

ANDRZEJ KALINOWSKI, SŁAWOMIR BARTKOWIAK

UPROSZCZONY APARAT DO ELEKTROFOREZY NA PŁYTACH POLIAKRYLAMIDOWYCH

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym jest wygodną metodą rozdziału i porównywania różnych substancji. Najczęściej technikę tę stosuje się do rozdziału białek i enzymów. Porównania dużej liczby prób najwygodniej przeprowadza się w aparatach płytowych. Przeprowadzając rozdział na tej samej płycie żelu zapewnia się takie same warunki rozdziału wszystkich prób, a co za tym idzie możliwie dokładne porównanie składu białkowego. Jest to szczególnie ważne w badaniach struktury genetycznej populacji roślinnych, gdzie porównuje się wyniki analiz poszczególnych osobników. Aparat, który byłby prosty w obsłudze i zapewniał możliwość jednoczesnego przeprowadzenia rozdziałów kilkudziesięciu prób w warunkach powtarzalnych i porównywalnych oddaje w tych badaniach ogromne usługi. Przedstawiony poniżej aparat skonstruowano przez wprowadzenie szeregu uproszczeń i zmian w modelach dotychczas opisanych (Reid, Bielecki 1968, Studier 1973).

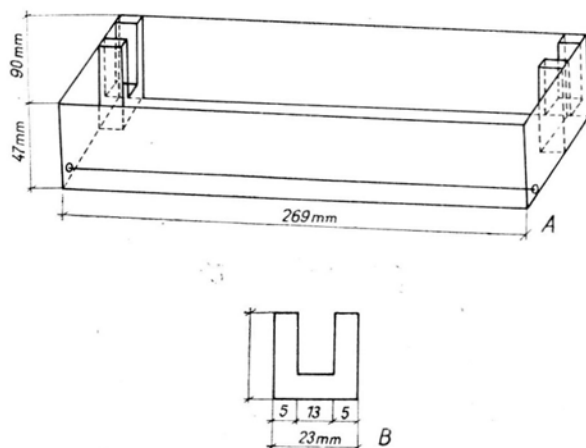
Górna komora buforowa jest połączona na stałe z jedną z płytek będącą równocześnie jedną ze ścian pomieszczenia na żel poliakrylamidowy. W aparacie istnieje możliwość zwielokrotnienia miejsc startowych przez dołączenie kolejnych płytek z żelem. Do wytworzenia miejsc startowych służą „grzebień” z zębami o różnej gęstości i szerokości zależnie od potrzeb.

Płyty z plexi są zarówno płytami nośnymi dla górnej komory buforowej jak i ograniczającymi komory żelowe. Po rozdziale na jednej płycie, żel można wybarwiać na jeden enzym lub też po przecięciu płytki na kilka różnych enzymów.

Stosowanie płyt z plexi zamiast szklanych ułatwia wyjmowanie żelu poliakrylamidowego po rozdziale. Plexi ma dostateczną własność adhezyjną dla stosowanego w rozdziałach białek żelu (5%, 7,5%, 10% akrylamidu). W wypadku stosowania żeli o mniejszych stężeniach wystarcza wytworzyć na dolnym brzegu płytki dodatkową 10 mm warstwę 10% żelu poliakrylamidowego. Zabezpiecza to w zupełności przed wylaniem się niskoprocentowego żelu.

Opis aparatu

A. KOMORA DOLNA (ryc. 1, fot. 1D)



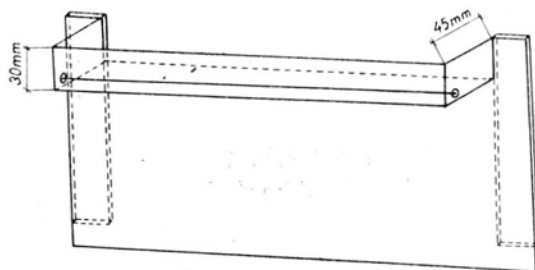
Ryc. 1 A — komora dolna, B — prowadnica

Wewnątrz wzdłuż jednej ze ścian biegnie platynowa elektroda, która może być wyjmowana lub umocowana na stałe. Na ściankach bocznych znajduje się prowadnica w kształcie litery „U”, w którą wsuwa się górną część aparatu.

B. CZĘŚĆ GÓRNA APARATU

Część górna aparatu składa się ze ścianki przedniej z przymocowaną na stałe komorą na bufor elektrodowy, ścianki tylnej i jednej lub więcej ścianek pośrednich.

1. Ścianka przednia z komorą na bufor elektrodowy (rys. 2, fot. 1A)



Ryc. 2 Ścianka przednia z komorą na bufor elektrodowy

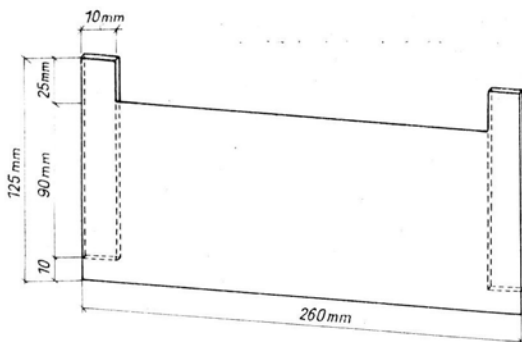
Ścianka przednia jest płytką z plexi o grubości 4 mm. Tworzy ona jedną ze ścian naczynia na żel poliakrylamidowy. Płytkę ta od góry wycięta jest w kształcie litery „U” i po jednej stronie ma przyklejoną górną komorę elektrodową. Wzdłuż jednej ze ścian komory biegnie platynowa elektroda. Podobnie jak w komorze dolnej

może ona być ruchoma lub też przymocowana na stałe. Po drugiej stronie płytki naklejono na brzegach paski z plexi o szerokości 10 mm. i grubości 2 mm, które kończą się 1 cm powyżej dolnej krawędzi płytki.

2. Ścianka tylna (fot. 1C)

Ściankę tylną stanowi płytka z plexi o wymiarach $125 \times 260 \times 4$ mm. Jest ona zarazem jedną ze ścian komory na żel poliakrylamidowy i komory na bufor elektrodowy.

3. Płytką pośrednia (rys. 3, fot. 1B)



Ryc. 3 Płytką pośrednia

Płytką pośrednią ma grubość 2 mm. Ma ona kształt i wymiary płytki przedniej bez komory elektrodowej.

Składanie aparatu i wytwarzanie żelu

Przed złożeniem aparatu brzegi płytek należy powlec cienką warstwą smaru silikonowego by uniemożliwić wyciekanie roztworu akrylamidu przed jego spolimeryzowaniem. Następnie odpowiednio złożone płytki zaciska się na bokach klamrami zaciskowymi (fot. 1H). Od dołu pomiędzy płytki wsuwa się 2 mm grubości pasek z plexi (fot. 1F) zamykając tym samym dno komory na żel. Dolne brzegi zabezpiecza się także klamrami zaciskowymi. Do tak przygotowanego aparatu wlewa się odpowiednią ilość roztworu do polimeryzacji. Górną powierzchnię roztworu akrylamidu pokrywa się warstwą wody. Po polimeryzacji usuwa się wodę z górnej powierzchni żelu przez przechylenie aparatu, przemywa odpowiednim buforem i wlewa roztwór akrylamidu celem wytworzenia żelu górnego. Z kolei do roztworu wkłada się odpowiedni grzebień (fot. 1G) i pozostawia do polimeryzacji. Po spolimeryzowaniu żelu górnego należy ostrożnie wyjąć grzebień. Trzeba podkreślić, że grzebienie powinny mieć zawsze gładkie i czyste powierzchnie.

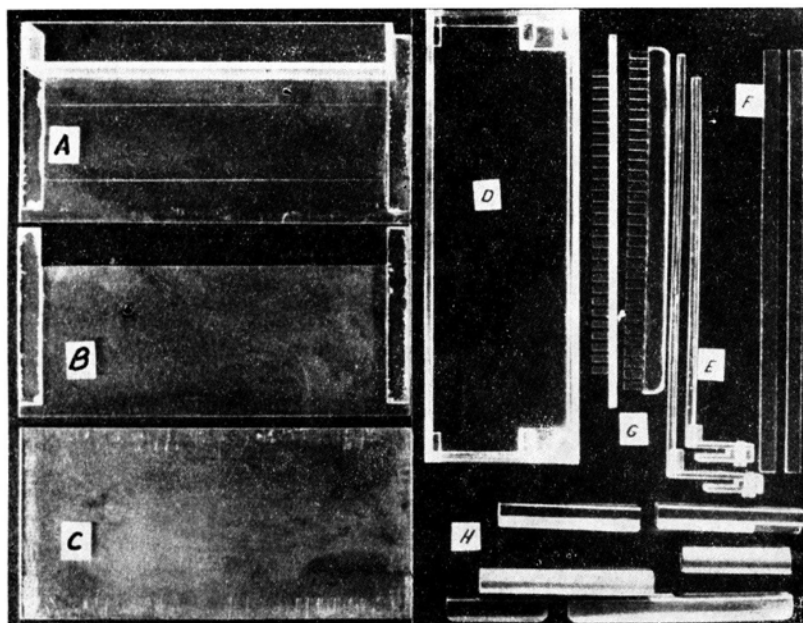
Po wykonaniu wyżej opisanych czynności zdejmuje się klamry z dolnego brzegu płytek, usuwa ruchome wkładki i górną część aparatu umieszcza się w prowadnicy

komory dolnej. Z kolei obydwie komory napelnia się buforem elektrodowym. W komorze dolnej usuwa się powietrze z powierzchni żelu za pomocą strzykawki lekarskiej o zagiętej igle, a następnie do wytworzonych kieszeni w żelu górnym nanosi się próbki do rozdziału. Po zakończonym rozdziale (4 godz., 50 mA/płytkę, 7V/cm) rozkładamy aparat. W przypadku wybarwiania na płycie różnych enzymów, płytę żelu poliakrylamidowego można odpowiednio pociąć nożem ze stali nierdzewnej i każdy segment odpowiednio wybarwiać.

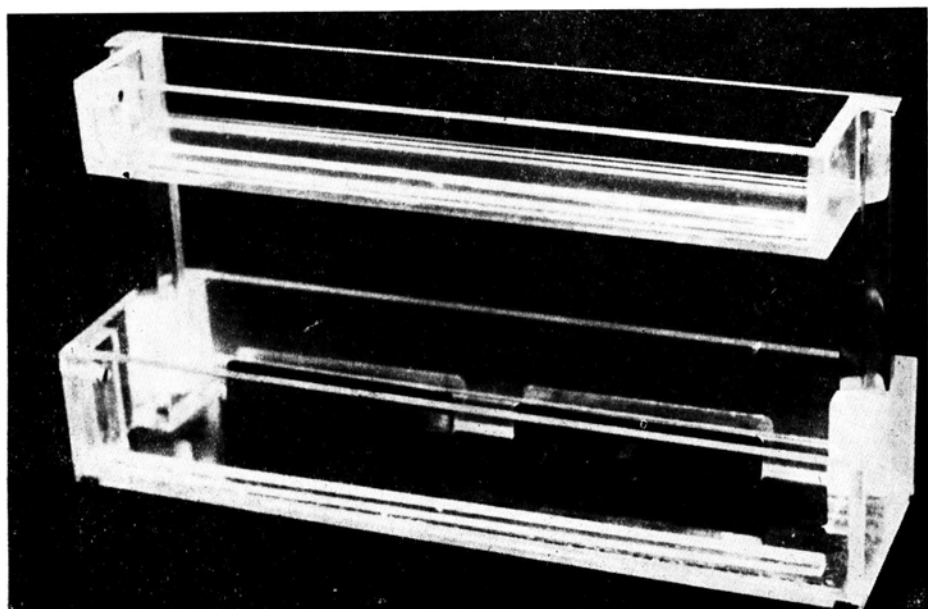
LITERATURA

- Reid M. S., Bielecki R. L. — 1968 *Analitical Biochemistry* 22, (364—371)
Studier W. — 1973 *Journal Molecular Biology* 79, (237—248)

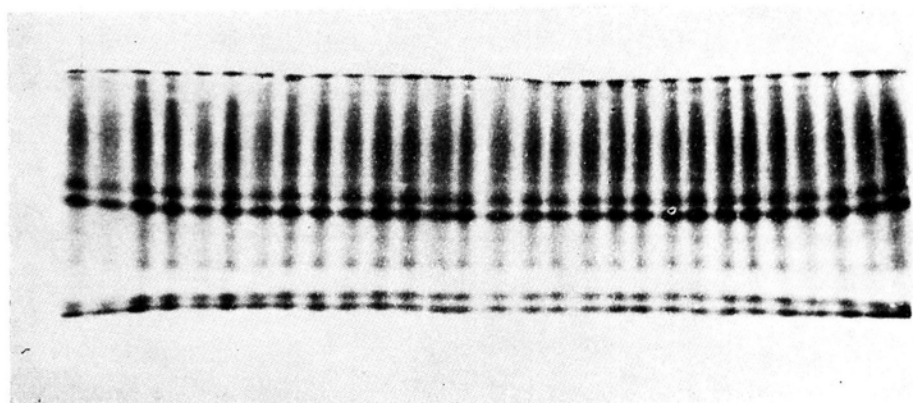
Zakład Genetyki Roślin PAN, Poznań



Fot. 1 Rozłożony aparat do elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. A — ścianka przednia z komor, na bufor elektrodowy, B — ścianka pośrednia, C — ścianka tylna, D — komora dolna. E — elektrody, F — paski z plexi do zamknięcia od dołu komór na żel, G — grzebień, H — klamry zaciskowe



Fot. 2 Złożony aparat do elektroforezy na żelu poliakrylamidowym



Fot. 3 Rozdział białka u grochu