



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
Τμήμα Βιολογίας  
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

ΜΑΘΗΜΑ: «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ»

Εργαστηριακή άσκηση:

«ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-  
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ»

Δρ. Μ. Χ. Αντωνέλου  
Αν. Καθ. Ι. Σ. Παπασιδέρη

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης ( $v$ ) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης ( $z$ ) και το συντελεστή τριβής ( $f$ ).

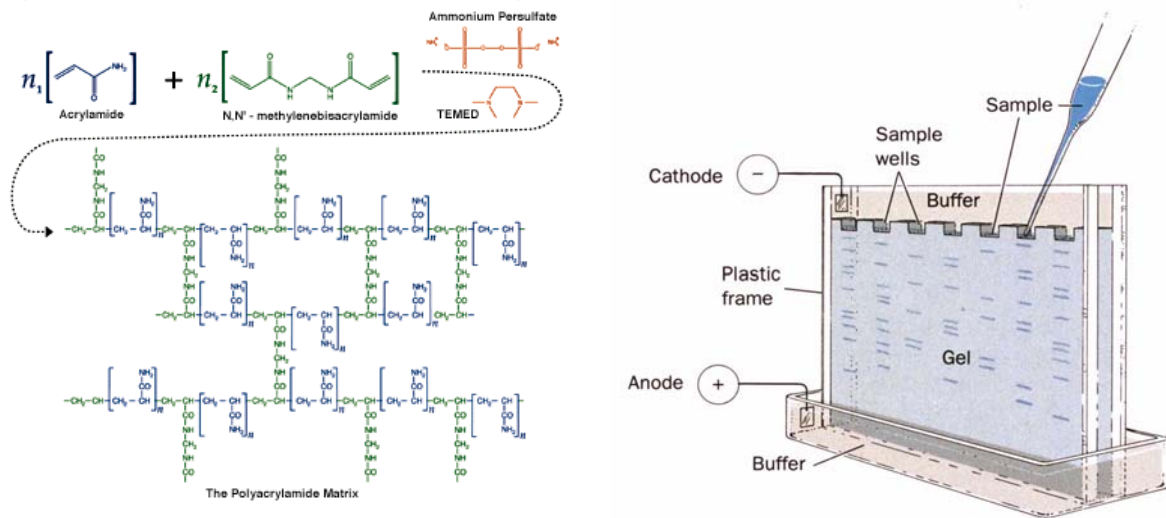
$$v = Ez / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη  $Ez$  που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετο φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής  $f$  εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε **πήκτωμα** και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τριοδιάστατο πλέγμα από μακρές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενοδισ-ακρυλαμίδης (**MBA**) (**Εικ. 1, αριστερά**). Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των **μονομερών ακρυλαμίδης** και **MBA**, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο **πολυμεριστικών παραγόντων**: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, **APS**) και του **TEMED** (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το **APS**. Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA (%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη

σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδη. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.



**Εικόνα 1. Αριστερά:** Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμίδης. **Δεξιά:** πηκτώμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται κυρίως με βάση διαφορές στο φορτίο (ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης), στη μάζα ή σε διάφορες άλλες φυσικές ιδιότητες των μορίων. Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε **αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)** οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης **μερκαπτοαιθανόλη** ή **διθειοθρεϊτόλη**, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με **θέρμανση**.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (**Εικ. 1, δεξιά**). Η απόσταση μετακίνησης των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες σε ομοιογενή πηκτώματα ( $R_f$ ) είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. σε πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση **από την κάθοδο προς την άνοδο (Εικ. 1, δεξιά)**. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής διαδρομής (που κρίνεται από το μέτωπο του διαλύτη) οι πρωτεΐνες στο πηκτώμα εμφανίζονται με χρώση **κυανού του Coomassie**, χρώση αργύρου, ή χρώση ειδική για τα σιαλικά οξέα των γλυκοφορινών. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευτούν με ραδιενεργή σήμανση και εμφάνισή τους σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

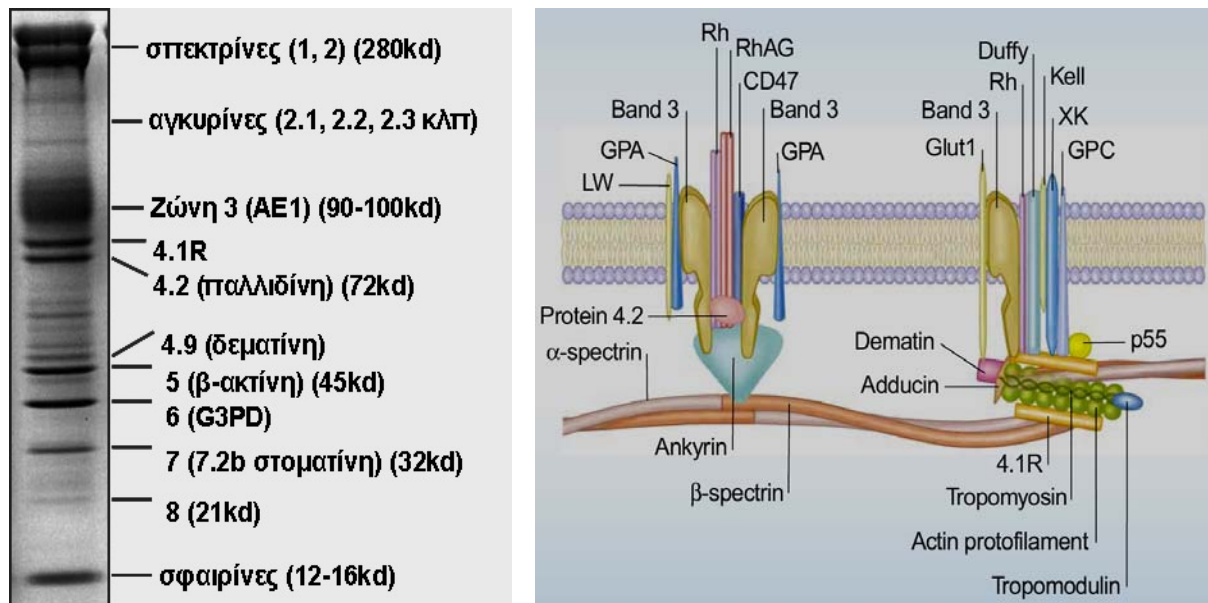
Το «καλούπι» στο οποίο σχηματίζεται το πηκτώμα μπορεί να είναι είτε μικροί κυλινδρικοί σωληνες είτε ένα sandwich επίπεδων τζαμιών (ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια ή επίπεδη, **Εικ. 1**). Η ηλεκτροφόρηση σε σωληνάκια χρησιμοποιείται κυρίως για ισοηλεκτρική

εστίαση που προηγείται του αποδιατακτικού διαχωρισμού στις δυσδιάστατες ηλεκτροφορήσεις. Το φόρτωμα των δειγμάτων γίνεται είτε στην επιφάνεια των σωλήνων, είτε σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (slots) που δημιουργούνται σε πήκτωμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής «χτένας» (**Εικ. 1**), όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η επίπεδη ηλεκτροφόρηση έχει το πλεονέκτημα ότι όλα τα δείγματα διαχωρίζονται στο ίδιο πήκτωμα, συνεπώς στις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης ακρυλαμίδης, θερμοκρασίας κλπ κι έτσι είναι περισσότερο αξιόπιστη η ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των ζωνών μεταξύ τους. Σε περιπτώσεις ανάλυσης σύνθετων πρωτεϊνικών δειγμάτων που χαρακτηρίζονται από μεγάλες διαφορές στα μοριακά τους βάρη, ή σε περιπτώσεις άγνωστων δειγμάτων, επιλέγεται ο διαχωρισμός σε πήκτωμα **γραμμικής ή εκθετικής κλίσης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης**. Τέτοια πήκτωμα παρασκευάζονται με τη βοήθεια του κατασκευαστή κλίσης (gradient maker). Για γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης ακρυλαμίδης τοποθετούνται ίσοι όγκοι πυκνού και αραιού διαλύματος σε δύο ανεξάρτητους χώρους της συσκευής και με τη σταδιακή τους ανάμειξη προκύπτει το πήκτωμα κλίσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι **ασυνεχής** (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πήκτωμα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (**stacking gel**) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα **πήκτωμα διαχωρισμού** (**separating** ή **resolving gel**) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, το πήκτωμα πακεταρίσματος δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (**running buffer**) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με SDS είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική (αναλυτική) ικανότητα. Οι απαιτούμενες ποσότητες των πρωτεϊνών είναι μικρές: περίπου 0,1 μg για χρώση με Coomassie και ακόμη λιγότερο (0,02 μg) όταν χρησιμοποιείται χρώση αργύρου. Πρωτεΐνες που διαφέρουν στη μάζα τους κατά 2 % (π.χ. 40 και 41 kd, διαφορά 10 αμινοξέων) μπορούν εύκολα να διαχωριστούν σε κατάλληλο ηλεκτροφορητικό σύστημα. Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε σύστημα SDS-PAGE χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του MB και της σχετικής ποσότητας (αφθονία) πρωτεϊνικών μορίων σε ένα δείγμα, αλλά και για τον καθορισμό της κατανομής πρωτεϊνών σε διάφορα βιοχημικά εκχυλίσματα ιστών και κυττάρων (**Εικ. 3**). Είναι επίσης απαραίτητο βήμα για άλλες τεχνικές όπως το ανοσοαποτόπωμα Western και η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση.

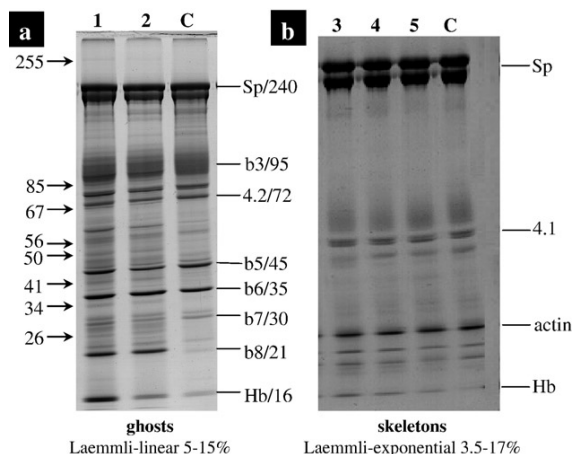
## **A2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ**

Οι κύριες πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης αρχικά ονοματίστηκαν με βάση τη σειρά κατάταξής τους σε ηλεκτροφορητικά πήκτωμα SDS-PAGE από την κάθοδο προς την άνοδο (ζώνη-1, ζώνη-2 κλπ). Αργότερα, όταν ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν οι ιδιότητες και λειτουργίες τους, οι περισσότερες ονοματίστηκαν εκ νέου (πχ. ζώνη-2 σε αγκυρίνη, ζώνη-5 σε β-ακτίνη κλπ). Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είχαν ήδη ταυτοποιηθεί σε μη-ερυθροειδικά κύτταρα, ενώ άλλες χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά στα ερυθροκύτταρα μέχρι αργότερα να ανιχνευτούν σε άλλα κύτταρα, ιστούς και οργανίδια. Στην **Εικ. 2** (αριστερά), παρατίθενται οι κυριότερες πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης.



**Εικόνα 2.** Αριστερά: Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός κύριων πρωτεϊνών ερυθροκυτταρικής μεμβράνης σε πήκτωμα κλίσης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης 5-15% κατά Laemmli, ύστερα από χρώση με Coomassie blue. Δεξιά: Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης. Η πλασματική μεμβράνη του ερυθροκυττάρου συνδέεται στο δυσδιάστατο κυτταροσκελετικό δίκτυο των περιφερειακών πρωτεϊνών σε συγκεκριμένα σημεία πρόσδεσης. Κάτω δεξιά διακρίνεται το σύμπλοκο ζεύξης. (Ανατύπωση από Mohandas and Gallagher, 2008).

Η **σπεκτρίνη** αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του υπομεμβρανικού σκελετού. Είναι ένα γραμμικό πολυπεπίδιο μεγάλου MB το οποίο συγκροτείται στα κύτταρα ως τετραμερές, αποτελούμενο από δύο α- και δύο β-υπομονάδες ( $\alpha_2\beta_2$ ). Η μοριακή δομή της σπεκτρίνης της επιτρέπει να συμπεριφέρεται ως ελατήριο, ακολουθώντας τις απαραίτητες ελαστικές τροποποιήσεις του σχήματος των ερυθροκυττάρων. Τα τετραμερή της σπεκτρίνης σχηματίζουν εκτεταμένα εξαγωνικά δίκτυα τα οποία συνδέονται με τη μεμβράνη κυρίως διαμέσου **αγκυρίνης** (215kDa), που αποτελεί πρωτεΐνη-συνδέτη (προσαρμοστή) (**Εικ. 2**). Η αγκυρίνη συνδέεται άμεσα με την κύρια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ερυθροκυττάρου που είναι η **Ζώνη-3** ή ανιοντοανταλλάκτης-1 (AE1, 90-100kDa). Η σύνδεση αγκυρίνης-Ζώνης-3 φαίνεται να ισχυροποιείται από μία άλλη περιφερειακή πρωτεΐνη, την **παλλιδίνη** ή **πρωτεΐνη 4.2** (72kDa). Η σπεκτρίνη συνδέεται επίσης με μία άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, την **γλυκοφορίνη C** (25kDa, που δε διακρίνεται στο πήκτωμα της Εικόνας 2 γιατί χρειάζεται ειδική χρώση), διαμέσου ενός άλλου περιφερειακού συστατικού, της **πρωτεΐνης 4.1R** (78kDa). Έτσι, το δίκτυο του κυτταροσκελετού συνδέεται με τη λιπιδική διλοστοιβάδα και τις πρωτεΐνες της με περισσότερες της μιας εξειδικευμένες συνδέσεις (**Εικ. 2**, δεξιά). Η πρωτεΐνη 4.1R σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της σπεκτρίνης με την **ακτίνη** (β-ισομορφή, MB 43kDa) στα **σύμπλοκα ζεύξης** της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (τα οποία συγκροτούν κυρίως οι πρωτεΐνες σπεκτρίνη-ακτίνη-4.1R). Το ίδιο κάνει και η πρωτεΐνη **αδουσίνη** (ισομορφές MB 100 και 105kDa). Η β-ακτίνη σχηματίζει κοντά πρωτονημάτια στις αύλακες που σχηματίζει η **τροπομουσίνη** (ισομορφές 27 και 29kDa). Φαίνεται ότι οι ιδιότητες των ισομορφών της ερυθροκυτταρικής τροπομουσίνης καθορίζουν σε συνδυασμό με την τροπομοντουλίνη, το μήκος των ινιδίων της ακτίνης σε αυτό των 14-16 μονομερών. Η **τροπομοντουλίνη** συνδέεται με την ακτίνη στο ένα άκρο της δέσμης των ινιδίων και η αδουσίνη στο άλλο (πρωτεΐνες «κάλυψης» ινιδίων ακτίνης). Η πρωτεΐνη 4.9 γνωστή ως **δεματίνη** (48kDa) λειτουργεί στο πακετάρισμα της ακτίνης σε δέσμες.



**Εικόνα 3.** Ανάλυση πρωτεϊνών ολικής ερυθροκυτταρικής μεμβράνης (**a**) και απομονωμένων κυτταροσκελετών (**b**) από φυσιολογικά άτομα (C, control) και ασθενείς με κληρονομική σφαιροκυττάρωση (1-5) σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE κατά Laemmli, ύστερα από χρώση με Coomassie blue. Τα πηκτώματα είναι γραμμικής (α) ή εκθετικής (β) κλίσης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης. Είναι σαφείς τόσο οι μεταβολές στην πρωτεϊνική έκφραση (ένταση πρωτεϊνικών ζωνών) όσο και η παρουσία έκτοπων ζωνών στη μεμβράνη και τους σκελετούς των ασθενών (Ανατόπωση από Margetis et al., 2007)

Οι πρωτεΐνες της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης εμφανίζουν λειτουργική ετερογένεια. Άλλες έχουν αμιγώς δομικό ρόλο, άλλες είναι μεταφορείς, άλλες ένζυμα κλπ. Περίπου 25 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες καθορίζουν τα αντιγόνα των ομάδων αίματος. Σημαντικές πρωτεΐνες μεταφορείς είναι η Ζώνη-3 (ανιοντοανταλλάκτης), η υδατοπορίνη 1 (aquaporin, μεταφορέας νερού), ο μεταφορέας γλυκόζης (**Glut1**), η πρωτεΐνη του αντιγόνου Kidd (μεταφορέας ουρίας), η **RhAG** (μεταφορέας αερίων, πιθανόν διοξειδίου του άνθρακα), η ATP-άση  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  κλπ. Οι πρωτεΐνες Ζώνη-3, RhAG και Glut1 διαδραματίζουν επίσης σημαντικό δομικό ρόλο καθώς συνδέουν τη διπλοστοιβάδα με τον υποκείμενο σκελετό διαμέσου αλληλεπιδράσεων με την αγκυρίνη (**Εικ. 2**), ενώ οι πρωτεΐνες **γλυκοφορίνη C (GpC)**, ΧΚ, Rh και Duffy, διαμέσου της περιφερειακής 4.1R (**Εικ. 2**). Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι δύο άλλα μέλη του συμπλόκου ζεύξης, η αδουσίνη και η δεματίνη, χρησιμοποιούνται επίσης ως συνδέτες του σκελετού στη μεμβράνη, διαδραματίζοντας αλληλεπιδράσεις με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Ζώνη-3 και Glut1, αντίστοιχα. Η διατήρηση όλων των προαναφερόμενων «κάθετων» διασυνδέσεων ανάμεσα στο σκελετό και στη μεμβράνη εξασφαλίζει την απαιτούμενη συνεκτικότητα μεταξύ τους, που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της κυτταρικής επιφανειακής έκτασης και την απώλεια μεμβράνης διαμέσου κυστιδιοποίησης. Τα κύρια συστατικά του **κυτταροσκελετού** είναι οι πρωτεΐνες: σπεκτρίνη, ακτίνη, πρωτεΐνη 4.1R, αδουσίνη, δεματίνη, τροπομουσίνη και τροπομοντουλίνη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και η σωστή στοιχειομετρία καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τη μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης και την αποφυγή της θραύσης στην περιφερειακή κυκλοφορία (**Εικ. 3**). Με μεθόδους πρωτεομικής, μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερες από 340 διαφορετικές πρωτεΐνες στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη σε πολλές από τις οποίες ακόμα δεν έχει αποδοθεί κάποιος συγκεκριμένος ρόλος. Προφανώς τα σχηματικά μοντέλα σαν αυτό της **Εικόνας 2** είναι απλουστευμένα καθώς δεν περιλαμβάνουν ούτε το 10% των συστατικών της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης.

## B. ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### B1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΕ ΓΥΑΛΙΝΑ ΣΩΛΗΝΑΚΙΑ

1. Καλύπτετε τη μία άκρη των γυάλινων σωλήνων με parafilm. Θα παρασκευάσετε πηκτώμα ακρυλαμίδης **τελικού όγκου 5ml**, προσθέτοντας σε πλαστικό ογκομετρικό κύλινδρο των 10ml ποσότητες από τα ακόλουθα διαλύματα:

- **1ml** από το διάλυμα **V** ( $V = 50\%$  γλυκερόλη)
- **0,7ml** από το διάλυμα **II** ( $II = 40\%$  ακρυλαμίδη -  $1,5\%$  bis-ακρυλαμίδη)
- **0,5ml** από το διάλυμα **I** ( $I = 0,4M$  Tris,  $0,2M$  Sodium acetate,  $0,02M$  EDTA,  $pH 7,4$ )
- **0,1 ml** από το διάλυμα **X** ( $X = 10\%$  SDS)

Στη συνέχεια συμπληρώνετε με απεσταγμένο νερό **μέχρι** τελικό όγκο **4,9ml**.

2. Ακολουθεί η προσθήκη πολυμεριστικών παραγόντων [65μl APS (διάλυμα IV = 10% APS) και 15μl TEMED] σε κάθε ογκομετρικό κύλινδρο, ανάδευση και προσθήκη του διαλύματος της ακρυλαμίδης σε γυάλινα σωληνάκια ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη 1-2στγ διαλύματος κάλυψης πηκτώματος (διάλυμα XI = 0,08% SDS). Αυτό γίνεται για να μη δημιουργηθεί μηνίσκος στην επιφάνεια των πηκτώματων (η οποία είναι η θέση υποδοχής του δείγματος). Επίσης, καλό είναι να αποφεύγεται η επαφή του διαλύματος της ακρυλαμίδης με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο γιατί υπάρχει κίνδυνος οξείδωσης του TEMED κι έτσι παρεμπόδισης του πολυμερισμού.
4. Τα σωληνάκια τοποθετούνται κάθετα στον πάγκο εργασίας μέχρι να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος.

## **B2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**

Σε μικρά πλαστικά erpendorfs (όγκου 1,5ml) προστίθενται κατά σειρά με τη βοήθεια πιπετών ακριβείας Gilson:

- 80μl πρωτεΐνες ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, συγκέντρωσης 2mg/ml
- 40μl διαλύματος VII (VII = 40% γλυκερόλη, 40 mM Tris-Cl, 4mM EDTA, 0,03% μπλε της βρωμοφαινόλης, pH 8.0)
- 40μl διαλύματος VI (VI = 5% SDS και 2,5% β-μερκαπτοαιθανόλη)

Τα σωληνάκια καλύπτονται με ταινία και τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 3-5min.

## **B3. ΣΥΝΔΕΣΜΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ, ΦΟΡΤΩΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΡΕΞΙΜΟ**

1. Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος της ακρυλαμίδης και το βράσιμο των δειγμάτων, αφαιρείτε το parafilm από το κάτω άκρο των σωλήνων που περιέχουν το πήκτωμα και τοποθετείτε τους σωλήνες με τα πηκτώματα στις κατάλληλες θέσεις της συσκευής.
2. Τοποθετείτε μεγάλο όγκο διαλύματος XII (XII = 1% SDS σε 1x ρυθμιστικού διαλύματος I, Running buffer) στην κάτω και στην πάνω δεξαμενή της συσκευής έτσι ώστε να καλύπτονται και τα δύο άκρα των πηκτώματων.
3. Χρησιμοποιώντας πιπέτα ακριβείας Gilson εφαρμόζετε 100μl από το βαμμένο δείγμα των πρωτεϊνών στην κορυφή των πηκτώματων, με προσοχή για να μην τραυματίσετε τα πηκτώματα. Κάθε ομάδα σημειώνει τη θέση στην οποία φόρτωσε το πήκτωμα και το δείγμα της.
4. Ακολουθεί σύνδεση της συσκευής με το τροφοδοτικό και εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 6mA/πήκτωμα.
5. Τερματισμός της ηλεκτροφόρησης όταν η χρωστική (Μπλε της βρωμοφαινόλης) φτάσει περίπου στο 1 εκατοστό από το άκρο του πηκτώματος.

## **B4. ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ**

1. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, αφαιρούνται τα σωληνάκια από τη συσκευή και ξεπλένονται με νερό βρύσης (προσοχή να μη γλιστρήσουν καθώς το διάλυμα περιέχει SDS).
  2. Ακολούθως, γεμίζετε μία σύριγγα με νερό βρύσης και τοποθετείτε τη βελόνα στη σύριγγα.
  3. Εισάγετε κατά 1-2εκ. την άκρη της βελόνας στην περιοχή μεταξύ του πηκτώματος και του σωλήνα, πιέζοντας ταυτόχρονα το έμβολο για να ελευθερώνετε νερό. Μετακινείτε τη βελόνα κυκλικά, ακολουθώντας την εσωτερική περιφέρεια του σωλήνα ρίχνοντας ταυτόχρονα νερό και εισάγοντας τη βελόνα κατά 2-3εκ. περισσότερο εντός του σωλήνα.
- ΠΡΟΣΟΧΗ! Η ΒΕΛΟΝΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΣΕ ΕΝΤΕΛΩΣ ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ ΘΕΣΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΚΙ ΟΧΙ ΚΑΘΕΤΗ, ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΘΑ ΣΠΑΣΕΙ.** Τραβώντας προς τα έξω τη βελόνα, θα αποκολληθεί και το πήκτωμα από το σωλήνα.

4. Τοποθετείτε απευθείας το πήκτωμα σε διάτρητο πλαστικό σωλήνα και αυτόν σε διάλυμα χρωστικής (διάλυμα VIII = 0,05% Coomassie blue σε 7% οξικό οξύ). Αυτή η χρωστική προσδένεται ειδικά στις πρωτεΐνες κι έτσι βάφει τις πρωτεϊνικές ζώνες στο πήκτωμα μπλε.

## **B5. ΧΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ**

Τα πήκτωμα παραμένουν στο διάλυμα της χρωστικής (διάλυμα VIII) για 12-24 ώρες. Επειδή βρίσκεται σε περίσσεια η χρωστική, στο τέλος αυτής της διαδικασίας το πήκτωμα είναι σε όλο το μήκος του βαμμένο. Στη συνέχεια τα πήκτωμα τοποθετούνται για αρκετές ώρες σε διάλυμα IX (IX = 7% οξικό οξύ) προκειμένου να αποχρωματιστεί η μη-ειδική χρώση, δηλαδή οι περιοχές του πηκτώματος που δεν περιέχουν πρωτεΐνες και να παραμείνουν έγχρωμες αποκλειστικά οι ζώνες της κατανομής των πρωτεϊνικών συστατικών στο πήκτωμα.

### **B1.1. Πειραματικό υλικό, διαλύματα, ορισμοί και γενικές οδηγίες**

#### Υλικά-Διαλύματα

- I = 0,4M Tris, 0,2M Sodium acetate, 0,02M EDTA, pH 7,4 (10x)
- II = 40% ακρυλαμίδη - 1,5% bis-ακρυλαμίδη
- III = TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διάμινο-αιθάνιο)
- IV = 10% APS
- V = 50% γλυκερόλη
- VI = 5% SDS και 2,5% β-μερκαπτοαιθανόλη (σε σκοτεινόχρωμη φιάλη)
- VII = 40% γλυκερόλη, 40 mM Tris-Cl, 4mM EDTA, 0,03% μπλε της βρωμοφαινόλης, pH 8.0
- VIII = 0,05% Coomassie blue σε 7% οξικό οξύ
- IX = 7% οξικό οξύ
- X = 10% SDS
- XI = 0,08% SDS
- XII = 1% SDS σε 1x ρυθμιστικού διαλύματος I
- Το πρωτεϊνικό δείγμα που χρησιμοποιείτε είναι **πρωτεΐνες ερυθροκυτταρικής μεμβράνης** που απομονώθηκαν στην προηγούμενη άσκηση. Αφού καθαρίστηκαν εντελώς από την αιμοσφαιρίνη με διαδοχικές πλύσεις του ιζήματος σε υπότονο διάλυμα φωσφορικών (20mOsm, pH 8.0), υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους με τη μέθοδο του **Bradford** (απορρόφηση στα 595nm) και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη.
- Προσοχή στη χρήση της **ακρυλαμίδης**. Είναι ουσία ιδιαίτερα επικίνδυνη σε μορφή σκόνης ή διαλύματος, οπότε σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας θα πρέπει να φοράτε γάντια.

### **Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

- **Bradford, MM. (1976)** A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- **Laemmli, UK. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685. (Η κλασική δημοσίευση του Laemmli περί ηλεκτροφόρησης - Το άρθρο που έχει τις περισσότερες αναφορές στην ιστορία των επιστημονικών δημοσιεύσεων).
- **Margetis P, Antonelou M, Karababa F, Loutradi A, Margaritis L, Papassideri I. (2007)** Physiologically important secondary modifications of red cell membrane in hereditary spherocytosis-evidence for in vivo oxidation and lipid rafts variations. *Blood Cells Mol Dis* 38:210.
- **Mohandas N. and Gallagher PG. (2008)** Red cell membrane: past, present, and future. *Blood* 112:3939-3948.
- **Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. (2006)** In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108:791-801.