτύλιγμα) ή μπορεί να ενισχυθεί περισσότερο με τη χρήση ενός τεταμένου κόσκινου πίσω από τη μεμβράνη (ονομαζόμενη έμμεση αυτοραδιογραφία). Η ευαισθησία της ανίχνευσης για ^{14}C , ^{32}P και ^{35}S αυξάνεται περίπου στο 15-πλάσιο με τη χρήση φθορισμομετρικών μεθόδων. Μεταξύ των πιο δημοφιλών από αυτές είναι ο εμποτισμός της πηκτής με μια φθορίζουσα ουσία όπως το EN^3HANCE (New England Nuclear). Η φθορισμομετρία είναι απαραίτητη για την ανίχνευση του 3H . Συμβουλευτείτε: Hames, 1981.

2.1.4.2 Προσδιορισμός μοριακού βάρους

Το SDS-PAGE συχνά χρησιμοποιείται για να καθορίσει τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, ενώ η μετακίνηση της πρωτεΐνης είναι γενικά αντιστρόφως ανάλογη με τη μάζα της πρωτεΐνης. Μια πρότυπη καμπύλη δημιουργείται με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους, και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει μπορεί να εξαχθεί με τη χρήση δεδομένων της καμπύλης.

Πειραματική διαδικασία

1. Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση της πηκτής και τον χρωματισμό-αποχρωματισμό, μπορείτε να μετρήσετε την απόσταση της μετακίνησης των πρωτεϊνών (κάθε διαφορετικής ζώνης στην πηκτή), όπως ακριβώς και της ζώνης της χρωστικής ελόπτευσης (μπλε της βρωμοφαινόλης). Η απόσταση της μετακίνησης μετρείται από την αρχή της πηκτής διαχωρισμού μέχρι το μπροστινό άκρο του κάθε πρωτεϊνικού μετώπου ή ζώνης.
2. Υπολογίστε τους λόγους R_f :

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση μετακίνησης της πρωτεΐνης (ζώνης) } \Psi}{\text{Απόσταση μετακίνησης του μετώπου της χρωστικής παρακολούθησης}}$$

3. Απεικονίστε γραφικά το \log_{10} (φυσικός λογάριθμος) των μοριακών βαρών των γνωστών πρωτεϊνών ως συνάρτηση του δικού τους R_f . Από την ευθεία γραμμή του γραφήματος και το γνωστό R_f της άγνωστης πρωτεΐνης, μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό της βάρος.

Παρατηρήσεις

1. Οι υπολογισμοί για τις τιμές R_f πρέπει να γίνουν με τη χρήση κινητικών δεδομένων από πρωτεΐνες που έχουν ηλεκτροφορηθεί στην ίδια πηκτή. Η παραπάνω συνθήκη διασφαλίζει το συγκρίσιμο των αποτελεσμάτων και συνεπώς την αξιοπιστία τους, παρακάμπτοντας σφάλματα που θα μπορούσαν να οφείλονται σε αστοχίες παρασκευαστικής φύσεως ή αδυναμία διασφάλισης όμοιων ηλεκτροφορετικών συνθηκών.
2. Οι καθορισμοί των μοριακών μαζών που βασίζονται αποκλειστικά σε SDS-PAGE μπορεί να είναι παραπλανητικοί, αφού κάποιες πρωτεΐνες μετακινούνται ανώμαλα στην πηκτή.
3. Για έναν προσεκτικό και περισσότερο ασφαλή καθορισμό μοριακής μάζας, συνίσταται να «τρέχουμε» τα δείγματα σε πηκτές τουλάχιστον δυο διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμιδίου.
4. Μια νέα πρότυπη καμπύλη πρέπει να δημιουργείται για κάθε πηκτή.

5. Πρότυπα πρωτεϊνικά μεγέθη (molecular weight markers) είναι εμπορικά διαθέσιμα. Να είστε προσεκτικοί και να κάνετε τις κατάλληλες διορθώσεις μοριακού βάρους κατά τη χρήση προχρωματισμένων δεικτών μοριακού βάρους. Ο έγχρωμος προσδέτης σε πρότυπες πρωτεΐνες αυξάνει το μοριακό τους βάρος. Συμβουλευτείτε το φυλλάδιο προδιαγραφών που συνοδεύει τους προχρωματισμένους δείκτες.
6. Οι πηκτές μπορούν να στεγνώσουν πριν τη μέτρηση των τιμών R_f . Έχετε υπόψη, όμως, ότι το στέγνωμα τείνει να διευρύνει τις ζώνες των πρωτεϊνών, ειδικά σε λεπτές πηκτές, καθιστώντας δυσκολότερο τον εντοπισμό της ακριβούς θέσης του απώτερου ορίου κάθε ζώνης-μετώπου.

Συμβουλευτείτε: Hames, 1981.

2.1.4.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης (Πυκνομετρία)

Η ποσοτικοποίηση μεμονωμένων πρωτεϊνών σε ένα μείγμα επιτυγχάνεται συχνά με τη σάρωση των χρωματισμένων πρωτεϊνικών ζωνών σε μια πηκτή πολυακρυλαμίδιου με χρήση ειδικών συσκευών σάρωσης. Το πυκνόμετρο (densitometer) αποτελεί ειδικό χρωματόμετρο σχεδιασμένο να σαρώνει και να ποσοτικοποιεί τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτές. Συγκεκριμένα, μετρά τη πυκνότητα του χρώματος των διαφόρων ζωνών της ηλεκτροφόρησης. Τα πυκνόμετρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη σάρωση ποικιλίας πηκτών, καθώς και σε μεμβράνες οξικής κυτταρίνης. Η απορρόφηση της πρωτεϊνικής ζώνης είναι ανάλογη με το ποσό της πρωτεΐνης που περιέχεται σε αυτή, μόνο πάνω από μια ορισμένη τιμή της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Οι πρωτεΐνες προσδέουν τις διάφορες χρωστικές με ποικίλους τρόπους και έτσι η σύγκριση των ποσοτήτων διαφορετικών πρωτεϊνών σε συγκεντρώσεις πλησίον των οριακών τιμών θα πρέπει να βασίζεται στις πρότυπες καμπύλες για απόλυτη ποσοτικοποίηση όταν είναι δυνατό. Εμπορικές συσκευές σάρωσης πηκτών είναι διαθέσιμες από τη Bio-Rad, Hoefer, Joyce-Loebl και Pharmacia-LKB.

Η πρωτεϊνική ποσοτικοποίηση μπορεί ακόμη να περιλαμβάνει την απομάκρυνση της χρωστικής από χρωματισμένες ζώνες πηκτών. Ο Ball (1986) περιγράφει απλές μεθόδους για την αφαίρεση του coomassie blue R-250 από τεμάχια πηκτής πολυακρυλαμίδιου. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι η ορθή ποσοτικοποίηση μέσω της μέτρησης της πυκνότητας του δεσμευμένου χρωμογόνου, απαιτεί τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης για την υπό μελέτη πρωτεΐνη, εξαιτίας των διαφορών πρόσδεσης της χρωστικής σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Η διαδικασία του Ball παρουσιάζεται παρακάτω:

Πειραματική διαδικασία

1. Αφαιρέστε τη ζώνη της πρωτεΐνης από την πηκτή με μια λεπίδα ξυραφιού.
2. Τοποθετήστε το τεμάχιο της πηκτής σε έναν γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέστε 1 ml από 3% SDS σε 50% ισοπροπανόλη, και καλύψτε με Parafilm.
3. Επώαστε σε νερό στους 37 °C (water bath) για 24 ώρες χωρίς ανάδευση.
4. Αφαιρέστε το υγρό και καθορίστε την απορρόφησή του στα 595 nm.

Συμβουλευτείτε: Ball, 1986 ή Smith, 1984.

2.1.4.4 Εξαγωγή και συλλογή πρωτεϊνικών κλασμάτων από πηκτή

Η εξαγωγή πρωτεϊνών από τις πηκτές ακρυλαμίδιου μπορεί να επιτευχθεί με την παθητική διάχυση της πρωτεΐνης ή την ηλεκτροεξαγωγή. Μια απλή διαδικασία της παθητικής εξαγωγής της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τεμαχισμό του σχετικού τμήματος της πηκτής σε μικρά κομμάτια με μια λεπίδα, και επώαση με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (15 λεπτά είναι μια καλή περίοδος), ακολουθούμενη από φυγοκέντριση, συλλογή των επιπλέοντων και επανάληψη της εξαγωγής με περισσότερο ρυθμιστικό διάλυμα. Υψηλότερη απόδοση ανάκτησης αναμένεται με την ηλεκτροεξαγωγή. Μια απλή διαδικασία ηλεκτροεξαγωγής που συνίσταται σε αντίστροφη ηλεκτροφόρηση, με τη χρήση πηκτής σε σωλήνα, περιγράφεται από τους Otto and Snejdarkova (1981) και υιοθετήθηκε και στην περίπτωση των πηκτών - πλακιδίων από τους Stralfors and Belfrage (1983).

Η ανάκτηση της ενζυμικής ενεργότητας μετά το SDS-PAGE έχει αναφερθεί και επιτόπου (in situ) αμέσως μετά την εξαγωγή της πρωτεΐνης από τα τεμάχια της πηκτής. Κάποιες φορές η αφαίρεση του SDS απαιτεί

την αντικατάστασή του από ένα λιγότερο αποδιατακτικό απορρυπαντικό. Η επιτυχημένη επαναδιάταξη μπορεί να εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του άλατος, της γλυκερόλης, του αναγωγικού παράγοντα, του συμπαραγόντα ή από το υπόστρωμα στο ρυθμιστικό διάλυμα της επαναδιάταξης.

2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες

2.2.1 Εισαγωγή

Η μη αποδιατακτική πηκτή ηλεκτροφόρησης, ονομάζεται επίσης φυσική πηκτή ηλεκτροφόρησης και διαχωρίζει πρωτεΐνες βάσει τόσο του μεγέθους, όσο και του ηλεκτρικού τους φορτίου. Έτσι, ενώ το μέγεθος των πόρων του ακρυλαμιδίου λειτουργεί ως ένα φυσικό κόσκινο, διαχωρίζοντας τα διαφορετικού μοριακού μεγέθους μόρια, ταυτόχρονα, πρωτεΐνες που είναι περισσότερο φορτισμένες, στην τιμή pH της πηκτής διαχωρισμού εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα. Αυτή η μέθοδος είναι ικανή να διαχωρίσει μόρια που διαφέρουν κατά μια μόνο μονάδα ηλεκτρικού φορτίου. Επιπλέον, οι συνθήκες σε μη αποδιατακτική πηκτή ηλεκτροφόρησης ελαχιστοποιούν την αποδιάταξη της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με την πηκτή SDS.

Είναι σημαντικό να εκτιμήσουμε τις επιδράσεις και τη σημασία ορισμένων μεταβλητών σε μη αποδιατακτική πηκτή ηλεκτροφόρησης.

- **Πορώδης πηκτή:** Οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου στην πηκτή μπορούν να ποικίλουν από περίπου 5% ως 15% και η αναλογία ακρυλαμιδίου: δις-ακρυλαμιδίου μπορεί να κυμαίνεται από 20:1 ως 50:1 ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά κάθε φορά διακριτικά όρια.
- **Φορτίο:** Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες σε τιμή pH 8,8, το οποίο είναι το κοινό pH που χρησιμοποιείται στις μη αποδιατακτικές πηκτές ηλεκτροφόρησης. Για να διατηρηθεί η βιολογική δραστηριότητα, είναι απαραίτητο να δουλεύουμε σε μια κλίμακα pH που δεν είναι επιβλαβής για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.
- **Ιοντική ισχύς:** Η ιοντική ισχύς παίζει σημαντικό ρόλο στην ηλεκτροφόρηση, ώστε εάν είναι πολύ υψηλή, θα αναπτυχθεί θερμότητα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης (επιβλαβής για τα μόρια) και αν είναι πολύ χαμηλή, οι πρωτεΐνες μπορεί να συναθροιστούν αόριστα.
- **Θερμοκρασία:** Όλα τα βήματα θα πρέπει να εξελίσσονται στους 0-4 °C για να μειωθεί η απώλεια της πρωτεϊνικής ενεργότητας λόγω αποδιάταξης και για να ελαχιστοποιηθεί η πρωτεόλυση.

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε ασυνεχή πηκτή σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες

2.2.2.1 Εισαγωγή

Η μη αποδιατακτική πηκτή ηλεκτροφόρησης αναπτύσσεται σε ρυθμιστικά διαλύματα υψηλού pH (pH 8,8). Σ' αυτό το pH, οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και μετακινούνται προς την άνοδο, το θετικό δηλαδή φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Οι οδηγίες είναι γραμμένες για τη συσκευή Bio-Rad mini-Protean II, αλλά όλα τα πρωτόκολλα θα πρέπει εύκολα να υιοθετούνται και από άλλα συστήματα.

Εξοπλισμός

- Bio-Rad mini-Protean II συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό παροχής ρεύματος συνεχούς τάσης
- Σύριγγα Hamilton ή μιας χρήσης ακρορύγχια μικροπιπέτας για «φόρτωμα» δείγματος στην πηκτή
- Μικρό δοχείο για χρωματισμό και αποχρωματισμό πηκτής

2.2.2.2 Προετοιμασία πηκτής

Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδιο
- Δισ-ακρυλαμίδιο
- Tris
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl)
- Ammonium persulfate
- TEMED
- Γλυκίνη
- Γλυκερόλη
- Μπλέ της βρωμοφαινόλης
- Coomassie blue R-250 (για χρωματισμό με coomassie blue)
- Μεθανόλη
- Παγωμένο Οξικό οξύ

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα Α (Μητρικό διάλυμα ακρυλαμίδιου), 100 ml

(30% ακρυλαμίδιο, 0,8% δισ-ακρυλαμίδιο)

- 30 g ακρυλαμίδιο
- 0,8 g δισ-ακρυλαμίδιο

Προσθέστε στα παραπάνω απεσταγμένο νερό για να γίνουν 100 ml και αναδεύστε μέχρι να διαλυθεί εντελώς. Δουλέψτε με κουκούλα και κρατήστε το διάλυμα του ακρυλαμίδιου καλυμμένο με Parafilm μέχρι η σκόνη του ακρυλαμίδιου να διαλυθεί εντελώς.

Διάλυμα Β (4× Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού), 100 ml

1,5 M Tris - HCl pH 8,8

- 18,2 g Tris σε 40 ml H₂O
- Προσθέστε HCl σε pH 8,8
- Προσθέστε H₂O μέχρι τα 100 ml

Διάλυμα Γ (4× Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβασης), 100 ml

0,5 M Tris - HCl pH 6,8

- 6,0 g Tris σε 40 ml H₂O
- Προσθέστε HCl σε pH 6,8
- Προσθέστε H₂O μέχρι τα 100 ml

10% Ammonium persulfate, 5 ml

- 0,5 g ammonium persulfate
- 5 ml H₂O

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ηλεκτροδίων, 1 λίτρο

- 3,0 g Tris (25 mM)
- 14,4 g γλυκίνη (192 mM)
- H₂O μέχρι όγκου 1 λίτρο (το τελικό pH θα πρέπει να είναι 8,8)

5× Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος, 10 ml

- 3,1 ml 1 M Tris - HCl pH 6,8 (312,5 mM)
- 5 ml γλυκερόλη (50%)
- 0,5 ml 1% μπλε της βρωμοφαινόλης (0,05%)
- 1,4 ml H₂O

2.2.2.3 Απαιτούμενοι όγκοι για την παρασκευή πηκτών διαφορετικού πάχους (για δυο πηκτές 6 × 8 cm)

Πάχος πηκτής	Πηκτή διαχωρισμού	Πηκτή επιστοίβασης
0,5 mm	5,6 ml	1,4 ml
0,75 mm	8,4 ml	2,1 ml
1,0 mm	11,2 ml	2,8 ml
1,5 mm	16,8 ml	4,2 ml

2.2.2.4 Υπολογισμός για πηκτή διαχωρισμού X% συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης

Διάλυμα A	x/3 ml
Διάλυμα B	2,5 ml
H ₂ O	(7,5 - x/3) ml
10% Ammonium Persulfate	50 μl
TEMED	5 μl (10 μl εάν x < 8%)
Συνολικός όγκος	10 ml

2.2.2.5 Μεταγγίζοντας την πηκτή διαχωρισμού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

- Παράδειγμα για την προετοιμασία πηκτής διαχωρισμού (Για δυο πηκτές διαχωρισμού 8%)

2,7 ml Διαλύματος A
2,5 ml Διαλύματος B
4,8 ml H ₂ O
<hr/>
50 μl 10% Ammonium Persulfate
5 μl TEMED

Οι οδηγίες που αφορούν στην τοποθέτηση και γενικά στον χειρισμό της πηκτής είναι όμοιες σχεδόν με εκείνες της αποδιακτικής πηκτής ηλεκτροφόρησης της προηγούμενης ενότητας. Συμβουλευτείτε την προηγούμενη ενότητα για περισσότερες λεπτομέρειες.

2.2.2.6 Μεταγγίζοντας την πηκτή επιστοίβασης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης

- Παράδειγμα για την προετοιμασία της πηκτής επιστοίβασης (Για δυο πηκτές επιστοίβασης 5%)

0,67 ml Διαλύματος A
1,0 ml Διαλύματος Γ
2,3 ml H ₂ O
<hr/>
30 μl 10% Ammonium Persulfate
5 μl TEMED

Οι οδηγίες που αφορούν στην τοποθέτηση και γενικά στον χειρισμό της πηκτής είναι όμοιες σχεδόν με εκείνες της αποδιακτικής πηκτής ηλεκτροφόρησης της προηγούμενης ενότητας. Συμβουλευτείτε την προηγούμενη ενότητα για περισσότερες λεπτομέρειες.

2.2.2.7 Προετοιμασία Δείγματος

- Χωρητικότητα ανά φρεάτιο (Well) (mini-Gel System)

Πάχος πηκτής	1 Well	5 Wells	10 Wells	15 Wells
0,5 mm	0,7 ml	45 μl	16 μl	9 μl
0,75 mm	1,0 ml	68 μl	24 μl	14 μl
1,0 mm	1,4 ml	90 μl	32 μl	18 μl
1,5 mm	2,1 ml	135 μl	48 μl	27 μl

Οι οδηγίες που αφορούν στην τοποθέτηση και γενικά στον χειρισμό της πηκτής είναι όμοιες σχεδόν με εκείνες της αποδιατακτικής πηκτής ηλεκτροφόρησης της προηγούμενης ενότητας. Συμβουλευτείτε την προηγούμενη ενότητα για περισσότερες λεπτομέρειες.

2.2.2.8 Παραλλαγή: Ηλεκτροφόρηση σε συνεχή πηκτή σε αποδιατακτικές συνθήκες

Η συνεχής πηκτή ηλεκτροφόρησης διαφοροποιείται από τη μη συνεχή από το γεγονός ότι δεν περιλαμβάνει στη δομή της πηκτής το πήγμα επιστοιβάσης. Το σάντουιτς της πηκτής γεμίζεται με διάλυμα πήγματος διαχωρισμού μόνο, πριν η «χτένα» εισαχθεί. Η έλλειψη του πήγματος επιστοιβάσης οδηγεί συχνά σε πυκνές ζώνες με ασαφή και δυσδιάκριτα όρια. Τα ρυθμιστικά διαλύματα για συνεχή πηκτή ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι όμοια με αυτά που έχουν περιγραφεί για ασυνεχή πηκτή, εξαιρουμένων εκείνων που αναφέρονται στην πηκτή επιστοιβάσης.

2.3 Ισοηλεκτρική Εστίαση και πηκτές ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων

2.3.1 Ισοηλεκτρική Εστίαση (Isoelectric Focusing, IF)

2.3.1.1 Εισαγωγή

Η πηκτή ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης υποστηρίζει μια τεχνική που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το ηλεκτρικό τους φορτίο. Σε ουδέτερο pH, στις πρωτεΐνες, αμινοξικά κατάλοιπα αργινίνης, ιστιδίνης και λυσίνης είναι γενικά θετικά φορτισμένα, ενώ κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος και γλουταμινικού οξέος είναι γενικά αρνητικά φορτισμένα. Η ισορροπία μεταξύ αρνητικών και θετικών φορτίων σε ένα πρωτεϊνικό μόριο εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος. Έτσι, σε ένα δεδομένο pH, το μόριο κάθε πρωτεΐνης έχει ορισμένο συνολικό φορτίο, που εξαρτάται από τη συμπεριφορά των καταλοίπων της στη συγκεκριμένη τιμή pH. Η τιμή pH στην οποία το συνολικό θετικό φορτίο μιας πρωτεΐνης είναι ίσο με το συνολικό αρνητικό φορτίο της, με άλλα λόγια, το pH όπου το δίκτυο φορτίων της πρωτεΐνης είναι μηδέν, ισούται με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης. Κατά τη διάρκεια της ισοηλεκτρικής εστίασης, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των πρωτεϊνών, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σε πηκτή με διαβαθμιζόμενη τιμή pH (πηκτή βαθμίδωσης pH). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να φτάσει σε μια θέση στην πηκτή, όπου η τιμή pH, γίνεται ίση με το σημείο pI της πρωτεΐνης. Εκεί το μόριο λόγω μηδενικού φορτίου παύει να κινείται επί του ηλεκτρικού πεδίου. Με δεδομένο ότι η ισοηλεκτρική εστίαση βασίζεται ουσιαστικά στις διαφορές του φυσικού φορτίου των πρωτεϊνικών μορίων, η αξιοπιστία, αλλά και η επαναληψιμότητα της μεθόδου προϋποθέτουν τον προσεκτικό χειρισμό των δειγμάτων, ώστε να αποτραπεί η οιαδήποτε τροποποίηση της χημικής σύνθεσης ή της δομής των μορίων κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας. Επιπλέον, αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών με λιπίδια ή με άλλες πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν τροποποιήσεις φορτίων που θα οδηγήσουν σε τροποποιημένες ισοηλεκτρικές κινητικότητες. Η ισοηλεκτρική εστίαση τυπικά εκτελείται σε σύστημα αποδιατακτικής πηκτής με ουρία, εκτός εάν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης πρόκειται να μελετηθούν ή η πρωτεΐνη πρέπει να διατηρηθεί σε λειτουργική κατάσταση και άρα προϋποτίθεται η διατήρηση της δομής της. Βελτιώσεις στην ευκρίνεια μπορεί να αποκομιστούν με τη χρήση μη ιοντικών απορρυπαντικών.

2.3.1.2 Εξοπλισμός

- Bio-Rad mini-Protean II Gel System ή άλλη συσκευή πλακιδίων για μίνι πηκτή.
- Παροχή ρεύματος (ισχύος 200 V, 500 mA).
- Σύριγγα Hamilton ή μιας χρήσης ακρορύγχια μικροπιπέτας για «φόρτωμα» δείγματος στην πηκτή
- Μικρό δοχείο για διόρθωση και χρωματισμό πηκτής.

2.3.1.3 Προετοιμασία πηκτής ισοηλεκτρικής εστίασης

Αντιδραστήρια

- Ακρυλαμίδιο
- Δις-ακρυλαμίδιο
- Διαλύματα αμφολύτη
- Ουρία
- Ammonium persulfate
- TEMED
- Triton X-100
- 2-Mercaptoethanol
- Μπλε της Βρωμοφαινόλης
- Φωσφορικό οξύ
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
- Χλωριούχο κάλλιο (KCl)
- Τριχλωροξικό οξύ (TCA)
- Coomassie blue R-250
- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ

Μητρικά διαλύματα

Διάλυμα Α

- 30% (w/v) ακρυλαμίδιο,
- 1% (w/v) δις-ακρυλαμίδιο

20% Triton X-100

10% Τριχλωροξικό οξύ

1% Τριχλωροξικό οξύ

1% Μπλε της βρωμοφαινόλης

Χρωστική πηκτής: Coomassie

Ουσία αποχρωματισμού πήγματος Coomassie

Επιλογή αμφολύτη

Οι αμφολύτες είναι επαμφοτερίζουσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την ανάμειξη με πρωτεϊνικά μόρια με παραπλήσια ισοηλεκτρικά σημεία. Αποτελούνται από oligοπεπτίδια και oligο-καρβόξυοξέα, μοριακού βάρους από 0,6 ως 0,9 kDa. Οι Guilian *et al.* (1983) έχουν διαμορφώσει έναν πίνακα μειγμάτων αμφολυτών για χρήση στην προετοιμασία των πηκτών ισοηλεκτρικής εστίασης διαφορετικών κλιμάκων pH:

Κλίμακα pH πηκτής	Κλίμακα pH αμφολύτη	% αμφολ. στο μείγμα
pH 3,5-10	pH 3,5-10	2,4%
pH 4-6	pH 3,5-10	0,4%
	pH 4-6	2%
pH 6-9	pH 3,5-10	0,4%
	pH 6-8	1%
	pH 7-9	1%
pH 9-11	pH 3,5-10	0,4%
	pH 9-11	0,4%

Μορφοποίηση πηκτής

Παράδειγμα προετοιμασίας αποδιατακτικής πηκτής ισοηλεκτρικής εστίασης: (Για 2 μίνι πηκτές 8 cm × 7 cm × 0.75 mm, προετοιμάστε 12 ml). Το παράδειγμα αφορά σε βαθμίδωση pH 4-6.

5,4 ml H ₂ O
2,0 ml Διάλυμα Α
48 ml διάλυμα αμφολύτη, pH 3,5-10
240 ml διάλυμα αμφολύτη pH 4-6
6,0 g ουρία υψηλής καθαρότητας
<hr/>
25 ml 10% ammonium persulfate
20 ml TEMED

Προσοχή: Μην προσθέσετε TEMED μέχρι να βρεθείτε στο κατάλληλο σημείο (#4) στις αριθμημένες οδηγίες παρακάτω.

1. Συναρμολογήστε τα πλακίδια της πηκτής συμφωνά με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
2. Αναμείξτε ουρία, νερό, διάλυμα Α και διάλυμα αμφολύτη σε μια μικρή κωνική φιάλη. Φορέστε γάντια ενώ δουλεύετε με το ακρυλαμίδιο. Η ουρία διαλύεται πολύ πιο γρήγορα εάν το διάλυμα είναι ελαφρώς ζεστό.
3. Προσθέστε ammonium persulfate και TEMED, και αναδεύστε ήπια. Έπειτα, μεταφέρετε άμεσα το διάλυμα του ακρυλαμιδίου στα συναρμολογημένα πλακίδια της πηκτής, φροντίζοντας να χύνεται αργά κατά μήκος του διαχωριστή έτσι ώστε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα. Γεμίστε τα πλακίδια της πηκτής μέχρι την άκρη με διάλυμα ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός είναι σε εξέλιξη σε αυτό το σημείο και είναι σημαντικό να δουλέψετε πάρα πολύ γρήγορα.
4. Εισάγετε τη «χτένα» έτσι που τα δόντια της να είναι περιτριγυρισμένα από πηκτή. Προσέξτε να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα στα δόντια της «χτένας».
5. Αφήστε την πηκτή να πολυμεριστεί (περίπου 1 ώρα) και αφαιρέστε προσεκτικά τη «χτένα».
6. Εισάγετε τις πηκτές στο δοχείο ηλεκτροφόρησης. Πριν φορτώσετε το δείγμα της πρωτεΐνης ελέγχετε την ακρίβεια της συναρμολόγησης, ώστε να διασφαλιστεί η απουσία διαρροών στον θάλαμο πλήρωσης με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

2.3.1.4 Προετοιμασία και φόρτωση δείγματος

Χωρητικότητα ανά well (Bio-Rad mini-Gel System) (από Robertson *et al.*, 1987)

Πάχος πηκτής	1 Well	5 Wells	10 Wells	15 Wells
0,5 mm	0,7 ml	45 μl	16 μl	9 μl
0,75 mm	1,0 ml	68 μl	24 μl	14 μl
1,0 mm	1,4 ml	90 μl	32 μl	18 μl
1,5 mm	2,1 ml	135 μl	48 μl	27 μl

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (2×), σε αποδιατακτική πηκτή για βαθμιδωτό pH 4-6,5

- 2,4 g Ουρίας (8 M)
- 20 ml διάλυμα αμφολύτη, pH 3,5 - 10
- 100 ml διάλυμα αμφολύτη pH 4 - 6
- 500 ml 20% Triton-X (2%)
- 50 ml 2-mercaptoethanol (1%)
- 1,7 ml απεσταγμένο νερό
- 200 ml 1% μπλε της βρωμοφαινόλης

Βήματα

1. Αναμείξτε το δείγμα της πρωτεΐνης με ίσο όγκο του $2 \times$ ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης. Πριν μεταφέρετε το δείγμα στην πηκτή, φυγοκεντρείτε στα $10.000 \times g$ (σε μια συσκευή φυγοκέντρησης Eppendorf).
2. Τοποθετήστε το δείγμα της πρωτεΐνης στον πάτο του well με μια σύριγγα Hamilton ή με πιπέτα τύπου Gilson.

2.3.1.5 Πειραματική διαδικασία ισοηλεκτρικής εστίασης

Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης (Running buffers)

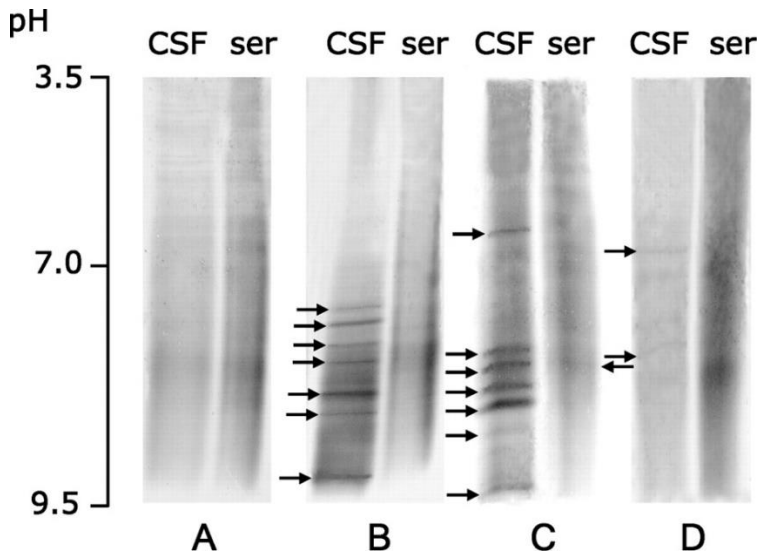
1. Προσθέστε διάλυμα 20 mM υδροξειδίου του νατρίου γύρω από την κάθοδο στο ανώτερο τμήμα του δοχείου ρυθμιστικού διαλύματος.
2. Προσθέστε διάλυμα 10 mM φωσφορικού οξέος στο κατώτερο τμήμα του δοχείου ρυθμιστικού διαλύματος.
3. Τα παραπάνω διαλύματα πρέπει να είναι φρέσκα, προερχόμενα από 1 M αποθηκευμένου μητρικού διαλύματος.

Συνθήκες Εστίασης (από Robertson *et al.*, 1987)

1. Συνδέστε τα ηλεκτρόδια.
2. «Τρέξτε» για 30 λεπτά στα 150 V (σταθερή τάση).
3. Έπειτα ρυθμίστε στα 200 V για 2,5 ώρες (σταθερή τάση). Το ρεύμα θα είναι περίπου 10 mA στην αρχή και θα μειωθεί κατά τη διάρκεια της εστίασης. Ο εσωτερικός θάλαμος θα θερμανθεί στους 40 – 50 °C κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

2.3.1.6 Χειρισμοί μετά την ισοηλεκτρική εστίαση – χρώση - αποχρωματισμός πηκτής

1. Τοποθετήστε τις πηκτές σε 10% τριγλωροξικό οξύ (TCA) για 10 λεπτά.
2. Αντικαταστήστε με 1% TCA και διαποτίστε για τουλάχιστον 2 ώρες (για να απομακρυνθούν οι αμφολύτες). Η διαπότιση για όλη τη νύχτα διασφαλίζει τη μείωση του χρωματισμού των αμφολυτών στο επόμενο στάδιο.
3. Χρωματίστε την πηκτή για 10 λεπτά σε διάλυμα χρώσης Coomassie υπό ήπια ανάδευση.
4. Αφαιρέστε τη χρωστική Coomassie και αντικαταστήστε με διάλυμα αποχρωματισμού. Αντικαταστήστε το διάλυμα αποχρωματισμού αρκετές φορές, αφήνοντας τον αποχρωματισμό να εξελιχθεί όλη τη νύχτα.
5. Η πηκτή μπορεί να στεγνώσει όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Μία τυπική πηκτή παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.5.



Εικόνα 2.5 Εικόνα πηκτής έπειτα από εφαρμογή ισοηλεκτρικής εστίασης. Οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται κατά μήκος της βαθμίδωσης PH (3,5 – 9,5), ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο.

2.3.2 Πηκτές ηλεκτροφόρησης δυο διαστάσεων (2D electrophoresis gels)

2.3.2.1 Εισαγωγή

Η δεύτερη διάσταση της ηλεκτροφόρησης στις δυο διαστάσεων ηλεκτροφορήσεις πηκτής, περιλαμβάνει έναν κλασικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS - πολυακρυλαμιδίου. Μια λωρίδα πηκτής ή μια πηκτή από σωλήνα, προερχόμενες από ισοηλεκτρική εστίαση (αποτελεί την πρώτη διάσταση του διαχωρισμού) εφαρμόζεται στην κορυφή πηκτής SDS - πολυακρυλαμιδίου και οι πρωτεΐνες σε κάθε ζώνη ισοεστίασης διαχωρίζονται περαιτέρω σύμφωνα με τη μοριακή τους μάζα. Η εξισορρόπηση της πηκτής ισοεστίασης είναι απαραίτητη πριν τη διεξαγωγή της SDS ηλεκτροφόρησης, δεύτερης διάστασης. Αν και δεν χρειάζεται κανένας ειδικός εξοπλισμός, ένας αριθμός συσκευών πηκτών ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων είναι εμπορικά διαθέσιμος.

2.3.2.2 Εξοπλισμός

- Bio-Rad mini-Protean II δοχείο εκτέλεσης της ηλεκτροφόρησης
- Παροχή ισχύος (200 V, 500 mA)
- Δοχείο χρωματισμού και αποχρωματισμού πηκτής

2.3.2.3 Πειραματική διαδικασία

Εάν η δεύτερης διάστασης ανάλυση πρόκειται να γίνει αμέσως μετά την ισοηλεκτρική εστίαση, παρασκευάστε και μορφοποιήστε 1,0 ή 1,5 mm πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου ταυτόχρονα με την παρασκευή της πηκτής ισοεστίασης. Αντί να τοποθετήσετε μια «χτένα» στην πηκτή επιστοίβασης, αφήστε περίπου 0,5 cm πάνω από το πήγμα επιστοίβασης και πληρώστε τον χώρο πολύ προσεκτικά με νερό.

1. Εκτελέστε την ισοηλεκτρική εστίαση.
2. Μετά την εστίαση, κόψτε μια λωρίδα πηκτής πλάτους 0,5 cm και τοποθετήστε την σε ένα μικρό δοχείο για εξισορρόπηση.
3. Εξισορρόπηση.

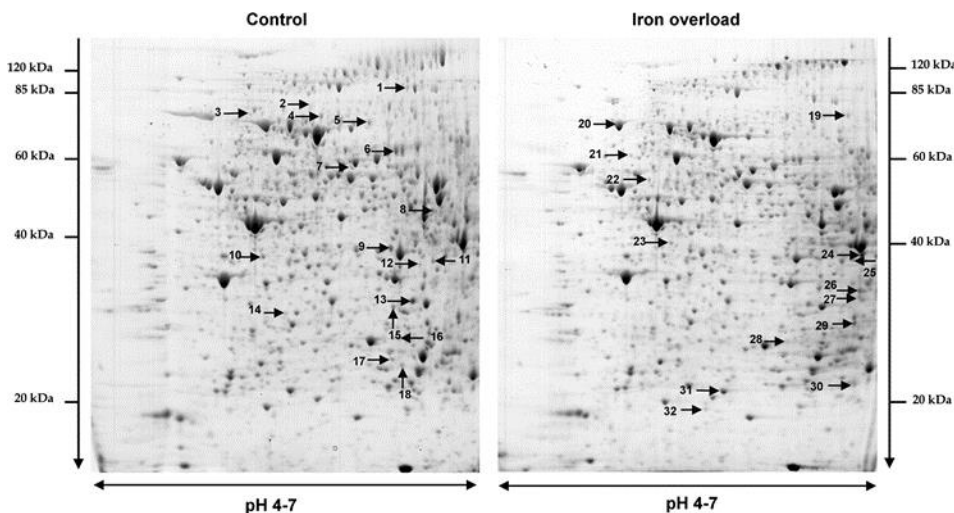
Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, 100 ml

- 5 ml 2-Mercaptoethanol (5%)
- 6,25 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) (62,5 mM)

- 11,5 ml 20% SDS (2,3%)
 - 10 ml γλυκερόλη (10%)
 - H₂O μέχρι όγκου 100 ml
4. Προσθέστε ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης στις λωρίδες από την IEF πηκτή.
 5. Επώαστε για 15-30 λεπτά.
 6. Τα τμήματα μπορούν άμεσα να τοποθετηθούν στην πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου ή να ψυχθούν και αποθηκευτούν στους -80 °C.

Ηλεκτροφόρηση

1. Αφαιρέστε το νερό που επικαλύπτει το πήγμα επιστοιίβασης με αναρρόφηση.
2. Επικαλύψτε το πήγμα επιστοιίβασης με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων.
3. Φορώντας γάντια και προσέχοντας να μην καταστρέψετε την πηκτή, τοποθετήστε τη λωρίδα της πηκτής ισοεστίασης πάνω στην πηκτή επιστοιίβασης.
4. Προχωρήστε με ηλεκτροφόρηση της πηκτής και χρώση-αποχρωματισμό όπως περιγράψαμε στο Κεφάλαιο 2 (τυπική ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου). Στην εικόνα 2.6 παρουσιάζονται πηκτές δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης έπειτα από χρώση με Coomassie και νιτρικό άργυρο.



Εικόνα 2.6 Ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων σε πηκτή. Μια λωρίδα πηκτής ή μια πηκτή από σωλήνα, που προέρχονται από ισοηλεκτρική εστίαση εφαρμόζεται στην κορυφή πηκτής SDS - πολυακρυλαμιδίου και οι πρωτεΐνες σε κάθε ζώνη ισοεστίασης διαχωρίζονται περαιτέρω σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Βιβλιογραφία

- Allen, R. L., & Olins, D. E. (1984). Cytochemistry of the chromatin replication band in hypotrichous ciliated protozoa staining with silver and thiol-specific coumarin maleimide. *Chromosoma*, 91(1), 82-86.
- Ball, E. H. (1986). Quantitation of proteins by elution of Coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 155(1), 23-27.
- Blackshear, P. J. (1984). Systems for polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in enzymology*, 104, 237-255.
- Giulian G.G, Moss R.L, Greaser M. (1983). Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. *Anal Biochem*. 129(2): 277-287.

- Giulian, G. G., Moss, R. L., & Greaser, M. (1984). Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Analytical biochemistry*, 142(2), 421-436.
- Gooderham, K. (1984). High-sensitivity silver staining of proteins following polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteins* (pp. 113-118). Humana Press.
- Hames, B. D. (1981). Peptide mapping by limited proteolysis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in *Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach*, BD Hames and D. Rickwood, eds., Oxford IRL Press.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680 - 685.
- Marshall, T., & Williams, K. M. (1984). Artifacts associated with 2-mercaptoethanol upon high resolution two-dimensional electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 139(2), 502-505.
- Otto, M., & Šnejdárková, M. (1981). A simple and rapid method for the quantitative isolation of proteins from polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 111(1), 111-114.
- Robert Schleif and Pieter Wensink (1981). *Practical Methods in Molecular Biology*. New York: Springer-Verlag
- Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J., & Reeves, H. C. (1987). Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Analytical biochemistry*, 167(2), 290-294.
- Smith, B. J. (1984). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Proteins* (pp. 41-55). Humana Press.
- Strålfors, P., & Belfrage, P. (1983). Electrophoretic elution of proteins from polyacrylamide gel slices. *Analytical biochemistry*, 128(1), 7-10.
- Weber, K., & Kuter, D. J. (1971). Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 246(14), 4504-4509.