

## **X. SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR**

Electroforeza este o metodă de separare care se bazează, în principiu, pe capacitatea particulelor coloidale sau moleculelor încărcate electric de a migra, sub influența unui câmp electric generat de doi electrozi, în direcția electrodului purtător al sarcinii opuse. Viteza de migrare depinde în principal de dimensiunea sarcinii electrice și din acest motiv moleculele cu sarcini diferite vor avea o mobilitate electroforetică diferită, separându-se în fracții. În principiu, această metodă poate fi aplicată tuturor macromoleculelor încărcate electric, separarea realizându-se fie în soluții apoase libere, fie pe medii cu rol stabilizator (plăci cu silicagel, filme, geluri) (1).

În general electroforeza este folosită pentru separarea proteinelor, peptidelor, glucidelor și acizilor nucleici. Utilitatea acestei metode de separare se referă, în special, la caracterizarea din punct de vedere calitativ a unui amestec și aprecierea purității unui compus. Dacă se ține cont de o serie de precauțiuni, tehnica poate fi utilizată și în scopul unor separări cantitative și preparative. Domeniul în care electroforeza își găsește cea mai mare aplicabilitate este studiul proteinelor, domeniu denumit proteomică (termen ce desemnează ansamblul de tehnici și metode folosite pentru studiul expresiei, localizării, structurilor, funcțiilor și interacțiunii proteinelor, introdus pentru prima dată de Wasinger în anul 1995) (1).

Una dintre primele metode de separare electroforetică a fost pusă la punct de Arne Tiselius în anul 1937 (1). Metoda se referă la separarea fracțiilor proteice în interiorul unui tub de forma literei U plin cu electrolit, fracțiile proteice fiind identificate densitometric. Datorită sensibilității reduse a acestei tehnici, s-a preferat dezvoltarea metodelor care folosesc medii stabilizatoare. Electroforeza pe hârtie, utilizată de același Tiselius în anul 1951 pentru separarea proteinelor din ser (2), a fost urmată de apariția unor medii suport din ce în ce mai complexe: acetat de celuloză (Kohn, 1957) (3), amidon (Smithies, 1955) (4), plăci de silica-gel pentru analiza poliglucidelor (Scherz, 1990) (5), agaroză și poli(acrilamidă). O prezentare mai detaliată a avantajelor, dezavantajelor și aplicațiilor acestor medii suport este realizată de către Dennison, 1999 (6).

De-a lungul timpului au fost adoptate două soluții tehnice pentru realizarea separării electroforetice. Un prim sistem este reprezentat de electroforeza orizontală, tehnică folosită atunci când se utilizează suporturi inerte față de oxigen (hârtie, plăci de silicagel, amidon, agaroză). Această soluție are avantajul simplității și robusteții aparaturii utilizate, ea devenind standard pentru electroforeza pe geluri de agaroză. Al doilea sistem este electroforeza în sistem vertical, tehnică utilizată cu suporturi care trebuie ferite de oxigen, precum poliacrilamida. În acest caz, suportul este turnat între două plăci din sticlă etanșezate lateral, comunicarea cu electrozii realizându-se prin părțile inferioară și superioară. Această soluție tehnică este mai complexă deoarece ridică probleme de etanșezare a compartimentelor electrozilor dar, cu toate acestea, a devenit standard pentru electroforeza în geluri de poliacrilamidă.

Amidonul, agaroză și poliacrilamida nu sunt doar medii suport ci, datorită structurii și organizării lor sub formă de gel, pot avea un rol activ în procesul de separare. În cazul în care concentrația gelului este atât de mică încât nu interferă cu migrarea, este vorba despre un gel permisiv, separarea moleculelor realizându-se în funcție de încărcarea electrică a acestora. Prezentarea aplicațiilor practice a acestor tipuri de geluri este realizată de către Westermeier (1). Când concentrația gelului este atât de mare încât influențează migrarea printr-un efect de filtrare a moleculelor în funcție de dimensiunea lor (efect de filtrare moleculară), ne referim la geluri restrictive. În acest caz migrarea se realizează în funcție atât de sarcina electrică a moleculelor cât și de dimensiunile lor. La ora actuală gelurile restrictive cel mai frecvent utilizate în laboratoarele de cercetare sunt gelurile de agaroză pentru separarea acizilor nucleici (pentru detalii consultați capitolul VII – *Separarea electroforetică a ADN-ului*, pagina 147) și cele de poliacrilamidă pentru separarea proteinelor.

În funcție de scopul separării și de condițiile de migrare, moleculele proteice pot fi separate fie în stare nativă (prin realizarea așa numitei electroforeze native (*engl.* Native-PAGE), fie în stare denaturată. Denaturarea proteinelor în catene polipeptidice componente se realizează, cel mai frecvent, prin tratamente cu dodecilsulfat de sodiu (SDS), caz în care electroforeză în condiții denaturante se notează SDS-PAGE. Oricare ar fi sistemul utilizat, după realizarea separării propriu-zise, moleculele proteice trebuie evidențiate pe gel prin tehnici specifice de colorare. Separarea electroforetică a proteinelor se realizează, prin urmare, în două etape distincte:

1. separarea propriu-zisă (electroforeză nativă sau denaturantă, în funcție de scopul urmărit);
2. evidențierea fracțiunilor proteice de interes prin colorare, autoradiografie sau tehnici imunologice.

## **X.1 Electroforeza nativă a proteinelor în sistem discontinuu**

Metoda are la bază sistemul de tampon discontinuu propus de Ornstein, 1964 (7) și Davis, 1964 (8). Inițial, autorii au utilizat pentru realizarea gelului tuburi în care proteinele se separă sub formă de discuri, motiv pentru care metoda mai poartă numele și de disc-electroforeză. Discontinuitatea se referă la 4 parametri (1):

1. *porozitatea gelului* – gelul conține două zone de concentrații diferite, una în zona superioară de concentrație mică (pori de dimensiuni mari, gel de concentrare) și una în zona inferioară de concentrație mare (pori de dimensiuni mici, gel de separare);
2. *pH-ul gelului* – gelul de concentrare are pH-ul 6,8 iar cel de migrare are pH-ul 8,8;
3. *tăria ionică* a soluțiilor tampon din interiorul gelului – gelul de concentrare conține 0,125 mol/l TRIS-HCl, iar gelul de separare 0,375 mol/l TRIS-HCl;
4. *natura ionilor* din gel și din tamponul de electrod; gelul conține ioni Cl<sup>-</sup> iar tamponul de migrare glicină.

### **Principiul metodei**

Separare proteinelor în sistemul discontinuu are loc în două etape, corespunzătoare celor două geluri:

#### *1. Etapa de concentrare a fracțiilor proteice sau etapa de izotachoforeză (1)*

Probele reprezentate de soluția proteică sunt plasate în gelul de concentrare, al cărui pH este de 6,8. La această valoare a pH-ului, glicina (punctul izoelectric, pI=6,7) este practic lipsită de sarcină electrică, iar

clorul este încărcat negativ. La aplicarea curentului electric, glicina va avea o mobilitate redusă (datorită lipsei sarcinii) iar clorul va avea mobilitate maximă. Proteinele cu punctul izoelectric (pI) diferit de 6,8, cu grade diferite de încărcare vor avea mobilități intermediare, plasându-se între frontul glicinei și cel al clorului, realizând legătura între aceste două fronturi. Apare astfel o zonă în care moleculele proteice se grupează, se concentrează și se ordonează în funcție de sarcină. În această zonă apar grupe de proteine ce diferă una de cealaltă prin sarcină, aceste grupe fiind însă strâns legate una de cealaltă și formând așa-numitul „tren de ioni” (1). Între grupele de proteine nu pot apărea goluri, deoarece aceste goluri ar duce la întreruperea circuitului electric. Ca urmare a acestui fapt, în etapele târzii ale procesului toate moleculele migrează cu aceeași viteză, de unde și denumirea de izotachoforeză (izo – egal, tacho – viteză). Când acest tren al ionilor ajunge în zona de contact dintre gelul de concentrare și cel de migrare, rezistența datorată porilor mici ai gelului de migrare crește, ceea ce duce la concentrarea proteinelor sub forma unei singure benzi foarte fine.

## 2. *Etapa de separare a fracțiilor proteice.*

În gelul de separare, la pH 8,8, glicina este încărcată negativ și, datorită masei moleculare mici, continuă să migreze împreună cu frontul clorului cu o viteză relativ mare, depășind frontul proteic întârziat la intrarea în acest gel. Proteinele se desprind din trenul ionilor și se separă în funcție de masa moleculară și sarcina electrică.

### **Avantaje:**

Acest tip de separare electroforetică este util în experimentele în care se dorește păstrarea intactă a structurii tridimensionale a proteinelor precum:

1. separarea de enzime în scopuri preparative;
2. identificarea de izoenzime.

### **Limitări:**

O atenție deosebită în cazul acestui tip de separare trebuie acordată punctului izoelectric al proteinelor de interes. În sistemul discontinuu descris nu pot fi separate proteine al căror pI este mai mare de 6,8 (la pH-ul gelului de concentrare aceste proteine sunt încărcate pozitiv și migrează spre anod) (1). În general, pentru o bună separare, sistemul tampon folosit trebuie să fie cu două unități de pH mai bazic decât pI-ul proteinelor de separat. O prezentare detaliată a unor alternative de sisteme tampon de migrare și aplicațiile lor este realizată de Chrambach și Jovin, 1983 (9).

Acest tip de electroforeză nu poate fi utilizată pentru aprecierea maselor moleculare relative ale proteinelor, deoarece migrarea se realizează și în funcție de sarcinile acestora. Pentru a înlătura acest dezavantaj Niepmann (2006) (10) descrie o metodă de separare electroforetică care utilizează colorantul Serva Blue G. Acesta ecranează sarcinile native ale proteinelor și conferă acestora sarcini negative. Autorul utilizează această metodă pentru a aprecia gradul de oligomerizare a proteinelor însă precizează că modul de migrare al moleculelor proteice pe gelurile de poliacrilamidă depinde și de forma acestora.

### **Materiale necesare:**

1. soluție stoc de acrilamidă – se prepară prin dizolvarea a 29 g acrilamidă și 1 g N-N'-metilen-bisacrilamidă (puritate pentru electroforeză) în 100 ml apă distilată; se verifică pH-ul soluției care trebuie să fie mai mic de 7 și se păstrează în sticle brune, la întuneric, la temperatura de 4°C; este indicat, de asemenea, ca soluția să fie degazificată sub vid, în vederea eliminării oxigenului solvit; soluțiile preparate în laborator au o durată de viață limitată, deoarece acrilamida și bisacrilamida se dezaminează și formează acizii corespunzători, procesul fiind catalizat de lumină și alcalii; Prezența acidului acrilic în soluția de acrilamidă duce la diminuarea rezoluției și apariția unor benzi difuze. Soluția de acrilamidă preparată în laborator se poate folosi timp de câteva luni, după care trebuie refăcută (11); soluția stoc de acrilamidă

poate fi achiziționată gata preparată de la producători precum Biorad, Amersham-Biosciences, Roth; aceste soluții reduc pericolul contaminării cu poliacrilamidă și au o mai mare stabilitate în timp datorită aditivilor pe care îi conțin (un an flaconul nedesfăcut, 6 luni flaconul desfăcut) (12).



*Acrilamida și bisacrilamida monomere se absorb prin piele și sunt neurotoxine deosebit de puternice, fiind de asemenea suspectate de efecte cancerigene. Cântărirea și prepararea soluțiilor se realizează cu atenție, manevrarea făcându-se cu mănuși și purtând mască de protecție. Deși poliacrilamida este considerată inofensivă, este indicat ca manipularea gelurilor să se realizeze tot cu mănuși datorită resturilor de acrilamidă nepolimerizată.*

2. tampon TRIS 1,5M, pH 8,8 – se dizolvă 18,166 g Tris-bază în 80 ml apă distilată și se ajustează pH-ul la 8,8 cu HCl, după care se completează la 100 ml cu apă distilată;
3. tampon TRIS 1 M, pH 6,8 – se dizolvă 12,114 g Tris-bază în 80 ml apă distilată și se ajustează pH-ul la 6,8 cu HCl, după care se completează la 100 ml cu apă distilată; nu este recomandată utilizarea TRIS-HCl sau Trisma datorită conținutului mare de săruri ceea ce conduce la obținerea unor benzi difuze (11); soluția se păstrează în sticle bine închise, la temperatura camerei;
4. TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletildiamină;
5. persulfat de amoniu 10% (APS) – se prepară prin dizolvarea a 0,1 g persulfat de amoniu în 1 ml apă distilată; soluția se poate păstra la temperatura de 4°C timp de o săptămână; persulfatul de amoniu se descompune lent în soluție, motiv pentru care se recomandă utilizarea soluției proaspăt preparate;
6. tampon de electroforeză TRIS-glicină (25 mM Tris-base, 250 mM glicină) – se prepară prin dizolvarea a 3,02 g TRIS-bază, 18,8 g glicină în 1000 ml apă distilată; în cazul utilizării frecvente se pot

prepara soluții de până la zece ori mai concentrate, efectuându-se diluarea în momentul folosirii;

7. soluție tampon pentru probe 4X – Tris-HCl 200 mM (pH 6,8), albastru de bromfenol 0,4%, glicerol 40%; soluția se poate prepara din soluția Tris 1 M pH 6,8; pentru prepararea a 10 ml soluție tampon pentru probe se dizolvă 0,04 g albastru de bromfenol în 4 ml apă distilată, se adaugă 2 ml tampon Tris 1 M pH 6,8 (pentru gelul de concentrare) și 4 ml glicerol; soluția se poate păstra la temperatura camerei sau la frigider.

## Mod de lucru

**A. Turnarea gelului de poliacrilamidă** presupune parcurgerea mai multor etape.

1. asamblarea plăcilor din sticlă în vederea turnării gelului de poliacrilamidă se realizează urmând indicațiile producătorului cuvei de electroforeză (Biorad, Apelex etc.). Este necesar să se cunoască volumul de gel necesar și dacă acesta nu este indicat de producătorul cuvei poate fi determinat prin măsurarea cantității de apă dintre plăcile din sticlă montate în vederea turnării gelului.

Într-un pahar Erlenmeyer curat se prepară volumul necesar de gel de migrare urmând indicațiile din Tabelul 19, exceptând soluția de SDS 10%. Concentrația gelului depinde de proba de analizat; în general, o concentrație de 10-12% este un bun început pentru analiza unei probe necunoscute. Componentele trebuie adăugate în ordinea înscrisă în Tabelul 21 (pagina 250) pentru a împiedica polimerizarea accidentală a acrilamidei. Conținutul flaconului se agită după care se trece la etapa următoare.

2. acrilamida se toarnă cu atenție în spațiul dintre cele 2 plăci din sticlă. Nivelul de umplere se stabilește în așa fel încât pieptenul să poată fi introdus, iar de la capătul acestuia să rămână un spațiu de 1 cm pentru gelul de concentrare. Peste soluția de acrilamidă proaspăt turnată se adaugă cu grijă etanol, care are rolul de a elimina eventualele bule de aer care se pot forma la suprafața soluției de acrilamidă, de a asigura formarea unei margini superioare drepte și de a nu permite difuzia

oxigenului în soluția de acrilamidă (oxigenul inhibă procesul de polimerizare);

3. după polimerizare (procesul durează aproximativ 30 minute sau mai mult dacă APS-ul nu este are calitatea corespunzătoare), se elimină etanolul din partea superioară a gelului, se spală cu apă distilată spațiul dintre plăcile de sticlă și se îndepărtează apa în exces cu hârtie de filtru.

4. într-un pahar Erlenmeyer se prepară volumul necesar de gel de concentrare urmând indicațiile din Tabelul 22 (pagina 252), exceptând soluția de SDS. Componentele se amestecă și se trece la punctul 5; etapa de mogenizare a componentelor nu trebuie să dureze foarte mult timp, deoarece polimerizarea gelului de concentrare are loc mult mai repede decât în cazul gelului de separare.

5. soluția se toarnă cu atenție peste gelul de separare și imediat se inserează pieptenii; aceștia trebuie introduși în așa fel încât să nu apară bule de aer; polimerizarea este completă după aproximativ 30 minute. Gelurile pot fi utilizate imediat după expirarea acestui interval. Înainte de utilizare se scoate pieptenul, se spală godeurile pentru probe cu apă distilată și se elimină apa în exces. Plăcile din sticlă între care se află gelul se assemblează în cuva de electroforeză urmând indicațiile producătorului iar cuva se umple cu soluție tampon de migrare.

## **B. Pregătirea probelor**

Cantitatea de proteine ce pot fi separate pe un gel depinde de dimensiunile acestuia. Ca punct de reper, pe un gel în format mini, cu dimensiunile de 8 x 10 cm și grosimea de 0,1 cm se pot separa amestecuri de proteine de până la 25-30  $\mu\text{g}$  și proteine purificate până la 5  $\mu\text{g}$ .

Într-o microeprubetă Eppendorf se repartizează 5  $\mu\text{L}$  tampon pentru probe 4X în care se adaugă soluția de analizat conținută într-un volum X (de maximum 15  $\mu\text{l}$ ). Se completează cu apă distilată până la 20  $\mu\text{l}$  și apoi, cu o seringă Hamilton, se încarcă probele în godeurile din gel.

## **C. Separarea electroforetică propriu-zisă**

Cuva de electroforeză se conectează la o sursă de curent și se setează intensitatea curentului ca parametru constant. Valorile variază în funcție de dimensiunile gelului utilizat. Pentru un gel în format mini, se aplică 10 mA/gel până când frontul colorantului atinge limita de separare



dintre cele două geluri, după care se aplică 15 mA/gel până când frontul colorantului atinge limita inferioară a gelului.

După finalizarea migrării, plăcile din sticlă se scot din cuvă, se așează pe o foaie de hârtie de filtru și se desfac cu atenție, în vederea recuperării gelului. Acestuia i se marchează colțul din dreapta jos în vederea orientării ulterioare. Gelul este apoi plasat într-un vas pentru colorare. Pericolul ruperii gelului la mutarea lui de pe placa de sticlă în vasul de colorare este mult diminuat dacă operația se realizează prin antrenarea gelului cu un jet de apă dintr-o pisetă.

**TABEL 21.** Componentele necesare preparării gelului de separare utilizat în electroforeza nativă sau în SDS -PAGE (după Sambrook *et al.* 1989 ) (11)

Concentrația finală a gelului	Componentă	Volumul fiecărei componente (ml) pentru obținerea volumului final de:								
		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml	
<b>6%</b>	Apă distilată	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5	
	Acrilamidă 30%	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0	
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5	
	SDS 10%*	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020	0,024	0,032	0,04	
<b>8%</b>	Apă distilată	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2	
	Acrilamidă 30%	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3	
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5	
	SDS 10%*	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03	
<b>10%</b>	Apă distilată	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8	
	Acrilamidă 30%	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7	
	Tris 1,5M, pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5	

Concentrația finală a gelului	Componentă	Volumul fiecărei componente (ml) pentru obținerea volumului final de:								
		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml	
<b>12%</b>	SDS 10%*	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02	
	Apă distilată	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5	
	Acrilamidă 30%	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0	
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	20,0	
	SDS 10%*	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02	
	Apă distilată	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5	
<b>15%</b>	Acrilamidă 30%	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0	
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10	12,5	
	SDS 10%*	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02	
	Apă distilată	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5	

\*—componentă care trebuie eliminată dacă se are în vedere realizarea unei electroforeze native

**TABEL 22.** Componentele necesare preparării gelului de concentrare utilizat în electroforeza nativă sau în SDS-PAGE (după Sambrook et al.1989) (11)

Componentă	Volumul fiecărei componente (ml) pentru obținerea volumului final de:									
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml		
Apă distilată	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8		
Acrilamidă 30%	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7		
Tris 1 M pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25		
SDS 10%*	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1		
APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1		
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01		

\*-componentă care trebuie eliminată dacă se are în vedere realizarea unei electroforeze native

## **X.2 Electroforeza proteinelor în condiții denaturante (SDS-PAGE)**

Metoda de separare electroforetică în condiții denaturante propusă este una derivată de la sistemul de separare discontinuu al lui Ornstein și Davis (7) discutat anterior. A fost introdusă pentru prima dată de Laemmli (13), diferența între acest sistem și cel nativ constând în faptul că proteinele sunt supuse denaturării prin acțiunea dodecil-sulfatului de sodiu (SDS),  $\beta$ -mercaptoetanolului și temperaturii. SDS-ul este un detergent încărcat negativ care are proprietatea de a se lega de catenele polipeptidice într-un raport de 1,4 g detergent / 1 g proteină (11). Acest sistem de separare mai este cunoscut și sub numele de Glicină-SDS-PAGE.

### **Principiul metodei**

Separarea în acest caz se realizează după aceleași principii ce guvernează și electroforeza nativă. Diferențele apar datorită faptului că, sub acțiunea temperaturii, SDS-ului și  $\beta$ -mercaptoetanolului, structura tridimensională a moleculelor proteice este alterată. Astfel, proteinele sunt transformate în catenele liniare de aminoacizi. Suplimentar, SDS-ul se fixează pe catenele polipeptidice într-o cantitate proporțională cu lungimea lor și acranază sarcinile datorate încărcării aminoacizilor. Toate proteinele vor fi, prin urmare, încărcate negativ, dimensiunea sarcinii fiind direct proporțională cu cantitatea de SDS fixată, adică cu lungimea catenei. În această situație separarea se realizează în funcție de un singur parametru și anume de dimensiunea catenelor polipeptice.

### **Avantaje:**

Metoda este utilizată în scopuri analitice calitative (în vederea aprecierii gradului de puritate a unui preparat), dar și cantitative (cu o bună standardizare). Aplicația cea mai cunoscută este însă aprecierea

maselor moleculare ale proteinelor. În acest caz trebuie făcute următoarele precizări:

1. pentru aprecierea masei moleculare este necesar ca amestecul de proteine marker (cu mase moleculare cunoscute) să fie supus electroforezei simultan cu proba de analizat;
2. separarea proteinelor în funcție de masa moleculară nu este una liniară, de aceea se pot aprecia corect masele moleculare doar pentru proteinele din zona centrală a gelului;
3. masa moleculară relativă a proteinelor poate varia în funcție de starea de reducere a legăturilor disulfidice; prezența legăturilor disulfidice nereduse duce la scăderea masei moleculare relative cu 2-4 kDa (14), iar prezența legăturilor incomplet reduse duce la apariția a două benzi apropiate ca masă; analiza comparativă a aceleiași proteine tratate și netratate cu agenți reducători poate oferi informații legate de prezența punților disulfidice.

### **Limitări:**

Folosind acest sistem de separare, glicoproteinele migrează foarte încet. Această comportare se datorează faptului că partea glucidică din structura glicoproteinelor leagă foarte slab SDS-ul. Pentru îmbunătățirea vitezei de separare se poate folosi sistemul tampon propus de Poduslo (1981), care folosește Tris-borat-EDTA ca tampon de migrare (15).

Sistemul de separare al lui Laemmli (Glicină-SDS-PAGE) permite separarea proteinelor cu masă moleculară mai mare de 15 kDa. Pentru proteinele cu masele moleculare mai mici decât această limită este indicată utilizarea sistemului Tricină-SDS-PAGE descris de Schagger (2006) (14). Acest sistem nu oferă informații legate de gradul de oligomerizare a proteinelor și nu permite aprecierea masei moleculare native, pentru rezolvarea acestor aspecte fiind necesară utilizarea altor tehnici precum cromatografia de filtrare prin gel (pentru detalii, consultați subcapitolul VIII– 5 *Determinarea maselor moleculare native utilizând cromatografia de filtrare prin gel (GF)*, pagina 200).

## Materiale necesare:

Se utilizează aceleași materiale folosite în cazul electroforezei în condiții native, la care se adaugă:

1. tampon de electroforeză Tris-Glicină-SDS (Tris-bază, 25 mM glicină 250 mM, SDS 0,1%) – se prepară prin dizolvarea a 3,02 g Tris-bază, 18,8 g glicină, 10 ml SDS 10% în 1000 ml apă distilată; în cazul utilizării frecvente se pot prepara soluții de până la 10X mai concentrate, acestea necesitând diluare înainte de folosire;
2. soluție 10% SDS; aceasta se prepară prin dizolvarea a 10 g SDS în 90 ml apă distilată; pentru dizolvare completă poate fi necesară încălzirea; soluția se păstrează la temperatura camerei;



*SDS-ul se prezintă sub forma unei pulberi fine, ușor antrenată de curenții de aer. Inhalată, pulberea produce iritarea mucoasei nazale, din acest motiv cântărirea și manipularea acestui compus trebuie să se realizeze numai purtând masca de protecție.*

3. soluție tampon pentru probe 4X – TRIS-HCl 200 mM (pH 6,8), albastru de bromfenol 0,4%, glicerol 40%, SDS 8%– pentru prepararea a 10 ml soluție tampon se dizolva 0,04 g albastru de bromfenol și 0,8 g SDS în 4 ml apă distilată, se adaugă 2 ml tampon TRIS-HCl 1 M pH 6,8 (pentru gelul de concentrare) și 4 ml glicerol; soluția se poate păstra la temperatura camerei sau la frigider;
4. soluție stoc ditiotreitol (DTT) 1 M – se dizolvă 0,154 g DTT în 1 ml apă distilată; soluția se păstrează la congelator; în calitate de agent reducător se poate utiliza și beta-mercaptoetanol în aceeași concentrație.

## Mod de lucru

### A. Turnarea gelului de poliacrilamidă

Operația se realizează identic ca în cazul electroforezei în condiții native, cu observația că în compoziția gelurilor intră și SDS-ul, urmând indicațiile din Tabelul 21 (pagina 250) și Tabelul 22 (pagina 252). Concentrația gelului de separare se alege în funcție de dimensiunea proteinei de interes, urmând indicațiile din Tabelul 23. De precizat că rezoluția în limitele superioară și inferioară este redusă.

**Tabel 23.** Dependența dintre concentrația gelului de separare și masele proteinelor posibil a fi separate (după Ausubel, 2002) (16)

Concentrație gel de separare (%)	Limite mase proteine (kDa)
6	60 -200
8	30-95
10	16-70
12	12-60
15	12-45

### B. Pregătirea probelor

Cantitatea de proteine ce pot fi separate pe un gel depinde de dimensiunile acestuia. Ca punct de reper, pe un gel în format mini, cu dimensiunile de 8 x 10 cm și grosimea de 0,1 cm se pot separa amestecuri de proteine cu un conținut de până la 25-30  $\mu\text{g}$  și proteine purificate cu un conținut de până la 5  $\mu\text{g}$ .

Într-o microeprubetă Eppendorf se repartizează 5  $\mu\text{l}$  tampon pentru probe 4X în care se adaugă soluția de analizat conținută într-un volum X (de maximum 15  $\mu\text{l}$ ). Se completează amestecul cu 2  $\mu\text{l}$  soluție DTT 1 M și apă distilată până la volumul final de 20  $\mu\text{l}$ , după care se încălzește la 95°C timp de 5 minute. După răcire probele se încarcă cu o seringă Hamilton, în godeurile din gel.



### **C. Separarea electroforetică propriu-zisă**

Se procedează identic că și în cazul separării în condiții nedenantante. Gelurile se scot dintre plăcile din sticlă, se clătesc cu apă distilată și se prelucrează în vederea detecției proteinelor separate după una din metodele descrise în continuare.

## **X.3 Detecția proteinelor separate prin electroforeza pe geluri de poliacrilamidă**

Proteinele separate prin electroforeză (nativă sau denaturantă) pot fi detectate folosind două metode distincte:

A. colorarea gelurilor de poliacrilamidă,

B. electro-transferul lor pe membrane și identificarea proteinelor utilizând tehnici imunologice (pentru detalii consultați capitolul XI– *Evidențierea imunologică a proteinelor – Tehnica Western-Blot*, pagina 273).

### ***Colorarea gelurilor de poliacrilamidă în vederea evidențierii proteinelor***

Pentru evidențierea proteinelor separate pe gelurile de poliacrilamidă au fost descrise numeroase protocoale ce pot fi împărțite în două categorii mari:

1. colorații specifice cu care sunt evidențiate doar anumite fracțiuni din toate proteinele separate; aceste colorații se folosesc în special pentru evidențierea unor enzime; metode specifice, adaptate pentru diferite tipuri de enzime sunt prezentate de Manchenko (2002) (17);
2. colorații nespecifice care realizează colorarea uniformă a tuturor proteinelor separate.

Diversele metode de colorare diferă între ele prin nivelul de sensibilitate și prin complexitatea procedurii, aceste două elemente fiind esențiale în alegerea protocolului de colorare de urmat (Tabel 24). Avantajele și dezavantajele fiecărei metode, precum și alte metode de colorare ce nu sunt menționate în lucrarea curentă sunt prezentate de Westermeier *et al.* (2008) (18).

**TABEL 24.** Metode de colorare a gelurilor de poliacrilamidă în vederea evidențierii fracțiunilor proteice (după Gerstein 2001,(12) cu modificări)

Metodă de colorare	Sensibilitate	Observații
Coomassie brilliant blue R-250	0,3-1 μg/bandă	Simplă, tradițională, cu sensibilitate redusă. Recomandată pentru gelurile SDS-PAGE, dar poate fi folosită și pentru gelurile native (în acest caz proteinele se colorează mai slab și sensibilitatea scade)
Coomassie brilliant blue G-250 (coloidal)	100 ng/bandă	Recomandată pentru toate tipurile de geluri, sensibilitate bună dar necesită un timp mai îndelungat de colorare.
Colorație cu argint	10 ng/bandă	Sensibilitate foarte bună, dificil de realizat, necesită o calitate deosebit de bună a reactivilor utilizați
Colorație cuprică	10-100 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, nu poate fi aplicată decât pentru gelurile cu SDS.
Colorație cu Zn	10-100 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, nu poate fi aplicată decât pentru gelurile cu SDS.
Coloranți luminescenti SYPRO tip	1-8 ng/bandă	Rapidă și ușor de realizat, aplicabilă tuturor tipurilor de geluri, necesită sistem de achiziție a imaginilor în UV

## Colorarea cu Comassie Brilliant Blue R-250

### Principiul metodei:

Colorarea cu Comassie Brilliant Blue R-250 este cea mai utilizată metodă de evidențiere a proteinelor pe gelurile de poliacrilamidă datorită simplității sale. Proteinele sunt simultan fixate și colorate utilizând o soluție metanolică de Comassie Brilliant Blue R-250 (colorant textil cunoscut sub numele comercial de Acid Blue 38 (11)). Colorantul are proprietatea de a se lega specific de moleculele proteice, astfel încât acestea vor apărea colorate în albastru pe un fond transparent. Colorantul se leagă de toate proteinele colorându-le uniform.

### Materiale necesare:

1. soluție pentru colorare – se prepară prin dizolvarea a 0,25 g Comassie Brilliant Blue R250 în 100 ml amestec metanol:acid acetic:apă distilată 45:10:45 (v/v). colorantul se dizolvă în metanol după care se adaugă apa și acidul acetic;



*Metanolul este deosebit de toxic pentru organismul uman. Ingestia, inhalarea sau absorbția cutanată a unei cantități de metanol (> 20 mg%) determină simptome primare precum depresia sistemului nervos central, cefalee, vertij, greață, pierderea echilibrului, confuzie, scăderea acuității vizuale etc., iar după aproximativ zece ore apar distrugerea nervului optic și acidoza. Doza letală este de 1-2 ml metanol pur/kg corp. Pentru a se evita intoxicarea cu metanol se recomandă manipularea cu grijă a acestuia, utilizând echipamente de protecție (halat, mănuși, mască de protecție).*

2. soluție pentru decolorare – metanol:acid acetic: apă 45:10:45 (v/v);
3. soluție pentru fixare – acid acetic 10%;
4. agitator orbital de laborator;

5. vas de colorare cu capac, din material plastic sau sticlă.

## Mod de lucru

Dupa separarea electroforetică, gelul de poliacrilamidă este clătit, dacă este cazul, cu apă distilată pentru îndepărtarea SDS-ului, după care este plasat într-un vas cu aproximativ 5 volume de soluție pentru colorare (sau o cantitate suficientă pentru a acoperi complet gelul). Se incubează sub agitare timp de aproximativ două ore, după care se îndepărtează colorantul. Gelul se clătește cu apă distilată pentru îndepărtarea excesului de colorant, după care se imersează în soluția de decolorare unde se menține timp de 4-8 ore. În acest timp, soluția de decolorare se schimbă de 3-4 ori, după ce devine puternic colorată. Decolorarea este considerată finalizată când fundalul devine transparent. Uneori, după decolorare, benzile pot fi ușor difuze, iar fundalul ușor colorat. Menținerea gelului în soluția de fixare timp de 10-20 ore conduce la rezolvarea acestor probleme. Timpii de incubare variază în limite destul de largi în funcție de dimensiunea gelului, valorile menționate fiind valabile pentru un gel de format mini.

Odată decolorarea finalizată, gelul poate fi supus analizei prin fotografiere, scanare, densitometrare (pentru detalii consultați subcapitolul *Fotografierea gelurilor și analiza imaginilor. Stabilirea masei moleculare relative*, pagina 264) sau poate fi păstrat în soluția de fixare pentru perioade mari de timp. O modalitate mai simplă de păstrare a gelurilor este uscarea lor, folosind dispozitive specifice. Prin uscare rezoluția gelului scade, motiv pentru care este indicat ca gelul să fie mai întâi fotografiat și apoi uscat.

Viteza de decolorare poate fi mărită prin:

- a. folosirea unei soluții de metanol 30% și acid acetic 10%; menținerea prelungită a gelurilor în această soluție duce la scăderea intensității benzilor corespunzătoare fracțiilor proteice;
- b. încălzirea soluției de decolorare la temperaturi mai mari de 45°C; operația trebuie să se realizeze însă cu atenție deosebită datorită prezenței metanolului inflamabil și toxic.

Un protocol alternativ de decolorare, care elimină necesitatea utilizării metanolului, folosește pentru colorare o soluție de Comassie

Brillant Blue R-250 0,25% în isopropanol:acid acetic:apă 25:10:65 (v/v) iar pentru decolorare etanol:acid acetic:apă 10:10:80 (v/v).

## Colorarea cu argint a gelurilor de poliacrilamidă

Metodele care folosesc argintul pentru evidențierea proteinelor pe geluri de poliacrilamidă descrise în literatură pot fi împărțite în două categorii: metode care folosesc argint amoniacal și metode care utilizează nitratul de argint (11). Sunt preferate metodele din ultima categorie, deoarece soluțiile de nitrat de argint sunt mai ușor de preparat și nu generează subproduși potențial explozivi. Metoda de colorare prezentată mai jos a fost descrisă de Sammons *et al.* (1981)(19) și modificată de Schoenle *et al.* (1984) (20). Metode alternative de colorare utilizând argintul sunt descrise și de Ausubel *et al.* (2004) (16).

## Principiul metodei

Metoda se bazează pe reducerea diferențiată a ionilor de argint legați de catenele laterale ale aminoacizilor. Gelul este impregnat cu ioni de argint, care sunt supuși apoi unei reacții de reducere sub influența unei aldehide. Reacția este inițiată de molecule proteice care se vor colora, în timp ce gelul va rămâne incolor.

## Avantaje:

- sensibilitatea neegalată de nici o altă modalitate de evidențiere a proteinelor
- poate fi utilizată atât pentru geluri obținute prin electroforeză în condiții denaturante, cât și pentru cele obținute prin electroforeză în condiții native, prin izoelectrofoculare sau electroforeză bidimensională.

### **Limitări:**

- sensibilitatea deosebită atrage după sine o serie de dezavantaje care se referă în special la ușurința cu care o serie de factori interferă cu procesul de colorare. Respectarea timpilor de incubare, calitatea reactivilor și curățenia ustensilelor utilizate sunt esențiale pentru obținerea unor rezultate reproductibile.
- colorarea proteinelor nu este uniformă, ci depinde de compoziția în aminoacizi a proteinelor luate în studiu. Legarea Ag de moleculele proteice și prin urmare colorarea sunt dependente de prezența diverselor grupe funcționale (carbonil, sulfhidril) de pe catena polipeptidică.

### **Materiale necesare**

1. soluție de fixare – etanol:acid acetic: apă 30:10:60 (v/v);
2. etanol 30% în apă deionizată (sau bidistilată);
3. soluție stoc AgNO<sub>3</sub> 20% în apă deionizată (sau bidistilată); se păstrează la temperatura camerei, în vase de culoare brună, bine închise; înainte de utilizare se prepară o soluție 0,1% prin diluare cu apă deionizată (sau bidistilată);
4. soluție carbonat de sodiu 2,5%, formaldehidă 0,02% – se prepară extemporaneu prin dizolvarea a 2,5 g carbonat de sodiu și 0,054 ml formaldehidă 37% în 97,48 ml apă deionizată (sau bidistilată);



*Vaporii de formaldehidă sunt toxici, motiv pentru care soluția trebuie pregătită sub nișă.*

5. soluție de stopare – acid acetic 1% în apă deionizată (sau bidistilată)
6. agitator orbital de laborator;
7. vas pentru colorare;

Eventual, după caz sunt necesare de asemenea și:

8. soluție A – se prepară prin dizolvarea a 37 g NaCl și 37 g CuSO<sub>4</sub> în 850 ml apă deionizată (sau bidistilată); se adaugă NH<sub>4</sub>OH concentrat până se formează un precipitat albastru care apoi se dizolvă;
9. soluție B – se dizolvă 436 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> în 900 ml apă deionizată (sau bidistilată); se aduce soluția la 1000 ml cu apă deionizată (sau bidistilată).

### Mod de lucru:

1. după terminarea electroforezei (marcată de momentul în care frontul colorantului părăsește gelul) se desprinde gelul dintre plăcile din sticlă și se menține în cel puțin cinci volume soluție de fixare timp de 4-12 ore sub ușoară agitare; datorită sensibilității deosebite a metodei este absolut necesar ca toate etapele de manipulare a gelului să se realizeze doar cu mânuși.

2. se îndepărtează soluția de fixare, apoi gelul este spălat de două ori în cel puțin 5 volume etanol 30% timp de 30 minute sub agitare:

3. se spală gelul din nou de două ori în cel puțin zece volume apă deionizată (sau bidistilată) timp de 10 minute, la temperatura camerei, sub agitare; în această etapă de rehidratăre gelul se va umfla ușor.

4. se inițiază colorarea propriu-zisă prin incubarea gelului timp de 30 minute în cel puțin cinci volume soluție 0,1% AgNO<sub>3</sub> preparată extemporaneu din soluția stoc.

5. soluția de AgNO<sub>3</sub> se aruncă și se spală fiecare față a gelului timp de 20 minute cu ajutorul unei pisete cu apă deionizată (sau bidistilată); nu trebuie permisă uscarea nici uneia dintre fețele gelului, deoarece aceasta va duce la apariția de artefacte.

6. în vederea dezvoltării culorii, gelul se incubează în soluție proaspăt preparată de carbonat de sodiu 2,5% și formaldehidă 0,02%, la temperatura camerei, sub ușoară agitare; în general, benzile vor deveni vizibile în doar câteva minute; reacția se întrerupe în momentul în care benzile prezintă intensitatea dorită; această etapă nu trebuie prelungită foarte mult timp pentru a se preveni colorarea gelului; reacția se oprește prin spălarea gelului cu acid acetic 1% timp de câteva minute; gelul este apoi spălat de câteva ori cu apă deionizată timp de câte 10 minute;

7. dacă pe suprafața gelului apare un film strălucitor de argint,

acesta poate fi îndepărtat prin spălare cu o soluție reducătoare preparată prin combinarea unor volume egale din soluțiile A și B și diluarea amestecului cu trei volume de apă deionizată.

După colorare, gelul poate fi imediat fotografiat și păstrat prin uscarea.

## **X.4 Fotografierea gelurilor și analiza imaginilor. Stabilirea masei moleculare relative**

Gelul rezultat, conținând fracțiunile separate, poate fi analizat prin vizualizare directă. Realizarea de operații mai complicate, precum cuantificarea benzilor, aprecierea maselor moleculare relative sunt dificil de efectuat și sunt susceptibile de erori doar prin simpla observare cu ochiul liber. Din aceste motive este preferată utilizarea unor metode standard, care elimină erorile introduse de subiectivismul operatorului.

O astfel de metodă constă în fotografierea gelurilor și analiza lor cu ajutorul programelor specializate. Această abordare oferă și avantajul că imaginea gelului poate fi păstrată pe termen nelimitat și reprodusă ori de câte ori este nevoie.

Achiziția imaginilor gelurilor de poliacrilamidă sau de agaroză, indiferent de colorația utilizată (vizibil sau cu fluorescență), se poate realiza fie prin utilizarea unor camere video, fie prin utilizarea unor scanere.

Camerele video CCD (*engl.* Charge-Coupled Device) sunt în general plasate în interiorul unei incinte obscure și permit fotografierea gelurilor de dimensiuni mici. Ele prezintă avantajul că pot achiziționa semnalul luminos o perioadă mai îndelungată de timp, oferind astfel o sensibilitate mai mare. Camerele cu sensibilitate foarte mare au, în general, senzorul de lumină răcit în mod activ. În comerț există numeroase soluții de achiziție a imaginilor oferite de producători precum Bio-RaD (sistemele GelDoc) UVP (sistemele GelDoc IT, BioDoc IT) sau Vilber-Lourmat (sistemele Bio-Vision).

Scanerele (fie că este vorba de scanere speciale pentru aplicații de laborator sau de scanere obișnuite de birou) trebuie să fie rezistente la umezeală și să poată scana în transmitanță. Scanerele de birou nu pot fi utilizate pentru geluri fluorescente (gelurile de agaroză colorate cu bromură de etidiu). Amersham Biosciences comercializează o gamă foarte



variata de scanere, cu aplicații multiple.

După ce se realizează achiziția imaginilor, acestea pot fi prelucrate și analizate folosind diverse pachete software. În general, producătorul sistemului de achiziție a imaginilor pune la dispoziție aceste programe de analiză (VisionWorks LS, UVP; Photo-Capt, Vilber-Lourmat; Quantity One 1-D, Bio-RAD). Există, de asemenea, soluții independente de sistemul de achiziție precum ImageQuant TL propus de Amersham Biosciences. Prețurile de achiziție sunt destul de ridicate, însă oferă o foarte mare ușurință de utilizare.

O soluție mai puțin costisitoare, dar care cere mult mai multe cunoștințe și experiență din partea operatorului este ImageJ (21). Programul, dezvoltat de National Institute of Health (NIH), USA, folosește tehnologia Java, fiind astfel independent de sistemul de operare. Gama de operații pe care o poate realiza este ușor de mărit prin dezvoltarea de *plug-in-uri*. Acestea, ca și aplicația în sine, sunt disponibile gratuit pe site-ul web oficial: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.

### **Avantaje:**

Programul ImageJ poate fi utilizat pentru aprecierea masei moleculare relative, Rf-ului, stabilirea concentrației unei probe necunoscute folosind fotografia unui gel (indiferent dacă este vorba ADN sau proteine) sau fotografia unei plăci de cromatografie în strat subțire.

### **Limitări:**

Aplicația ImageJ nu este foarte ușor de utilizat, presupunând realizarea și respectarea unor suite de acțiuni foarte stricte. Din aceste motive, procesarea de geluri complexe, cu un număr mare de fracțiuni durează foarte mult timp. Programele specializate, menționate anterior, au avantajul că realizează toate aceste etape automat.

Densitometrarea gelurilor nu este cea mai indicată metodă pentru determinarea concentrației unei proteine dintr-un amestec. Operația se poate realiza, dar este necesară utilizarea și raportarea foarte precis la un set bine stabilit de proteine etalon. Astfel, pentru a obține valori absolute (mg proteină) este necesar ca fiecare gel să conțină probe standard cu

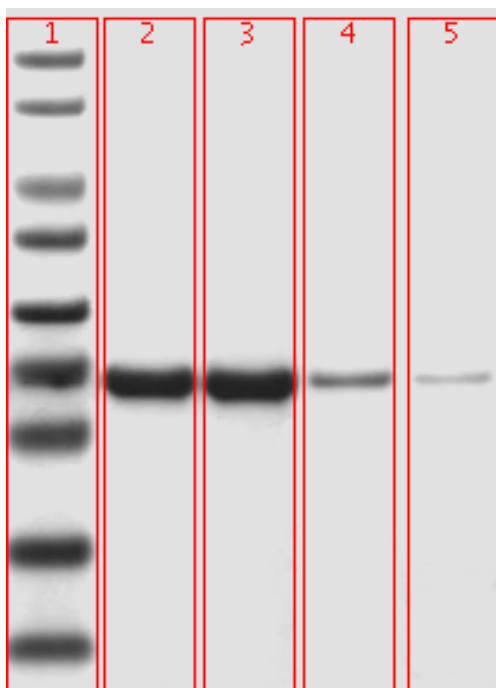
concentrații cunoscute. Cele mai indicate sunt standardele care conțin chiar proteina de interes, în lipsa acestora putându-se utiliza și proteine purificate comune (de exemplu albumina serică bovină, BSA). Gama de concentrații a standardelor trebuie să fie aleasă în așa fel încât proba necunoscută să aibă o concentrație intermediară. În acest caz, cantitățile obținute vor fi exprimate ca mg BSA.

### Mod de lucru:

În continuare sunt prezentate etapele necesare aprecierii masei moleculare și concentrației unei probe pe un gel SDS-PAGE. Trebuie menționat că aceste etape sunt identice și în cazul cuantificării unui gel ADN sau a unei plăci cromatografice.

**Aprecierea concentrației unei probe necunoscute** se realizează parcurgând următorii pași:

1. se separă electroforetic proba de interes simultan cu standardele și amestecul de proteine cu mase moleculare cunoscute, urmând protocolul descris anterior; După separare, gelul este colorat și fotografiat în format .tif sau .jpeg (Figura 28);



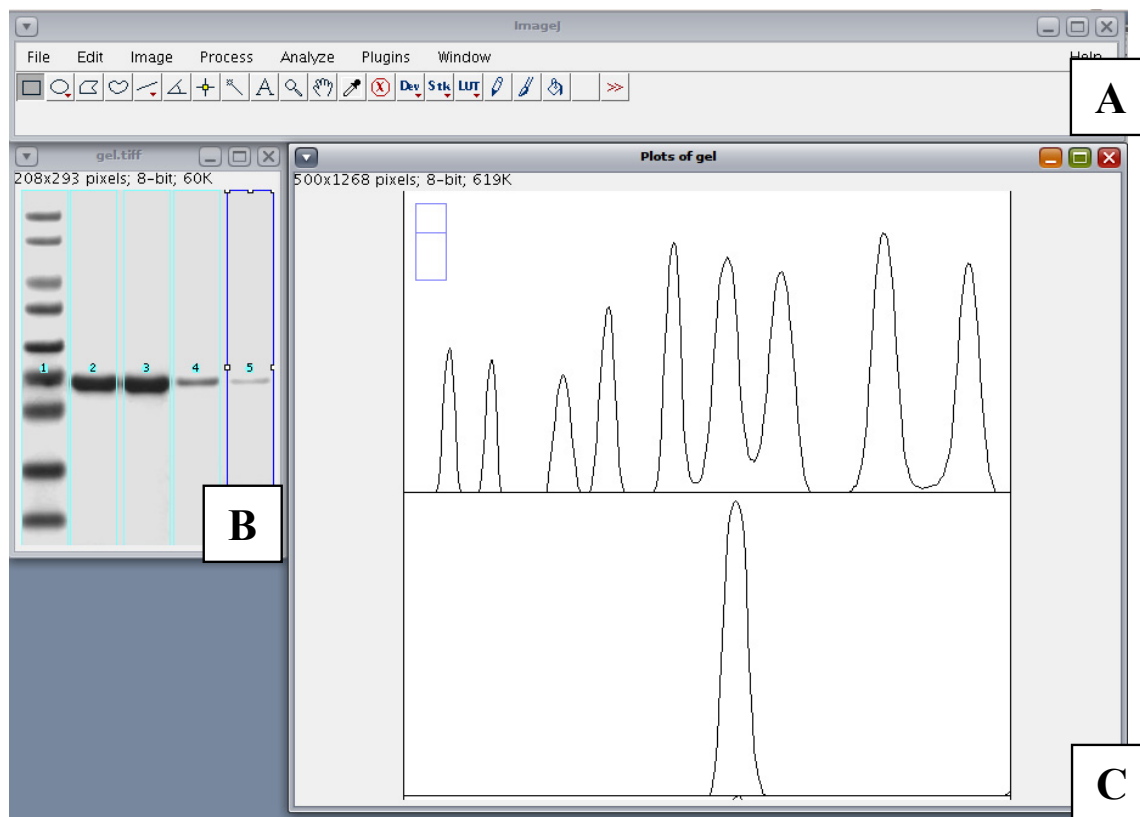
**FIGURA 28.** Imaginea unui gel SDS-PAGE cu godeurile marcate în aplicația ImageJ  
1 – marker de masă moleculară, 2 – probă de concentrație necunoscută, 3,4,5 – standarde conținând 9; 2,5; 0,5  $\mu$ g proteină

2. se lansează aplicația imageJ și din meniul *File* se selectează comanda *Open*; se indică calea către fotografia de interes;
3. se selectează *Rectangular Selection* și se marchează primul godeu;



*Dreptunghiul ce selectează godeul trebuie să fie suficient de mare astfel încât să poată fi mai apoi mutat pe fiecare lane în parte; dimensiunea lui nu poate fi modificată după selecția primului godeu*

Se apasă Ctrl+1 (sau se accesează *Analyze – Gels – Select first lane*) ceea ce va duce la marcarea și numerotarea primului godeu; dreptunghiul de selecție este apoi mutat pe următorul godeu, și se apasă Ctrl+2 (*Analyze – Gels – Select next lane*); se procedează astfel cu toate godeurile de interes, după care se apasă Ctrl + 3 (*Analyze – Gels – Plot lanes*); se va deschide o nouă fereastră care va conține densitograma gelului, fiecare godeu fiind reprezentat pe orizontală; Frațiunile separate se transformă în *peak*-uri a căror arie este dependentă de concentrația proteinei corespunzătoare; în acest punct imaginea de pe ecranul monitorului este asemănătoare cu cea prezentată în Figura 29.

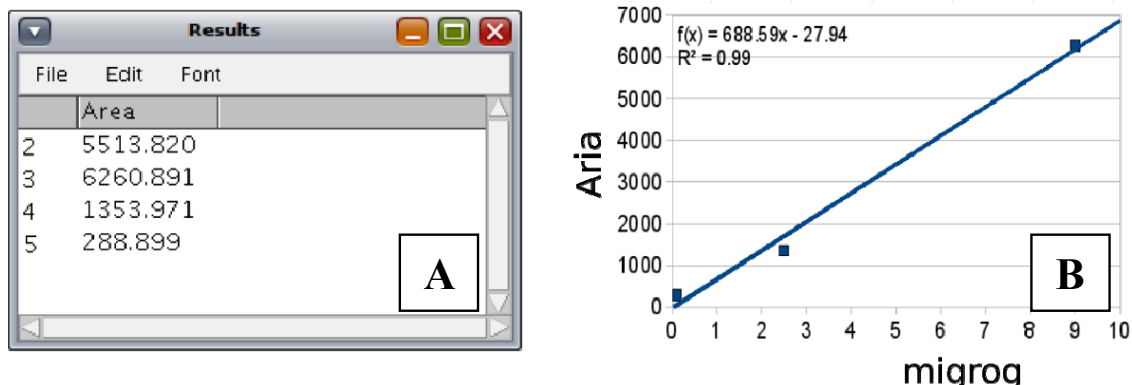


**FIGURA 29.** Interfața de utilizare a programului ImageJ.

A – fereastra principală cu bara de instrumente; B – fereastra pentru marcarea godeurilor; C – fereastra cu densitograma gelului

4. se selectează *Straight line selection* și prin trasarea de linii se stabilește linia de bază pentru fiecare *peak*; pentru etapa următoare este absolut necesar ca fiecare *peak* să delimiteze un perimetru închis;

5. se selectează *Wand (tracing) tool* și se face click pe fiecare *peak* corespunzător unei fracțiuni care trebuie cuantificată; va apărea o nouă fereastră, în care sunt prezentate ariile *peak*-urilor măsurate; aceste arii vor fi utilizate pentru aprecierea cantității de proteine, prin trasarea unei curbe de etalonare; operația se poate realiza direct pe hârtie milimetrică sau folosind programe specializate (Ex. Microsoft Excel); Un exemplu de arii și curbă de etalonare (realizată cu standardele 3; 4; 5) este prezentat în Figura 30.



**FIGURA 30.** Rezultate tipice obținute prin densitometrarea unui gel SDS-PAGE (A) și trasarea curbei de etalonare (B).

Utilizând dreapta de etalonare obținută din ariile probelor 3, 4 și 5 se poate calcula cantitatea de proteină din proba necunoscută (proba 2, mg proteină =  $(5513,820 - 27.94)/688.59 = 7,96$  mg.

**Pentru aprecierea masei moleculare relative** este necesară migrarea în paralel a unor proteine cu masă moleculară cunoscută (în cazul gelului din Figura 28, godeul 1, Sigma Wide Range Protein Markers). Etapele care trebuie parcurse sunt identice cu cele folosite pentru aprecierea concentrației până la punctul 3, după care se procedează astfel:

1. se închide fereastra conținând densitograma și se răspunde *da* la întrebarea dacă se dorește salvarea imaginii; din meniul *File* se selectează comanda *Open* și se indică calea către imaginea salvată;
2. se selectează *Straight line selections* și cu ajutorul cursorului, ținând tasta *Shift* apăsată se trasează o linie orizontală de la capătul din stânga al densitogramei până la vârful *peak*-ului de interes;
3. se apasă *Ctrl+M* (sau se accesează meniul *Analyze – Measure*) pentru a măsura distanța marcată; se va deschide o fereastră care ne arată rezultatul măsurătorii (lungimea porțiunii marcate și unghiul); Valoarea unghiului trebuie să fie zero la toate măsurătorile;
4. etapele 7 și 8 se repetă pentru toate fracțiunile (*peak*-urile) standard și pentru probă; se măsoară de asemenea distanța de la capătul din stânga al densitogramei până la *peak*-ul corespunzător frontului colorantului (sau până la capătul din dreapta, dacă colorantul nu este vizibil); rezultatele obținute pot fi salvate în format *.csv* și importate în Microsoft Excel; se împarte distanța obținută pentru fiecare *peak* la distanța corespunzătoare

colorantului pentru a obține valoarea mobilității relative a fracției respective ( $R_f$ ) (22); se construiește o curbă de calibrare prin plasarea pe un sistem de coordonate a valorilor  $R_f$  și a valorilor logaritmului maselor moleculare ale proteinelor standard; de pe dreapta obținută, prin extrapolare, se poate determina masa moleculară a probei necunoscute.

## **Bibliografie**

1. Westermeier, R. (2005) –*Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations* (Westermeier, R., Ed.). Wiley-VCH.
2. Kunkel, H. G., Tiselius, A. (1951) –Electrophoresis of proteins on filter paper., *The Journal of General Physiology*, 35, 89-118.
3. Kohn, J. (1957) –An Immuno-electrophoretic Technique, *Nature*, 180, 986-987.
4. Smithies, O. (1955) –Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults., *The Biochemical Journal*, 161, 629-41.
5. Scherz, H. (1990) –Thin-layer electrophoretic separation of monosaccharides, oligosaccharides and related compounds on reverse phase silica gel., *Electrophoresis*, 11, 18-22.
6. Dennison, C. (1999) –A Guide to Protein Isolation, p 122-133. Springer.
7. Ornstein, L. (1964) –Disc electrophoresis I. Background and theory, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 321-49.
8. Davis, B. J. (1964) –Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404-27.
9. Chrambach, A., Jovin, T. M. (1983) –Selected buffer systems for moving boundary electrophoresis on gels at various pH values, presented in a simplified manner, *Electrophoresis*, 4, 190-204.
10. Niepmann, M., Zheng, J. (2006) –Discontinuous native protein gel electrophoresis., *Electrophoresis*, 27, 3949-51.
11. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) –*Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, p. 18.47-18.58. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

12. Gerstein, A. S. (2001) –*Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide* (Gerstein, A. S., Ed.), p 331-373. Wiley-Liss.
13. Laemmli, U. K. (1970) –Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
14. Schägger, H. (2006) –Tricine-SDS-PAGE., *Nature protocols*, 1, 16-22.
15. Poduslo, J. F. (1981) –Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis: comparison of tris-glycine and tris-borate-EDTA buffer systems., *Analytical Biochemistry*, 114, 131-9.
16. Ausubel, M. F., Brent, R., Kingston, E. R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, A. J., Struhl, K. (2002) –*Short Protocols in Molecular Biology*, p 10.1-10.31. John Wiley & Sons.
17. Manchenko, G. P. (2002) –*Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, Second Edition. CRC Press.
18. Westermeier, R., Naven, T., Hamppker, H. R. (2008) –*Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design* (Westermeier, R., Ed.), p 19-27. Wiley-VCH.
19. Sammons, D. W., Adams, L. D., Nishizawa, E. E. (1981)– Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 2, 135-141.
20. Schoenle, E. J., Adams, L. D., Sammons, D. W. (1984) –Insulin-induced rapid decrease of a major protein in fat cell plasma membranes., *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 12112-6.
21. Abramoff, D. M., Magelhaes, J. P., Ram, J. S. (2004) –Image processing with ImageJ, *Biophotonics International*, 11, 36-42.
22. Garfin, D. (1990) –*One-dimensional gel electrophoresis*, *Methods in Enzymology*, 182, 425-441.